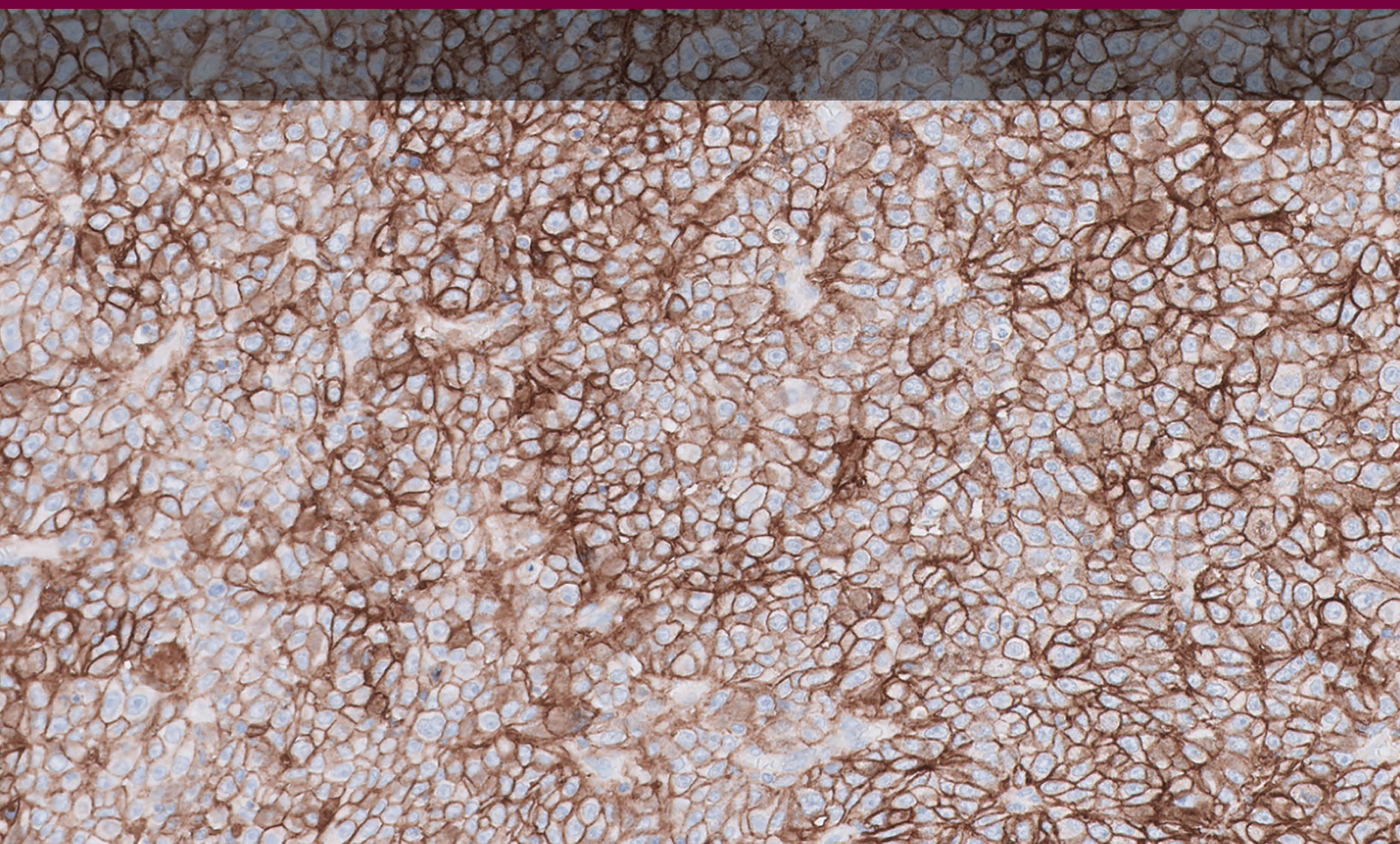


PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の トリプルネガティブ乳癌染色結果判定マニュアル

体外診断用

体外診断用医薬品 承認番号:22800EZX00078000



目次

| | |
|---|-----------|
| 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 |
| キットの構成 (SK00621-5J) | 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 |
| PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」染色手順 | 14 |
| テクニカルチェックリスト | 17 |
| スライドの評価 | 18 |
| 一般的留意点 | 18 |
| 組織の評価基準 | 18 |
| コントロールの評価 | 19 |
| スライド評価フローチャート | 23 |
| Combined Positive Score (CPS) | 24 |
| Combined Positive Score (CPS) の定義 | 24 |
| CPS の分子の組み入れ/除外基準 | 24 |
| Combined Positive Score (CPS) の決定 | 25 |
| 推奨メソッド | 27 |
| CPS の判定 | 30 |
| 治療対象となるトリプルネガティブ乳癌患者の選定 | 31 |
| PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」検査計画 | 31 |
| 結果の報告 | 32 |
| Combined Positive Score (CPS) の要約および症例 | 33 |
| PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」での染色結果判定における注意事項 | 33 |
| トリプルネガティブ乳癌症例のさまざまな染色像とその解釈 | 34 |
| アーチファクト | 53 |
| PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」染色症例 | 59 |
| CPS < 10 の症例 | 59 |
| カットオフ付近の症例 (CPS 5 ～ 15) | 62 |
| CPS ≥ 10 の症例 | 68 |
| コントロールスライド (CCL) 付録 | 72 |
| トラブルシューティングガイド | 83 |
| 臨床性能評価 | 85 |
| 参考文献 | 87 |

使用目的

体外診断用

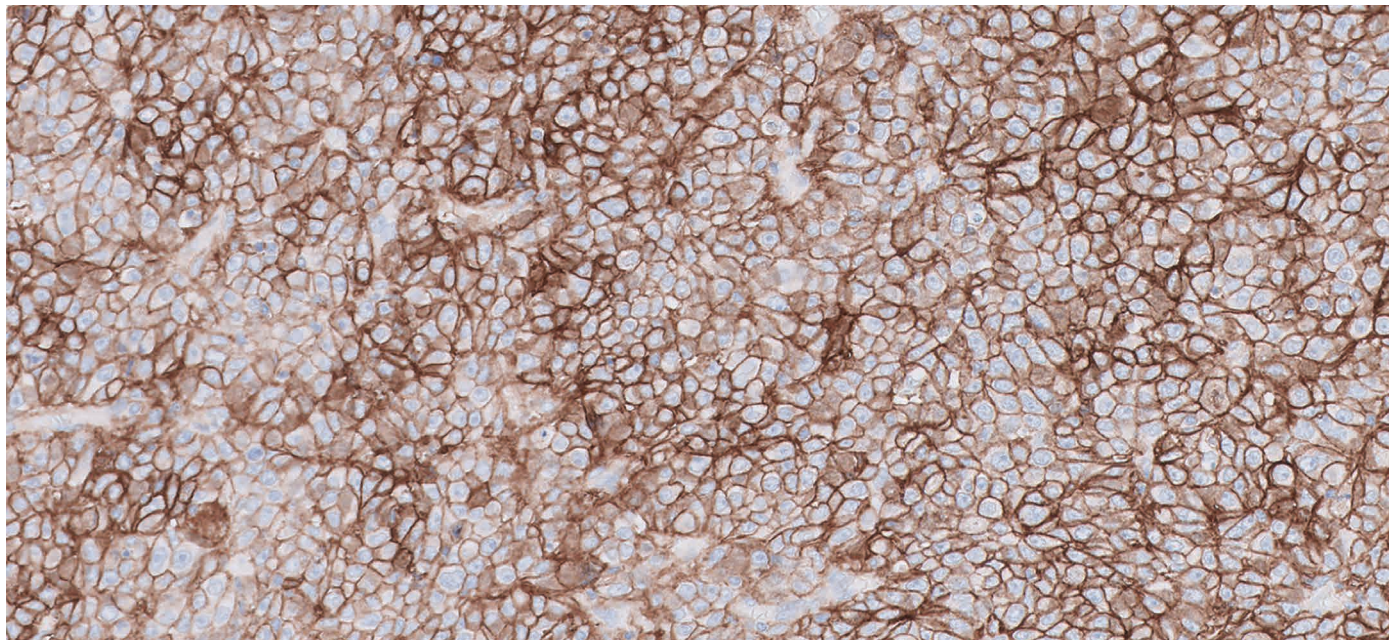
がん組織、細胞中のPD-L1発現率の測定（非小細胞肺癌患者、頭頸部癌患者、食道癌患者又は乳癌患者におけるペムブロリズマブ（遺伝子組換え）の適切な投与を行うための補助に用いる）

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」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（NSCLC）、頭頸部癌、食道扁平上皮癌（ESCC）、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）組織中の PD-L1 発現率を測定するためのものです。

非小細胞肺癌における 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。

頭頸部癌、食道扁平上皮癌、トリプルネガティブ乳癌における PD-L1 発現率は、PD-L1 抗体で染色された細胞（腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ）の数を生存腫瘍細胞の総数で割り、100 を掛けた Combined Positive Score（CPS）を用いて決定します。

キイトルーダは、Merck & Co., Inc. の子会社である Merck Sharp & Dohme Corp. の登録商標です。



はじめに

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」は、トリプルネガティブ乳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唯一のコンパニオン診断薬です。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（FFPE）トリプルネガティブ乳癌検体中の 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、キイトルーダの治療に適した患者選定の補助に使用できます。

このマニュアルでは、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。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」を用いたトリプルネガティブ乳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、このような症例や PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」によって染色されたトリプルネガティブ乳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。トリプルネガティブ乳癌における PD-L1 発現率は、PD-L1 抗体で染色された PD-L1 陽性細胞（腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ）の数を総生存腫瘍細胞数で割り、100 を掛けた Combined Positive Score (CPS) を用いて決定します。

PD-L1 発現を検査するトリプルネガティブ乳癌検体はスコアリングされ、Combined Positive Score (CPS) に基づき、PD-L1 発現レベルに分けられます。

- CPS < 10
- CPS ≥ 10

PD-L1 発現レベルを用いて、患者にキイトルーダ治療の選択肢について情報提供を行うことができます。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）の最新版の添付文書を参照してください。

結果の判定

本製品は、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。本製品は、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

掲載されている顕微鏡写真は、子宮頸部の扁平上皮細胞癌である図 39 を除き、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）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。

組織サンプルは、米国国立がん研究所が資金提供する Cooperative Human Tissue Network によって提供されました。他の治験責任医師も同一被験者から検体を得た可能性があります。

材料の供給元は Conversant Biologics です。

組織サンプルは BioIVT Asterand によって供給されました。

このプロジェクトで用いられるデータおよび生物検体は、Trans-Hit Biomarkers Inc. を通して、ハンガリー Tumorgenetika（ブダペスト）、フランス Hospice Civils de Lyon（リヨン）、およびフランス Centre Antoine Lacassagne（ニース）から適切な倫理上の承認を得て提供されています。

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、排除のための検知を回避し続け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」はトリプルネガティブ乳癌組織検体中の PD-L1 を検出する

トリプルネガティブ乳癌における 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-355 試験) で用いられた唯一の PD-L1 アッセイです。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。

PD-1/PD-L1 経路

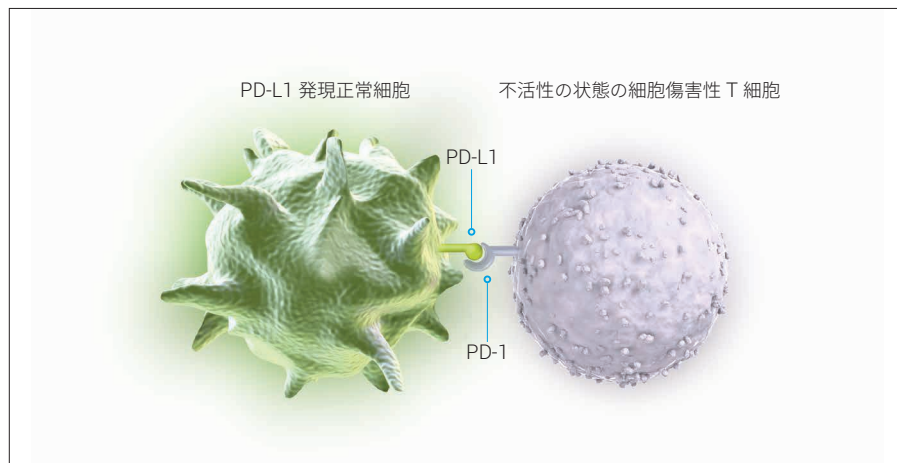


図 1: T 細胞が不活性化すると、正常組織へのダメージが抑制される。

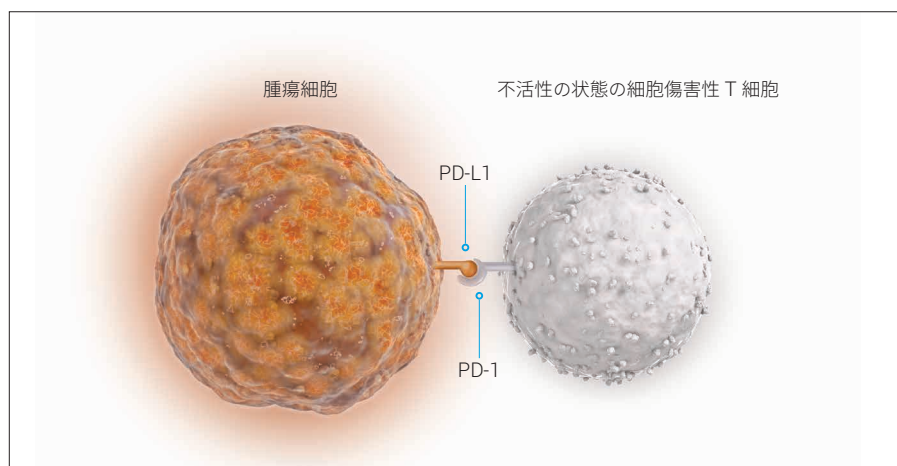


図 2: T 細胞が不活性化すると、腫瘍の細胞死が抑制される。

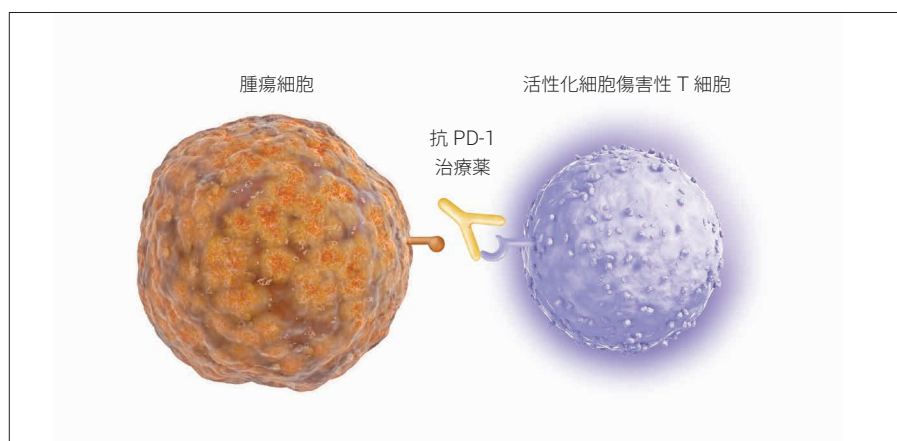


図 3: PD-1 / PD-L1 の相互作用が阻害されると、活性化した T 細胞の働きが有効になり、腫瘍細胞を積極的に排除できるようになります。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の概要

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」とは何ですか？

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」は、トリプルネガティブ乳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唯一のコンパニオン診断薬です。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」は、定性的な免疫組織化学的（IHC）アッセイであり、FFPE トリプルネガティブ乳癌組織中の PD-L1 発現率をダコ Autostainer Link 48（IHC 自動染色装置）上で測定するためのものです。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の構成

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」には、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 エンハンサー試薬が含まれています（図 4）。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。検体はブロッキング試薬で処理後、PD-L1 に特異的な一次抗体（抗 PD-L1 マウスモノクローナル抗体（Clone 22C3））、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。その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。

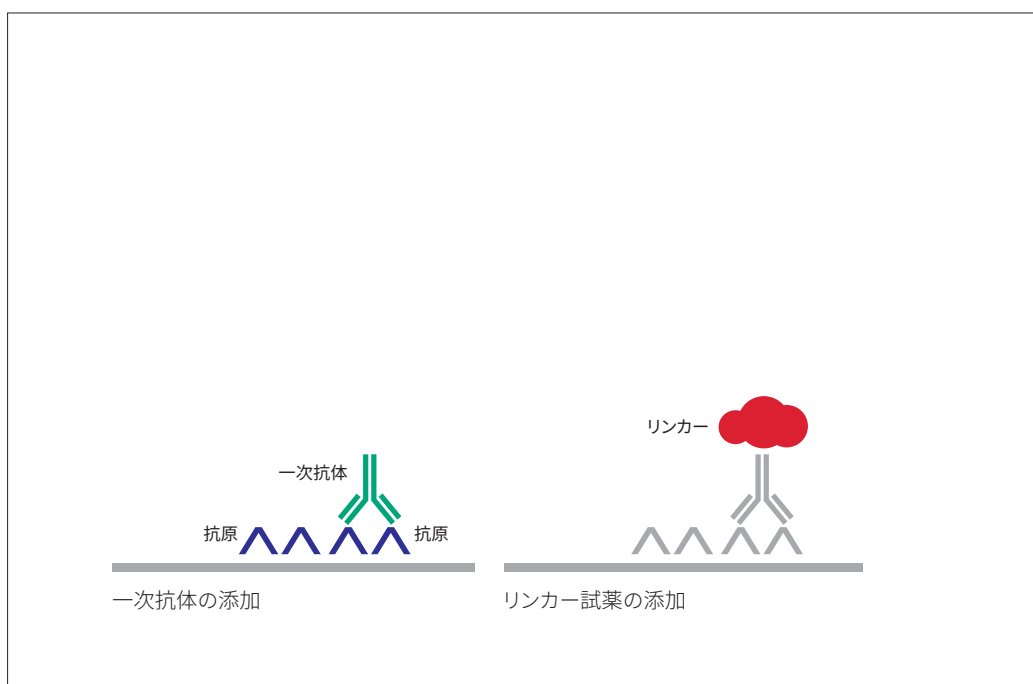


図 4: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」染色手順

キットの構成 (SK00621-5J)



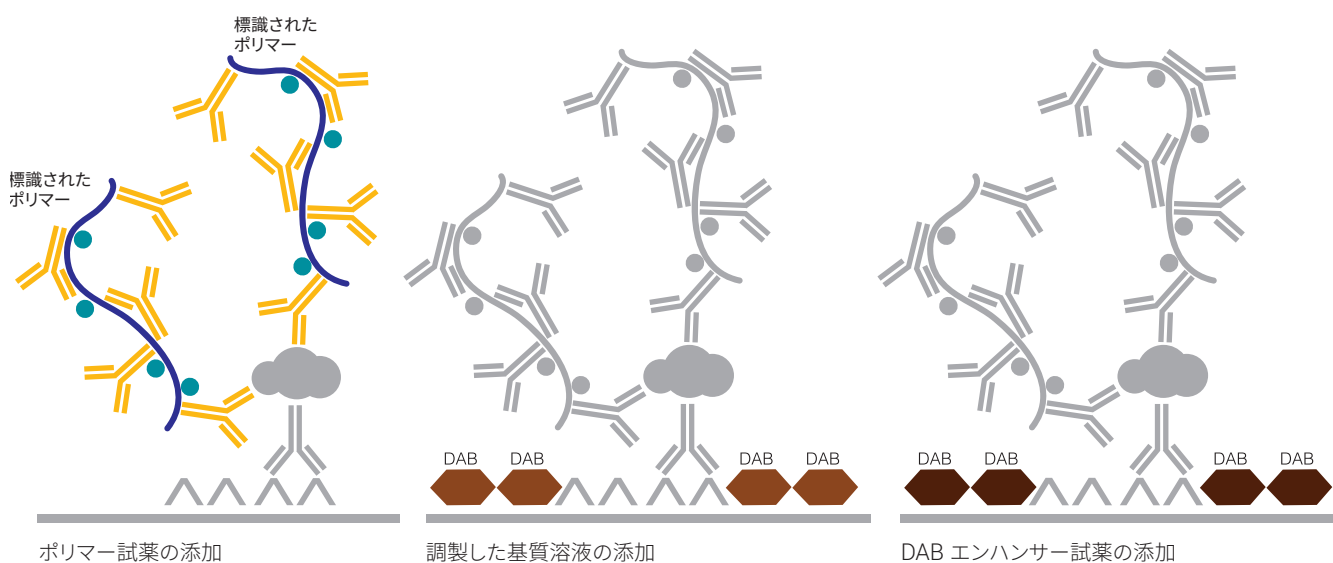
図 5: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の構成

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 枚が含まれています (図 5)。

- ① 濃縮抗原賦活液 (50×)
- ② ブロッキング試薬
- ③ 一次抗体: 抗 PD-L1 マウスモノクローナル抗体 (Clone 22C3)
- ④ 一次抗体陰性コントロール
- ⑤ リンカー試薬
- ⑥ ポリマー試薬
- ⑦ 基質緩衝液
- ⑧ 発色基質
- ⑨ DAB エンハンサー試薬
- ⑩ コントロールスライド*

*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。

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 (Autostainer Link 用) (型番: K800821-2) が別途必要です。



技術的留意点

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」キットを用いた検査は、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。

各施設でご用意いただく陽性対照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および腫瘍関連単核炎症細胞（MIC: リンパ球とマクロファージ）が含まれることが理想的です。理想的な陰性対照コントロール組織では、腫瘍細胞および免疫細胞は染色されません。しかし、免疫細胞上ではPD-L1の発現率が高いため、若干の染色は許容範囲内です。

追加 (オプション) の施設内 コントロール: 扁桃組織

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、表層上皮には PD-L1 発現を認めません。

組織の処理

FFPE 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 組織サンプルにおいて、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。固定が 3 時間以下の組織検体は本検査には使用しないでください。また、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプル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。保存する場合は、2 ～ 8 °C の冷暗所で保存して 7.5 か月以内に染色するか (推奨)、25 °C 以下の室温で保存して 4 か月以内に染色してください。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」染色手順

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の試薬およびプロトコールは適切な結果を出すために最適化されています。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成分を、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

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 っ分 (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 倍) 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。

- － 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)
- － 発色基質の溶液の色はさまざまで、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および一次抗体陰性コントロールを滴下させるプロトコールで染色
- － 各患者の検体の連続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。
- － 組織検体をの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 (Autostainer Link 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。

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 _____

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

| | はい | いいえ |
|---|--------------------------|--------------------------|
| ダコ Autostainer Link 48 と PT Link に対し、定期的なメンテナンスを実施していますか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」キットパッケージに表記されている有効期限を遵守していますか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 本品中のコントロールスライドおよびすべての PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」構成試薬は、2 ～ 8 °C の暗所に保管されていますか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 本品中のコントロールスライドおよびすべての PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」構成試薬は、染色前に室温 (20 ～ 25 °C) に戻しましたか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 施設内陽性対照・陰性対照のコントロールスライドには、トリプルネガティブ乳癌組織を選択しましたか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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"/> |
| 組織へのパラフィン浸透は 60 °C 以下で実施しましたか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 組織は 4 ～ 5 μm に薄切し、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"/> |
| 組織検体を 58 ± 2 °C で 1 時間ベーキングしましたか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 保管されていた未染スライドを使用した場合、その組織検体は、薄切後 7.5 か月以内 (2 ～ 8 °C) または 4 か月以内 (室温 25 °C まで) のものですか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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。) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 洗浄液は適切に調製していますか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 基質溶液は適切に調製していますか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 対比染色には、ダコ Envision FLEX ヘマトキシリン (Autostainer Link 用) を使用していますか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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ないように洗浄液をかけて湿潤状態を保っていますか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 染色に際し、ダコ Autostainer Link 48 上で PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」プロトコールを選択しましたか？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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？ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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:

スライドの評価

一般的留意点

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の結果は、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、30 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 枚の連続切片を作成し、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、残りの連続切片も同一の組織品質を担保されることになります。

本品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評価方法は 19 ページに記載されています。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

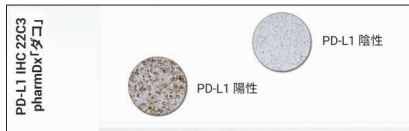


図 6: 本品中のコントロールスライドには、PD-L1 発現陽性と陰性の細胞が含まれています。

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。本品中の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）。両方の細胞中の陽性細胞の割合、染色強度、および非特異的染色を評価します。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

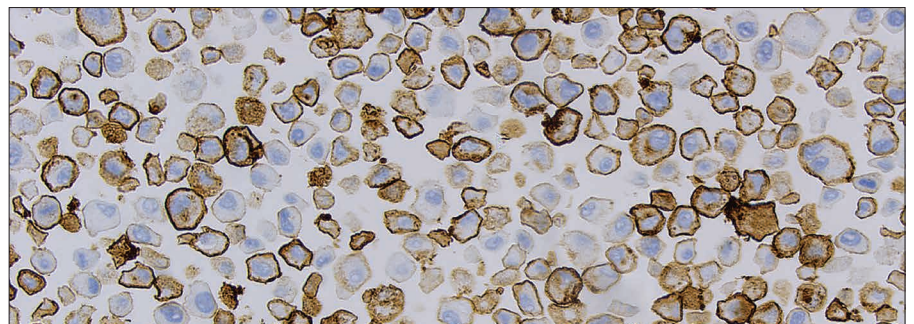


図 7: 本品中のコントロールスライド（陽性対照のコントロール細胞）の染色性（20 倍拡大）

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

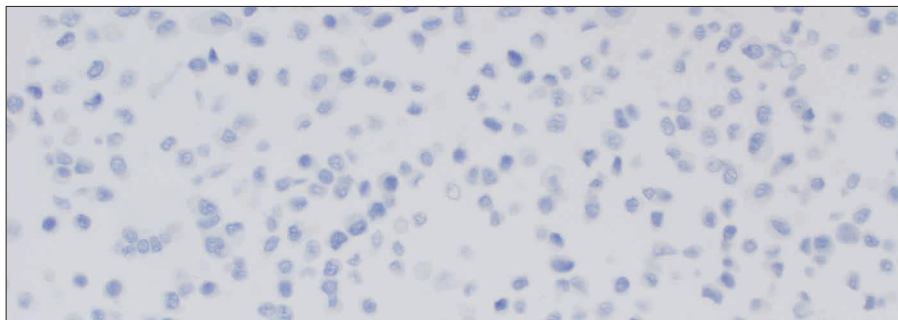


図 8: 本品中のコントロールスライド（陰性対照のコントロール細胞）の染色性 (20 倍)

コントロールスライド染色の合格、ボーダーライン、不合格の画像は、72 ページのコントロールスライド（CCL）付録を参照してください。

陽性および陰性対照の施設内コントロール組織（トリプルネガティブ乳癌）

トリプルネガティブ乳癌陽性コントロール組織スライドを観察し、固定方法および抗原賦活処理が有効であることを確認します。陽性コントロール組織スライドは、PD-L1 一次抗体および一次抗体陰性コントロールで染色する必要があります。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および腫瘍関連単核炎症細胞（MIC）が含まれることが理想的です（図 9）。既知の陽性組織コントロールは、処理した組織および試験試薬の正しい性能をモニタリングするためにのみ使用し、患者検体の特異的な診断を行う補助として用いることはできません。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。

- － PD-L1 一次抗体で染色したスライドの要件：茶色の細胞膜染色が観察される。非特異的染色は $\leq 1+$ である
- － 一次抗体陰性コントロールで染色したスライドの要件：細胞膜染色なし。非特異的染色は $\leq 1+$ である

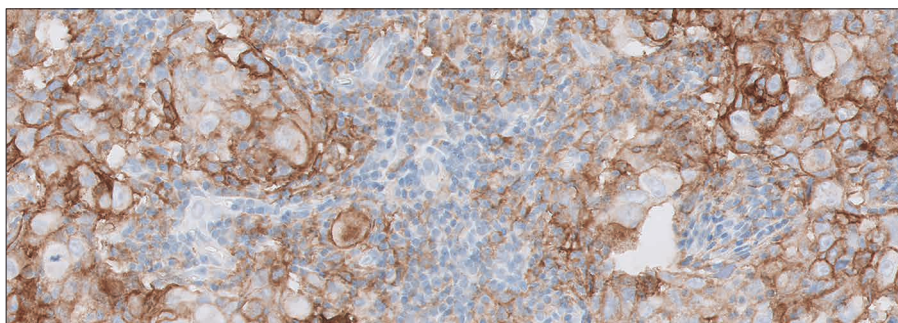


図 9: 施設内陽性対照組織 (20 倍)

トリプルネガティブ乳癌陰性コントロール組織スライドを観察し、一次抗体による標的抗原の標識の特異性を確認します。陰性コントロール組織スライド（PD-L1 陰性が既知のもの）は、PD-L1 一次抗体および一次抗体陰性コントロールで染色する必要があります。理想的なトリプルネガティブ乳癌陰性対照のスライドでは、腫瘍細胞および免疫細胞は染色されません（図 10）。しかし、免疫細胞上ではPD-L1 の発現率が高いため、若干の染色は許容範囲内です。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切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。

注意事項: 別の方法として、陽性コントロール組織の陰性部分を陰性コントロール組織として使用することができますが、これは検査担当者が確認する必要があります。

- － PD-L1 一次抗体で染色したスライドの要件：腫瘍細胞に細胞膜染色なし。非特異的染色は $\leq 1+$ である
- － 一次抗体陰性コントロールで染色したスライドの要件：細胞膜染色なし。非特異的染色は $\leq 1+$ である

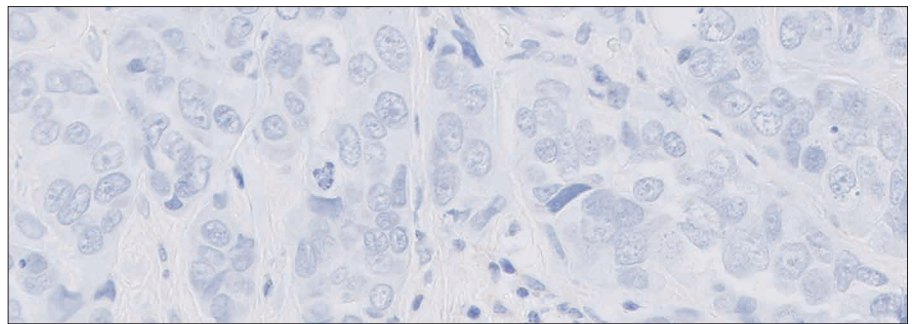


図 10: 腫瘍細胞および MIC (20 倍拡大) の両方が陰性を呈する施設内陰性コントロール組織

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。

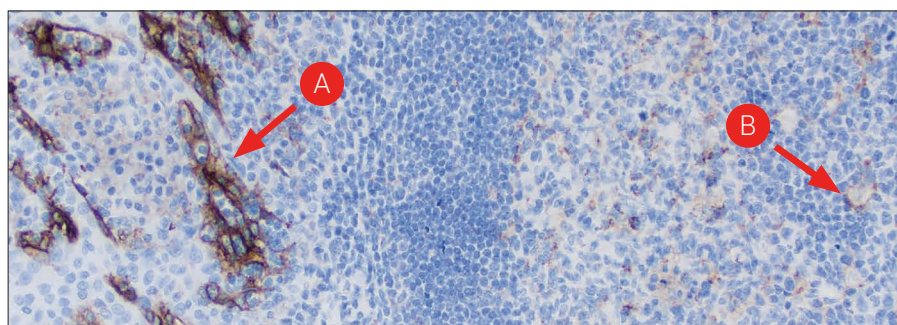


図 11: PD-L1 一次抗体で染色した扁桃腺組織は、陰窩上皮で部分的に強い膜染色を示し (A)、胚中心で濾胞性マクロファージに弱から中程度の膜染色を示します (B) (対物レンズ 10 倍)。

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 $\leq 1+$ です。

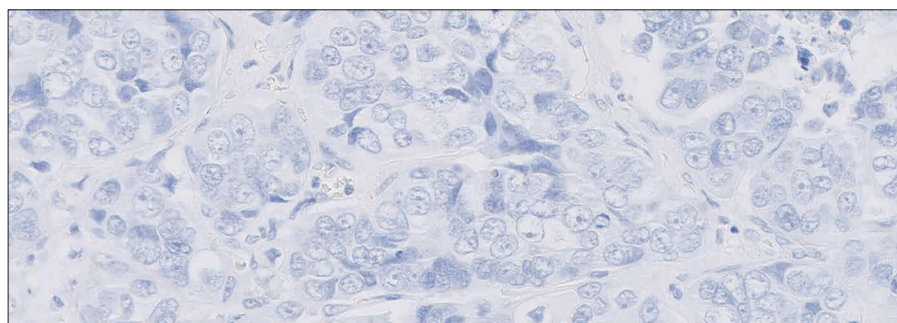


図 12: 一次抗体陰性コントロールで染色した TNBC 組織検体 (対物レンズ 20 倍)

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

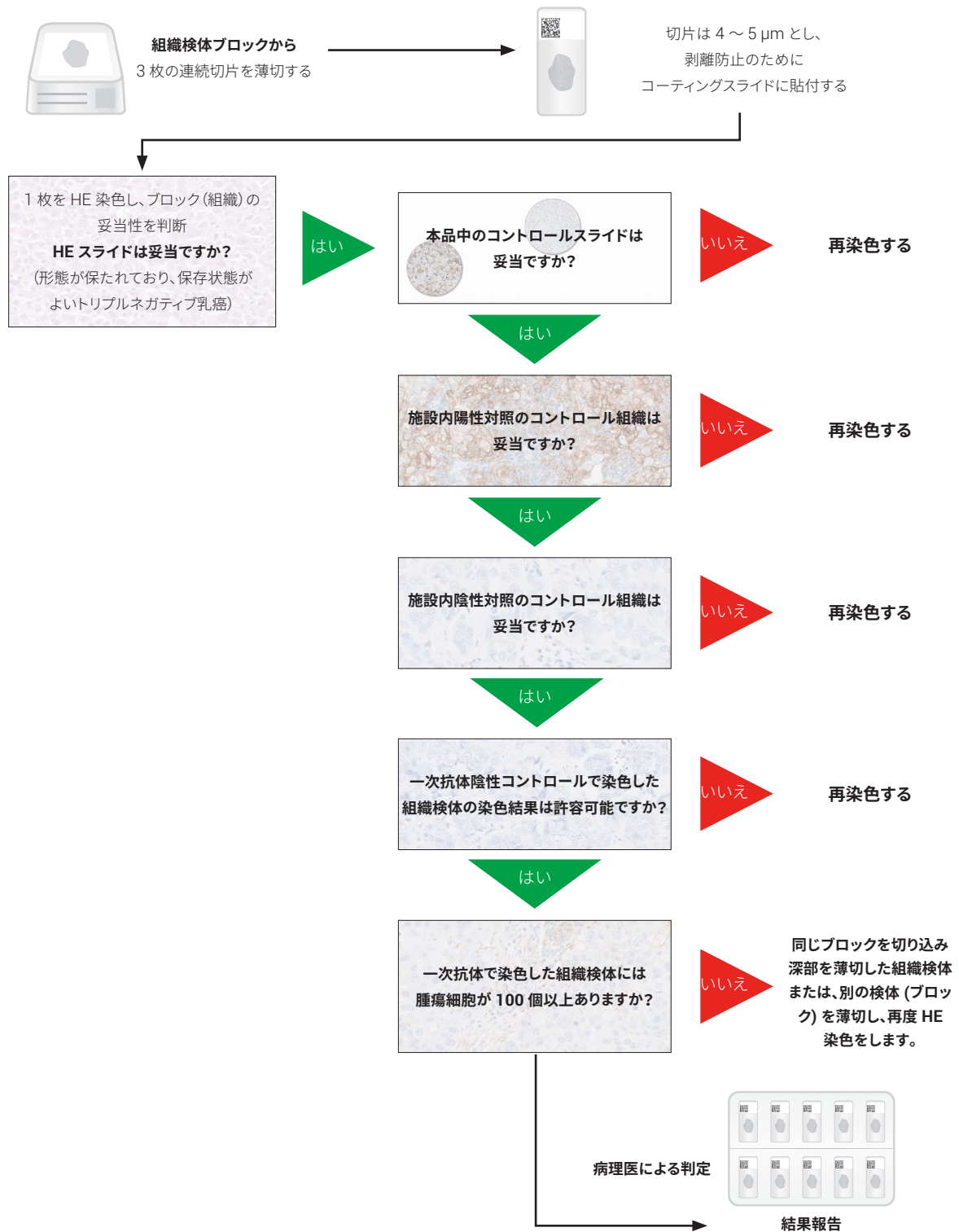


図 13: スライド評価の推奨される順番

Combined Positive Score (CPS)

Combined Positive Score (CPS) の定義

トリプルネガティブ乳癌における PD-L1 発現率は、PD-L1 抗体で染色された PD-L1 陽性細胞（腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ*）の数を総生存腫瘍細胞数で割り、100 を掛けた Combined Positive Score (CPS) を用いて決定します。計算結果が 100 を超過することもあります。最高点を CPS 100 として定義します。

CPS は以下のとおり定義します。

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数 (腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ)}}{\text{生存腫瘍細胞の総数}} \times 100$$

* マクロファージと組織球は同じ細胞と判断します。

CPS の分子の組み入れ/除外基準

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）は、PD L1 発現としてスコアリングに含めます。

腫瘍巣や隣接する支持間質組織内のリンパ球およびマクロファージ（単核炎症細胞、MIC）の細胞膜染色または細胞質染色（強度 1+ 以上）は、PD-L1 発現として CPS の分子に含めます。腫瘍に対する応答に直接関連する MIC のみをスコアリングします。

その他の CPS の組み入れ/除外基準については、26 ページの表 1 および 2 を参照してください。

Combined Positive Score (CPS) の決定

- 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 陽性および陰性の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。
 - PD-L1 染色スライド（生検および切除検体）の腫瘍細胞が 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 個に満たない場合には、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。
- 高倍率（20 倍）で PD-L1 発現率を評価して CPS を計算してください。
 - 腫瘍細胞の合計数（PD-L1 陽性および陰性）を決定します（CPS の分母）。
 - PD-L1 陽性細胞数（腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ）（CPS の分子。その他の CPS の組み入れ/除外基準については、26 ページの表 1 および 2 を参照）を決定します。
 - CPS を計算します。
- 細胞膜染色は 20 倍程度の対物レンズで評価します。スライドの評価者は、40 倍の対物レンズで CPS 計算を行わないでください。

表 1: CPS の分子の組み入れ/除外基準

| 組織成分 | 分子への組み入れ | 分子からの除外 |
|--------|--|---|
| 腫瘍細胞 | 浸潤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) | <ul style="list-style-type: none"> 陰性腫瘍細胞 細胞質染色のみの腫瘍細胞 上皮内癌 (DCIS および LCIS) |
| 免疫細胞 | 腫瘍巣および隣接する支持間質組織内の単核炎症細胞 (MIC) の細胞膜染色または細胞質 * 染色 (強度 1+ 以上) †: <ul style="list-style-type: none"> リンパ球 (リンパ球凝集含む) マクロファージ ‡ 腫瘍に対する応答に直接関連する MIC のみがスコアリングされます。 | <ul style="list-style-type: none"> 陰性 MIC DCIS および LCIS に関連する MIC 良性病変に関連する MIC 腫瘍に対する反応に直接関連しない MIC (リンパ球凝集含む) 好中球、好酸球および形質細胞 |
| その他の細胞 | 除外 | <ul style="list-style-type: none"> 良性上皮細胞 間質細胞 (線維芽細胞含む) 壊死細胞または細胞片 |

* MIC では、細胞質に対する細胞核の比率が高いため、多くの場合細胞膜染色と細胞質染色とは判別不能です。このため、MIC の細胞膜または細胞質染色はスコアリングに含まれます。

† 隣接する MIC は腫瘍と同じ 20 倍視野内にあると定義されます。しかし、腫瘍に対する反応に直接関連しない MIC は除外されます。

‡ マクロファージと組織球は同じ細胞と考えられます。

表 2: CPS の分母の組み入れ/除外基準

| 組織成分 | 分母への組み入れ | 分母からの除外 |
|--------|----------|--|
| 腫瘍細胞 | 全浸潤腫瘍細胞 | <ul style="list-style-type: none"> 非生存腫瘍細胞 上皮内癌 (DCIS および LCIS) |
| 免疫細胞 | 除外 | すべての免疫細胞 |
| その他の細胞 | 除外 | <ul style="list-style-type: none"> 良性細胞 間質細胞 (線維芽細胞含む) 壊死細胞または細胞片 |

推奨メソッド

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 3 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 Combined Positive Scores (CPS) を決定する方法として参考にしてください。

IHC スライド全体を評価して、どの方法を使用するかを決めてください。

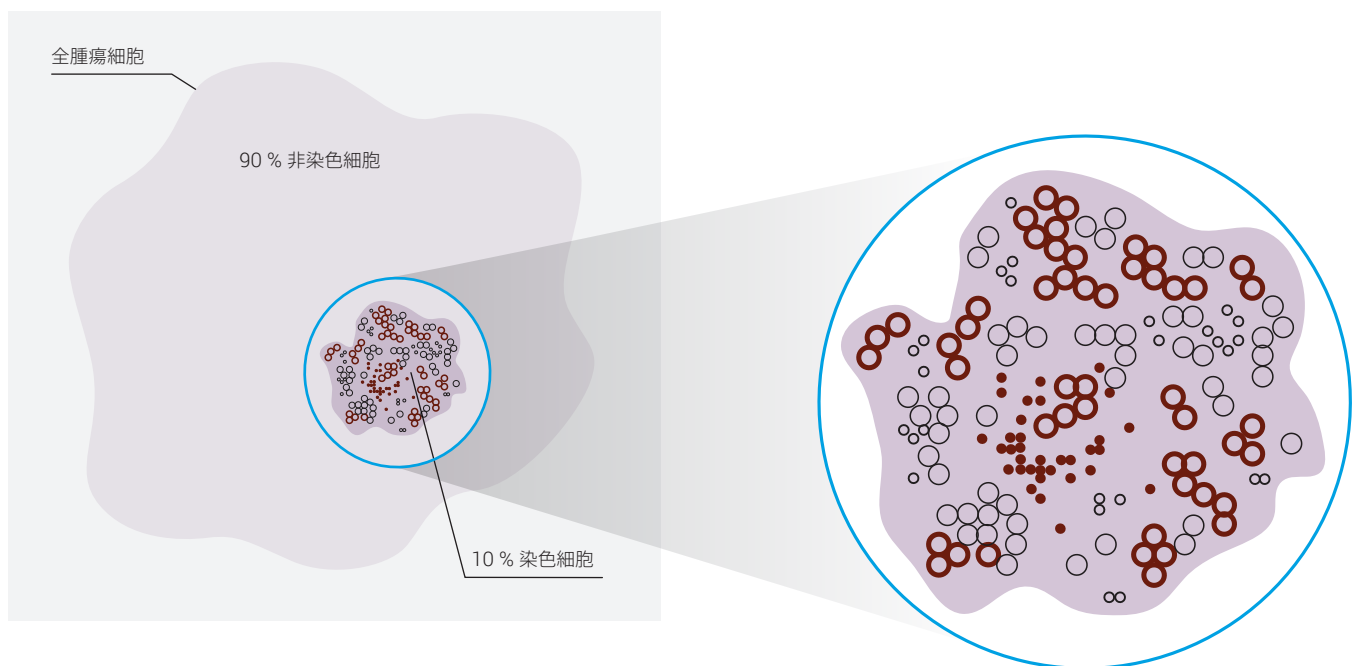
例 1: 狭い PD-L1 陽性領域に基づく Combined Positive Score (CPS) の計算

まず、25 ページの「Combined Positive Score (CPS) の決定」の記載に従って、明瞭に染色された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 %

次に、染色領域を評価し、PD-L1 陽性細胞数 (腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ) を推定します。

判定: 腫瘍細胞が約 100 個と PD-L1 陽性細胞が約 80 個 (CPS の分子) 存在します。



腫瘍細胞領域全体の Combined Positive Score (CPS) を計算します。

判定:

染色領域の CPS

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数}^{\S}}{\text{生存腫瘍細胞の総数}} \times 100 = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数 約 80 個}}{\text{腫瘍細胞数 100 個}} \times 100 = 80$$

全腫瘍領域の CPS $10\% \times 80 \approx \text{CPS } 8$

- PD-L1 陽性腫瘍細胞
- 陰性腫瘍細胞
- PD-L1 陽性単核炎症細胞
- 陰性単核炎症細胞

臨床的な判定: CPS < 10

[§] 腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ含む

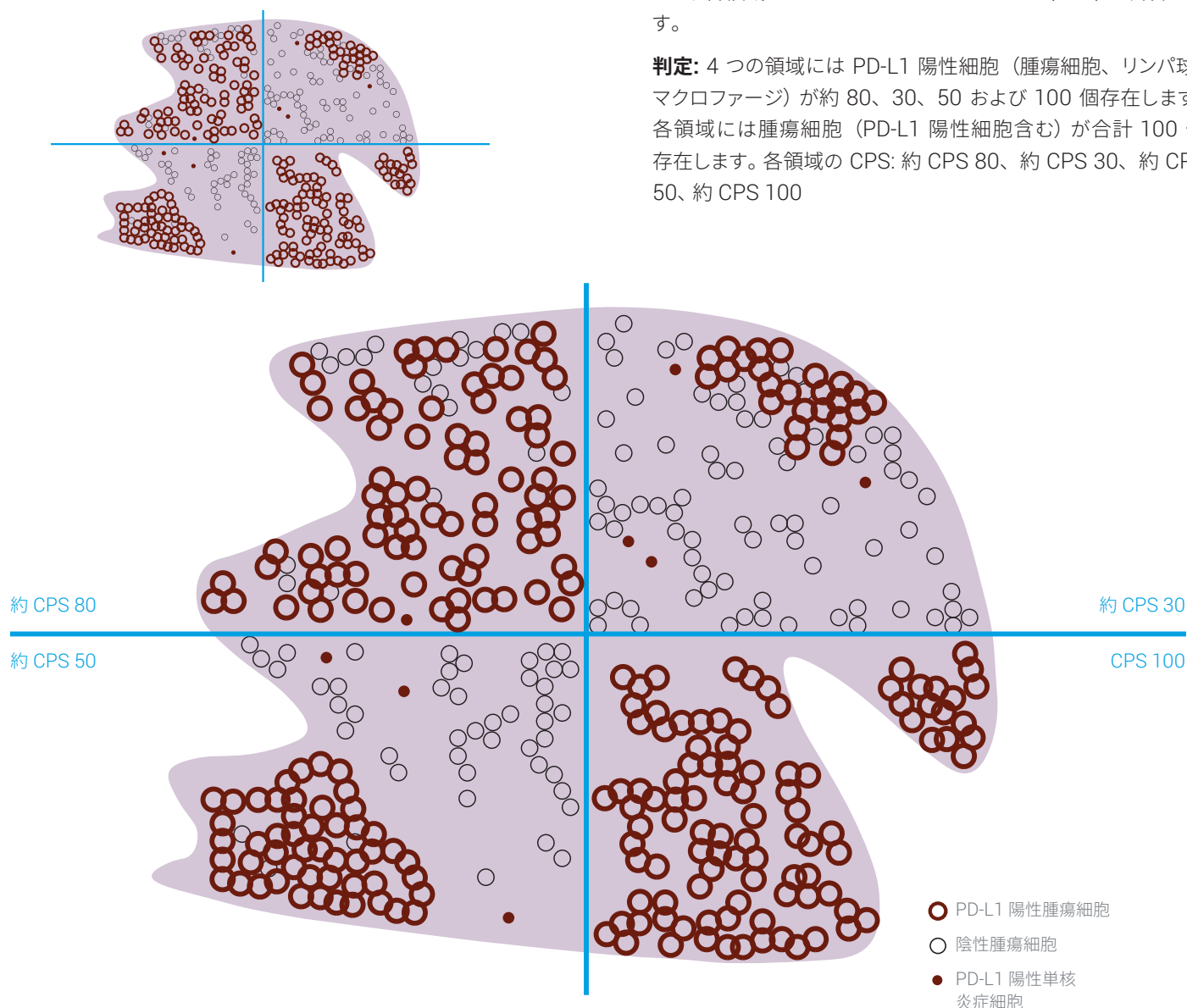
図 14: PD-L1 陽性領域が狭い腫瘍の例

例 2: 不均一な PD-L1 染色領域に基づく Combined Positive Score (CPS) の計算

まず、腫瘍細胞数が等しくなるように腫瘍領域を視覚的に分割します。

次に、各領域を観察して、生存腫瘍細胞数および PD-L1 陽性細胞数（腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ）の総数を推定します。各領域の Combined Positive Score (CPS) を計算します。

判定: 4 つの領域には PD-L1 陽性細胞（腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ）が約 80、30、50 および 100 個存在します。各領域には腫瘍細胞（PD-L1 陽性細胞含む）が合計 100 個存在します。各領域の CPS: 約 CPS 80、約 CPS 30、約 CPS 50、約 CPS 100



腫瘍細胞領域全体の CPS を計算します。

判定:

$$(80 + 30 + 50 + 100) / 4 \approx \text{CPS } 65$$

臨床的な判定: CPS \geq 10

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数 (腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ)}}{\text{生存腫瘍細胞の総数}} \times 100$$

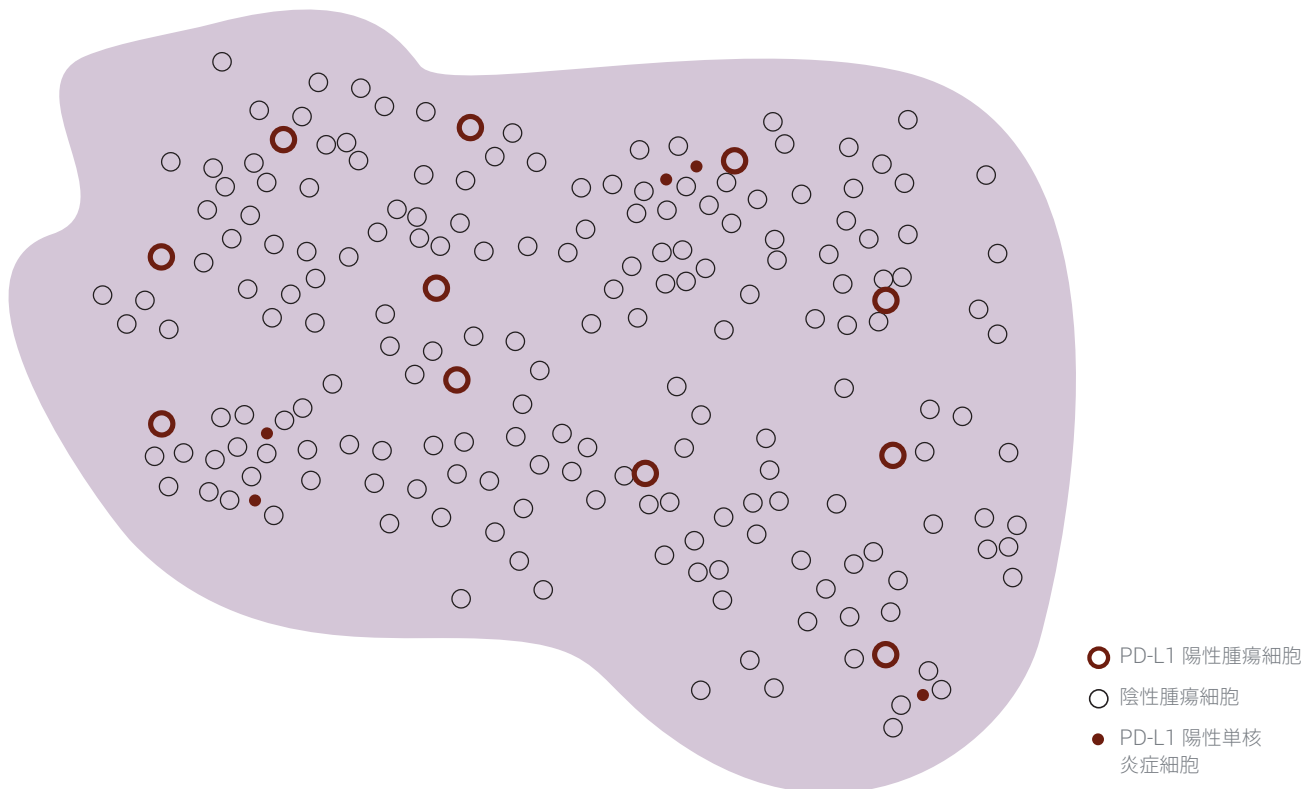
図 15: PD-L1 陽性領域が不均一な腫瘍の例：

例 3: カットオフ付近の検体の Combined Positive Score (CPS) の計算

まず、25 ページの「Combined Positive Score (CPS) の決定」の記載に従って、明瞭に染色された検体を評価します。

次に、低倍率では陰性に見えた領域に陽性所見がないことを確認します。染色領域を評価し、PD-L1 陽性細胞数（浸潤腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ）を推定します。その後、検体全体（染色領域および非染色領域）を再評価して、総腫瘍細胞数（PD-L1 陽性および陰性の腫瘍細胞）を概算します。Combined Positive Score (CPS) を計算します。

判定: 腫瘍検体には、明瞭な染色が認められます。PD-L1 陽性細胞数（腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ）が 16 個存在します。全検体中に生存腫瘍細胞が約 200 個存在します。



腫瘍細胞領域全体の CPS を計算します。

判定:

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数}^*}{\text{生存腫瘍細胞の総数}} \times 100 = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数 16 個}}{\text{腫瘍細胞数 200 個}} \times 100 = \text{CPS 8}$$

臨床的な判定: CPS < 10

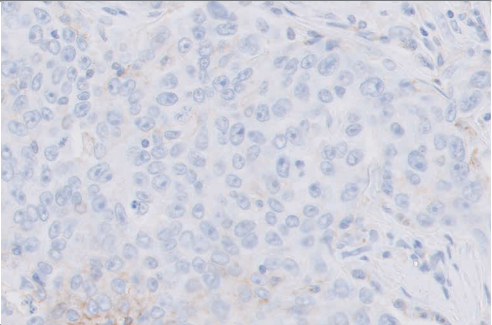
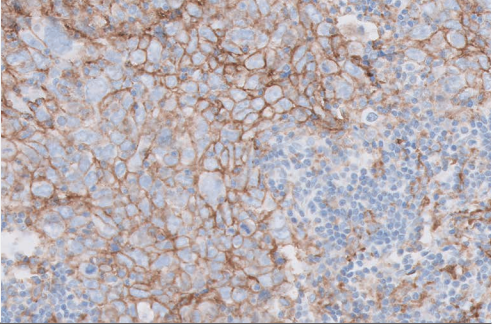
* 腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ含む

図 16: カットオフ付近の検体の例。

CPS の判定

Combined Positive Score（CPS）を用いて PD-L1 発現レベルを判定します。スコアリング判定の例は、下記の表をご覧ください。

表 3: CPS および対応する PD-L1 発現レベル

| CPS | PD-L1 発現レベル | 画像(対物レンズ 20 倍) |
|------|-------------|---|
| < 10 | CPS が 10 未満 |  |
| ≥ 10 | CPS が 10 以上 |  |

治療対象となるトリプル ネガティブ乳癌患者の選定

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」は、トリプルネガティブ乳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唯一のコンパニオン診断薬です。

トリプルネガティブ乳癌患者に対する PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」を用いた臨床試験

未治療の局所再発切除不能または転移性のトリプルネガティブ乳癌（TNBC）患者の PD-L1 発現を評価する PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の臨床的妥当性は、Merck & Co. 社によるキイトルーダの KEYNOTE-355 試験をベースとしています。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」を使用して、局所再発切除不能または転移性のトリプルネガティブ乳癌由来の検体の PD-L1 発現試験が行われました。キイトルーダの KEYNOTE-355 試験では、トリプルネガティブ乳癌登録患者の 38% に、Combined Positive Score (CPS) が 10 以上の PD-L1 発現が認められました（表 4）。パクリタキセル、nab-パクリタキセル、またはゲムシタビンとカルボプラチンと併用するキイトルーダ治療の臨床上の有効性は、85～86 ページの臨床性能評価の章で説明します。

表 4: KEYNOTE-355 試験に登録された局所再発切除不能または転移性の TNBC 患者における PD-L1 発現率

| PD-L1 発現 | CPS < 10 | CPS ≥ 10 |
|----------|-----------|-----------|
| 患者 % (n) | 62% (524) | 38% (323) |

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、CPS に基づいてどの患者がキイトルーダ治療適応となるかを確認することができます。

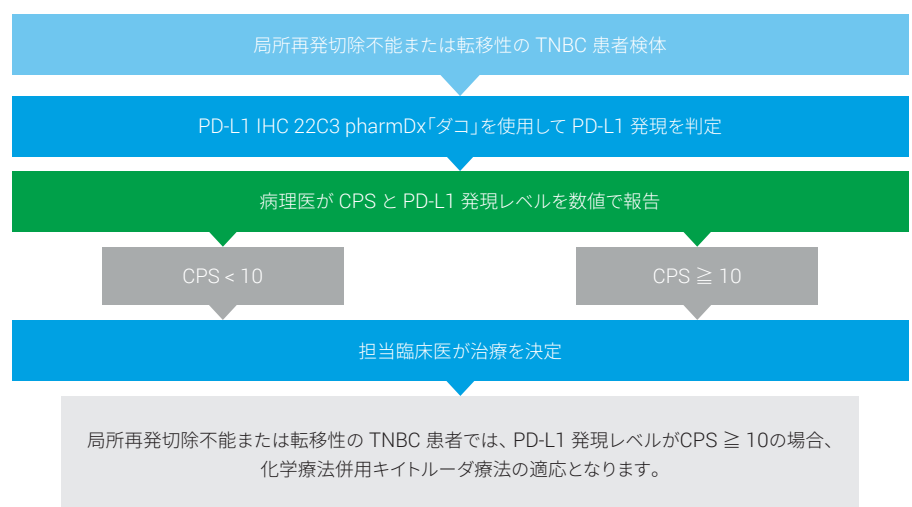


図 17: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の検査計画

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」ロット番号: _____

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: _____

PD-L1 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）: はい: ☐ いいえ: ☐

治療担当医師への結果報告

Combined Positive Score (CPS) * : _____

CPS < 10 : ☐ CPS ≥ 10: ☐

担当医へのコメント:

- ー キイトルーダ（ペムブロリズマブ）は、局所再発切除不能または転移性の TNBC 患者のうち、承認済みの検査によって PD-L1 の発現（CPS が 10 以上）が腫瘍細胞に確認された患者に化学療法との併用療法としての治療に適応されます。詳しくは、キイトルーダの処方情報を参照してください。

Combined Positive Score (CPS) の要約および症例

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

トリプルネガティブ乳癌における PD-L1 陽性細胞の定義は以下のとおりです。

- ー 細胞質染色とは区別される、明瞭な部分的または完全な細胞膜染色（強度 1+ 以上）のある腫瘍細胞
- ー 細胞膜染色または細胞質染色（強度 1+ 以上）のある、腫瘍巣や隣接する支持間質組織内のリンパ球およびマクロファージ（単核炎症細胞、MIC）。MIC は腫瘍に対する反応に直接関連していなければなりません。

トリプルネガティブ乳癌における PD-L1 発現状態は、PD-L1 抗体で染色した PD-L1 陽性細胞（腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ）の数を総生存腫瘍細胞数で割り、100 を掛けた Combined Positive Score (CPS) を用いて決定します。

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数 (腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ)}}{\text{生存腫瘍細胞の総数}} \times 100$$

この章は、Combined Positive Score (CPS) を正しく決定するためのスコアリングの組み入れおよび除外の基準を定義および説明します。子宮頸部の扁平上皮細胞癌である図 39 を除き、画像はすべて TNBC のものです。

トリプルネガティブ乳癌症例の さまざまな染色像とその解釈

Combined Positive Score (CPS) に含まれる PD-L1 陽性細胞

適切な PD-L1 発現を示す腫瘍細胞、リンパ球、およびマクロファージを、PD-L1 陽性細胞と定義します。PD-L1 陽性細胞はすべて CPS の分子に含めて Combined Positive Score (CPS) (その他の CPS 組み入れ/除外基準については、26 ページの表 1 および 2 を参照) を算出します。腫瘍細胞はすべて分母に組み入れます。CPS の分子に含めなければならない PD-L1 陽性細胞の共通の染色特性を以下に示します。図に別途説明のない限り、画像はすべて TNBC です。

腫瘍細胞

細胞膜染色

明らかな部分的または完全な膜染色や顆粒状の細胞膜染色を示す腫瘍細胞は PD-L1 陽性細胞と考えられます。細胞膜染色は染色強度を問わず存在し、対物レンズ 20 倍まででははっきりと認識できなければなりません。

明らかな細胞膜染色を示す腫瘍細胞には多くの場合不均一で、種々の染色強度が存在します。

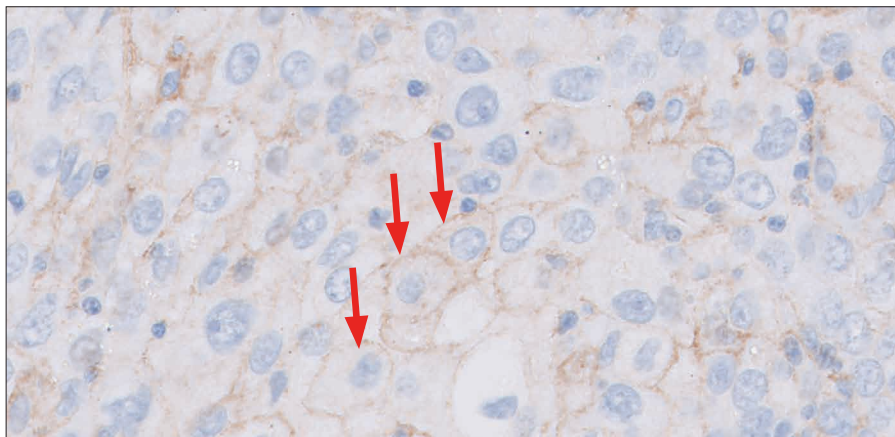


図 18a: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体 (対物レンズ 20 倍)。強度 1+ の細胞膜染色を呈する腫瘍細胞が認められます (矢印)。

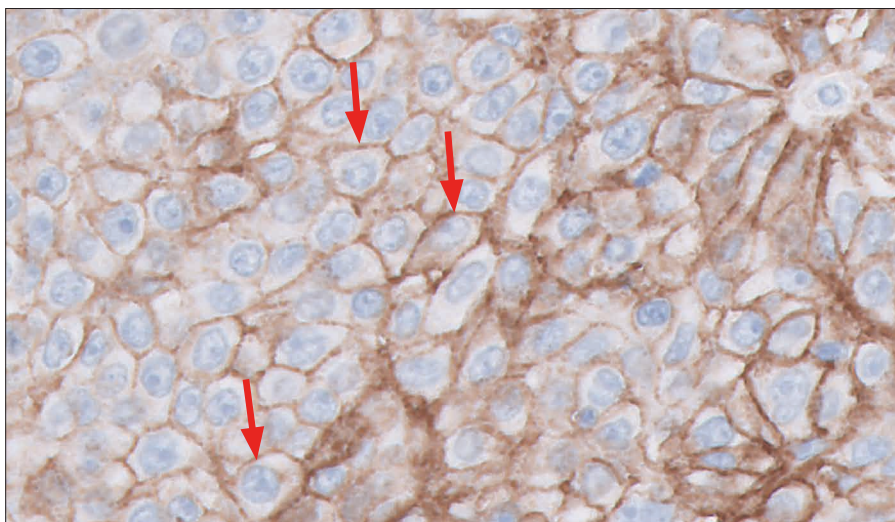


図 18b: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。強度 2+ の細胞膜染色を呈する腫瘍細胞が認められます（矢印）。

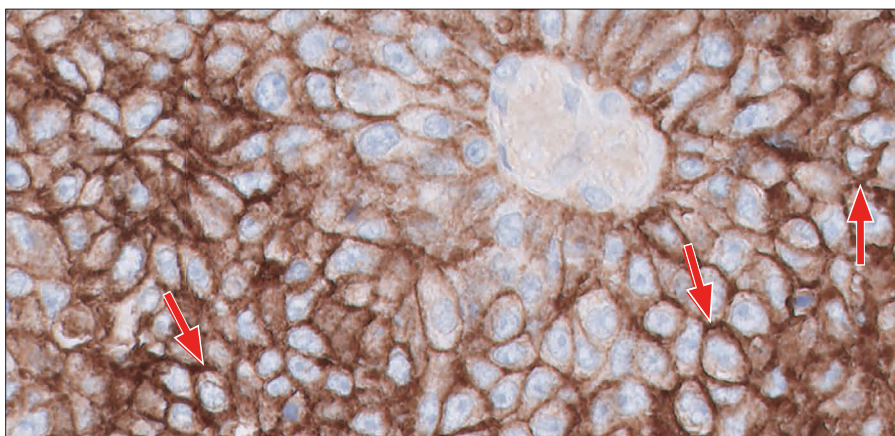


図 18c: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。強度 3+ の細胞膜染色を呈する腫瘍細胞が認められます（矢印）。

重要なポイント

強度 1+ 以上の明らかな細胞膜染色を呈する腫瘍細胞は CPS の分子に含めます。

部分的な細胞膜染色

腫瘍細胞は部分的な細胞膜染色を示す場合があります。対物レンズ 20 倍で観察される強度 1+ 以上の部分的な細胞膜染色は CPS の分子に含めます。

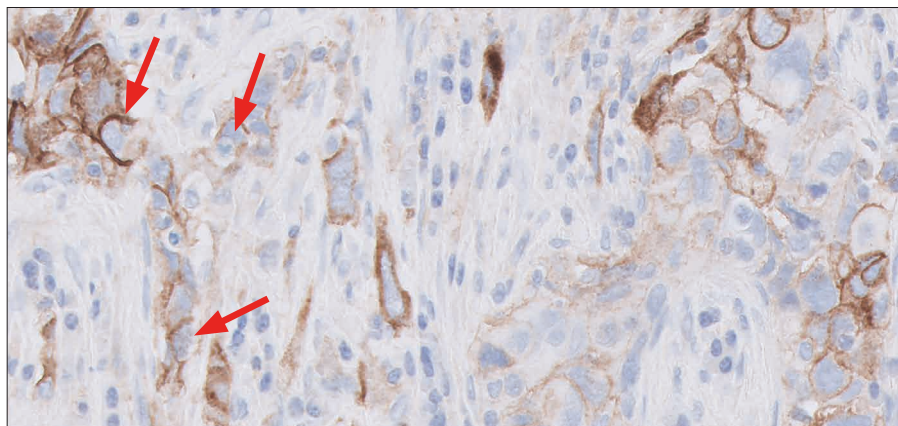


図 19: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。部分的な細胞膜染色を呈する腫瘍細胞が認められます（矢印）。

重要なポイント

明らかに部分的な細胞膜染色を呈する腫瘍細胞は CPS の分子に含めます。

細胞膜染色および細胞質染色

対物レンズ 20 倍で、明らかな細胞膜染色（強度 1+ 以上）および細胞質染色の両方を示す腫瘍細胞は CPS の分子に含めます。細胞質染色のみを示す腫瘍細胞は、非特異的染色と考えられるため、CPS の分子から除外します。さらに、腫瘍細胞は、顆粒状の PD-L1 細胞膜染色を呈することがあります。部分的または完全な細胞膜染色が細胞質染色とは異なる場合、その細胞は CPS の分子に含めます。

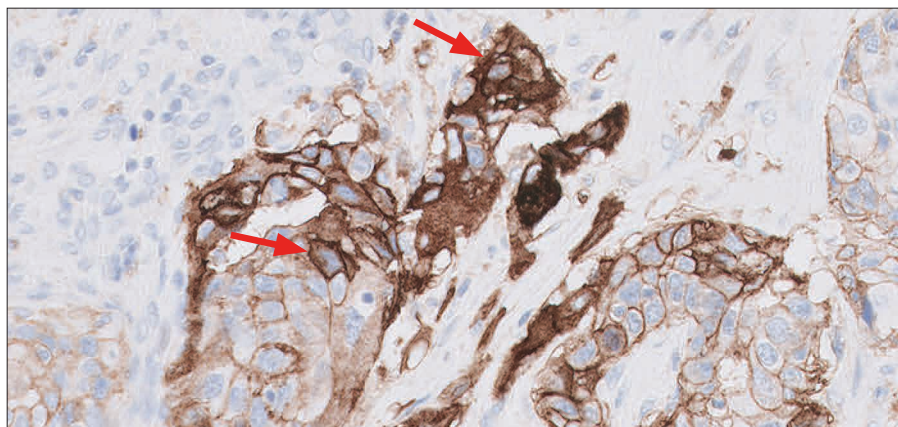


図 20a: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。腫瘍細胞に細胞質染色とは区別される細胞膜染色が認められます（矢印）。

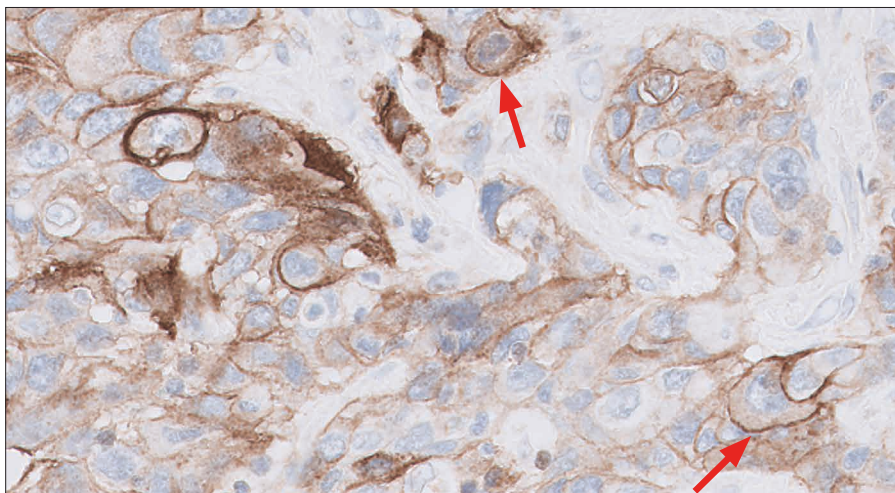


図 20b: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。腫瘍細胞に細胞質染色とは区別される細胞膜染色が認められます（矢印）。

重要なポイント

細胞質染色とは異なる明らかに細胞膜染色を示す腫瘍細胞は CPS の分子に含めます。

顆粒状の染色

腫瘍細胞は、細胞膜染色と細胞質染色が区別できない顆粒状の細胞膜染色パターンを示す場合があります。対物レンズ 20 倍以下で明らかに細胞膜染色と判定できる腫瘍細胞（強度 1+ 以上）のみを CPS の分子に含めます。

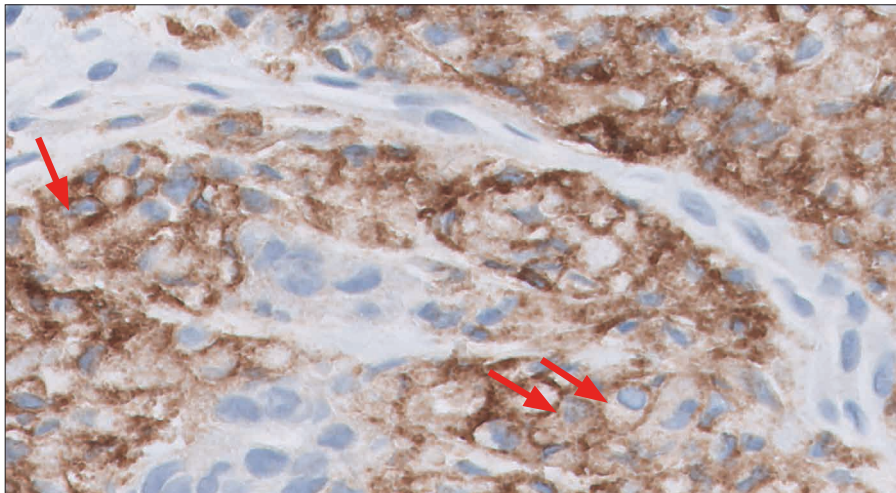


図 21a: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。顆粒状の細胞膜染色を呈する腫瘍細胞が認められます（矢印）。

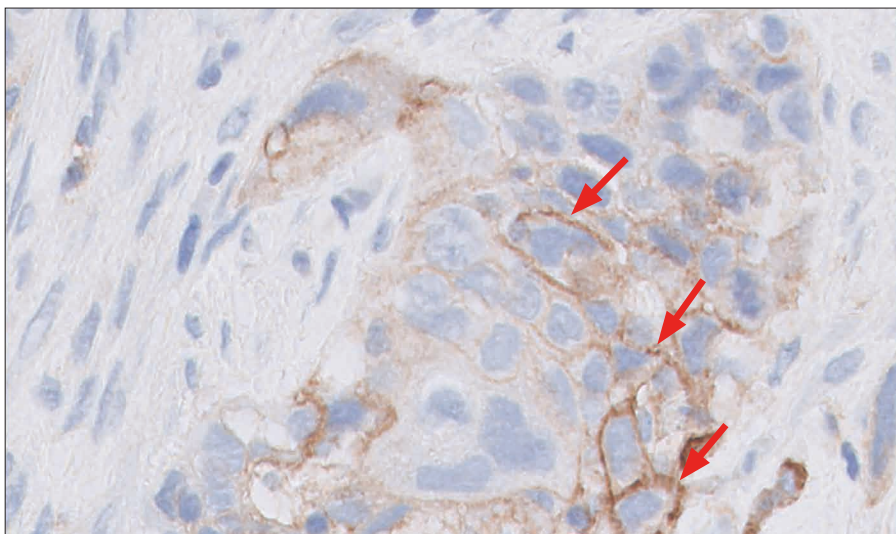


図 21b: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。顆粒状の細胞膜染色を呈する腫瘍細胞が認められます（矢印）。

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 CPS の分子に含めます。

多核腫瘍細胞

TNBC の一部の腫瘍細胞は多核性の場合があり、多核腫瘍細胞はそれぞれ 1 細胞として数えます。分子と分母への組み入れには同じ規則を適用します。すなわち、生存腫瘍細胞はすべて分母に組み入れ、部分的または完全な細胞膜染色を示す腫瘍細胞はすべて分子に組み入れます。

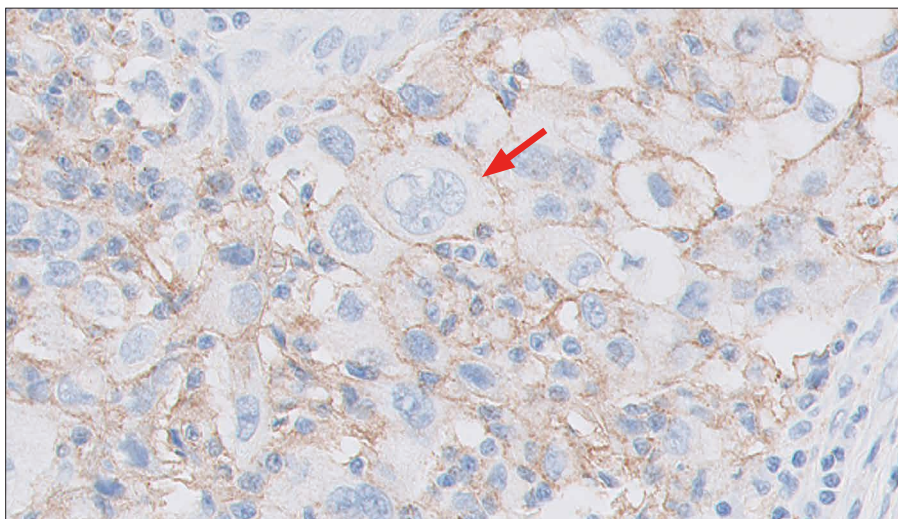


図 22: 多核腫瘍細胞 (矢印) (対物レンズ 20 倍)

重要なポイント

多核腫瘍細胞は TNBC に見られ、単核腫瘍細胞と同じ組み入れ/除外基準を適用することができます。

免疫細胞

腫瘍関連単核炎症細胞 (MIC)

対物レンズ 20 倍（強度 1+ 以上）で細胞膜染色または細胞質染色を示す、腫瘍関連リンパ球およびマクロファージ（単核炎症細胞、MIC）は、PD-L1 陽性細胞と考えられるため CPS の分子に含めます。腫瘍関連 MIC は腫瘍巣や隣接する支持間質細胞内に存在し、腫瘍に対する反応に直接関連があります。

腫瘍関連リンパ球およびマクロファージ（細胞膜または細胞質）の染色は、多くの場合不均一で染色強度はさまざまです。

注意事項: PD-L1 発現リンパ球は、細胞質に対する細胞核の比率が高いために細胞膜染色と細胞質染色が区別できないことが多くあります。PD-L1 発現マクロファージでは多くの場合、明確な細胞膜染色と弱い細胞質染色が認められます。PD-L1 陽性の腫瘍関連 MIC はすべて、CPS の分子に含めます。

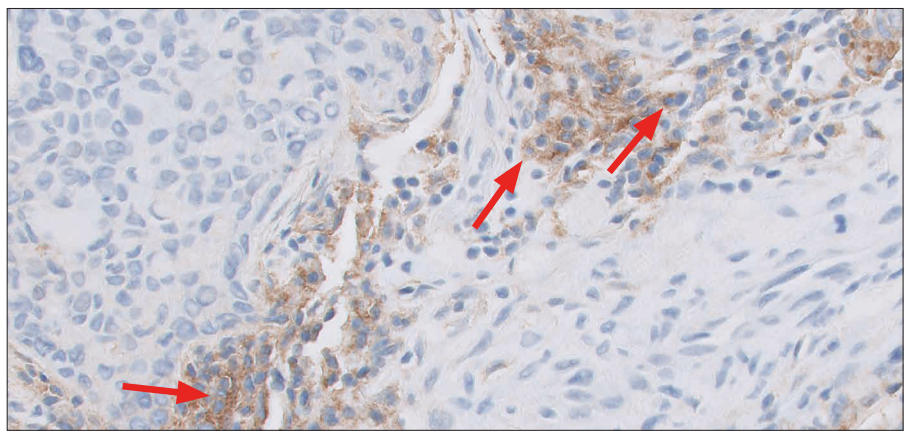


図 23a: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。腫瘍関連リンパ球の染色が認められます（矢印）。

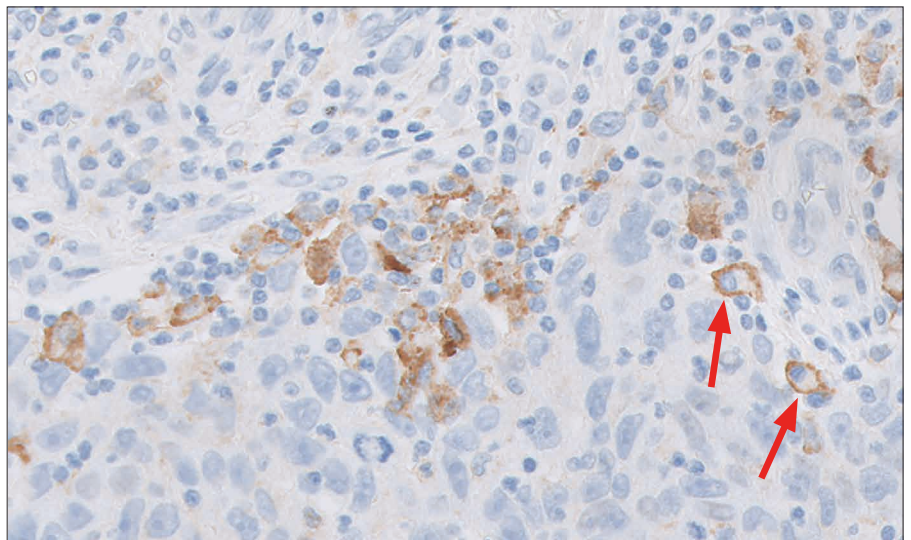


図 23b: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。腫瘍関連マクロファージの染色が認められます（矢印）。

多核巨細胞

TNBC では多核巨細胞が見られるため、こうした細胞に PD-L1 染色が見られる場合、多核巨細胞はそれぞれ 1 細胞として数えて分子に含めます。

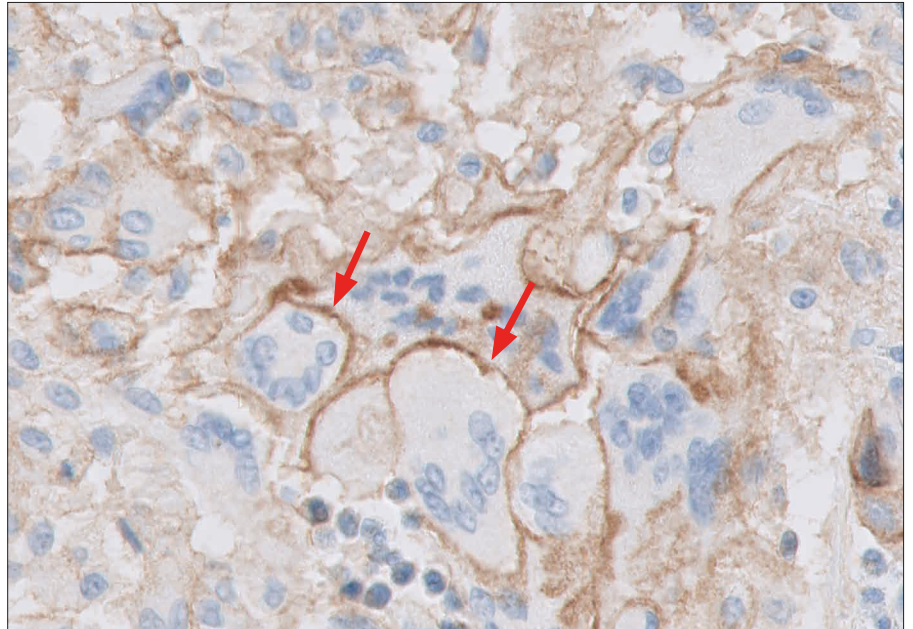


図 24: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。多核巨細胞の染色が認められます（矢印）。

重要なポイント

細胞膜染色または細胞質染色を示す腫瘍関連リンパ球およびマクロファージは CPS の分子に含めます。

判別不能な腫瘍細胞および免疫細胞

腫瘍細胞、腫瘍関連リンパ球およびマクロファージについて、PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色したスライドで観察する際、腫瘍のサイズが小さい場合や染色の特徴から、判別できない場合があります。細胞形態を判別するため、対応する HE スライドの使用が推奨されます。HE スライドの使用は、分母を判定する際に、きわめて重要です。

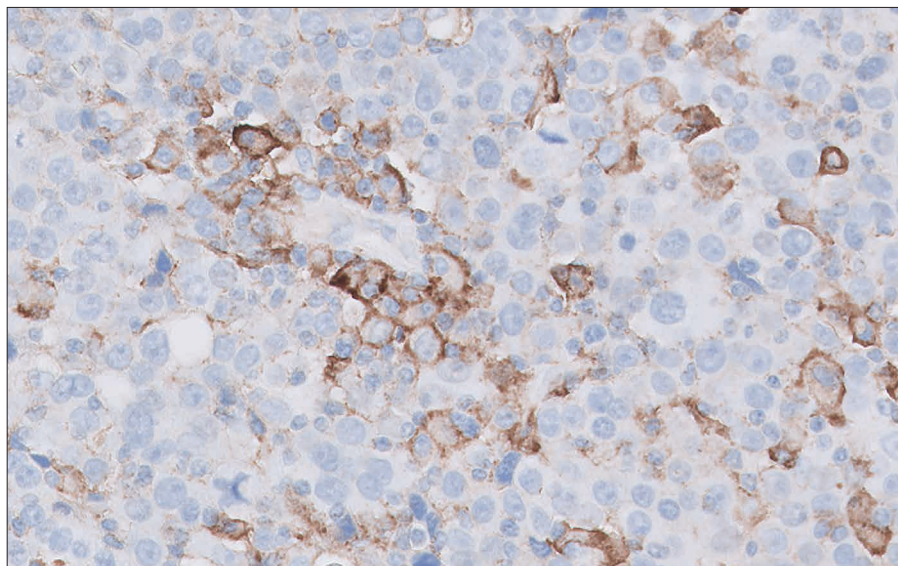


図 25a: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体による染色を示す腫瘍細胞と腫瘍関連単核炎症細胞 (MIC) の判別が不能 (20 倍 対物レンズ)。

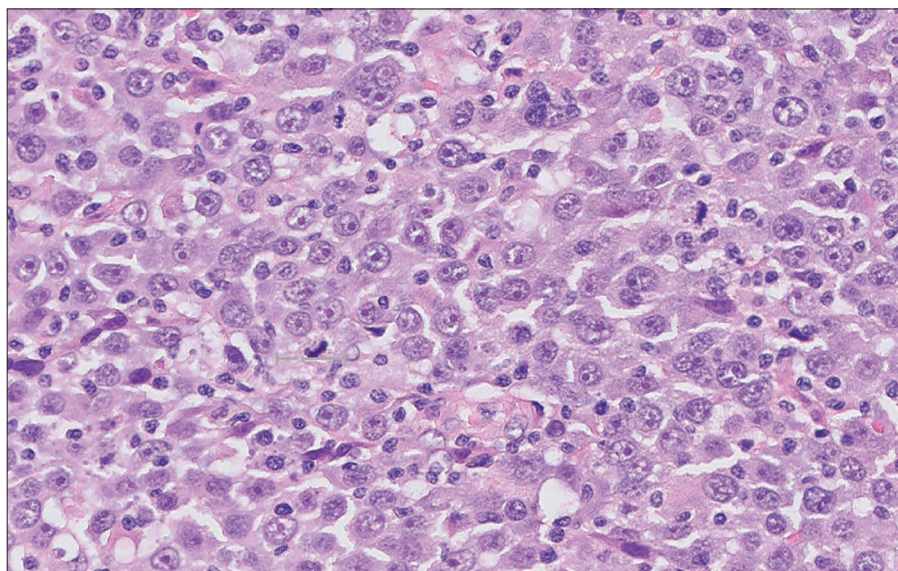


図 25b: 腫瘍細胞と腫瘍関連単核炎症細胞 (MIC) の判別が難しい場合に参照用の対応する HE スライド (対物レンズ 20 倍)。

重要なポイント

免疫細胞と腫瘍細胞との判別が難しい場合には、HE スライドを使用してください。

免疫細胞の組み入れ/除外: 20 倍ルール

PD-L1 発現単核炎症細胞 (MIC) を CPS の分子に含めるには、腫瘍に対する反応に直接関連していなければなりません。MIC が対物レンズ 20 倍視野内の腫瘍巣や隣接した支持間接細胞内にある場合には、腫瘍に関連すると考えられます。MIC の腫瘍関連性の判別が困難な場合、推奨するガイドラインを以下に示します。

スライドを移動して、腫瘍が 20 倍視野のほぼ中心にくるようにします。この視野での腫瘍の周囲の免疫細胞をスコアリングに含めます。この視野外の免疫細胞は、腫瘍細胞の周囲にない限り、スコアリングから除外します。概して、PD-L1 陽性を示す MIC のうち、腫瘍細胞から 0.5 mm 以内にあるものは分子に含めます。このルールは、リンパ節内の腫瘍のうち、PD-L1 染色された MIC を含む腫瘍にも適用することができます。CPS の分子に含める MIC の判定例については、図 26a ～ 26c を参照してください。

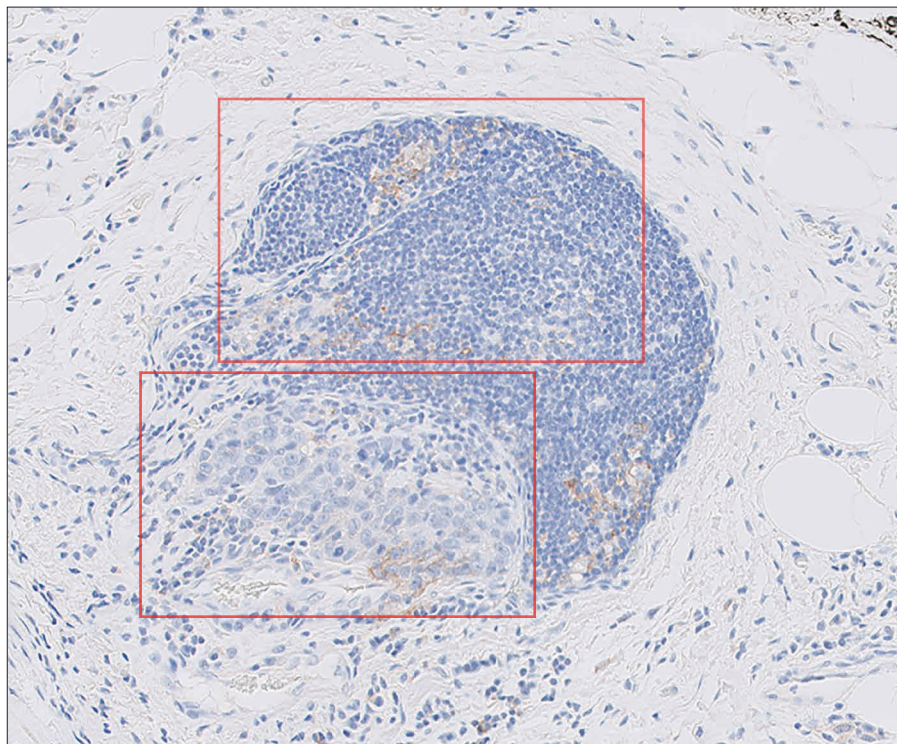


図 26a: 10 倍の対物レンズでは、PD-L1 染色を示す単核炎症細胞の 2 領域が目視可能です。
分子に含める免疫細胞を判定するには、箱枠で囲った部分を 20 倍に拡大します (10 倍対物レンズ)。

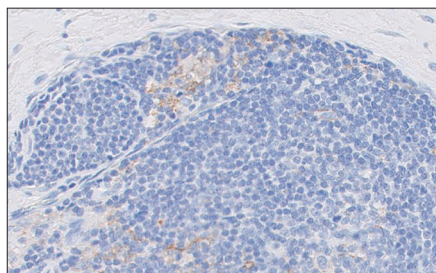


図 26b: PD-L1 染色を示す単核炎症細胞を含む
この 20 倍視野には腫瘍細胞がないため、これらの
細胞はいずれも分子には含めません (対物レンズ
20 倍)。

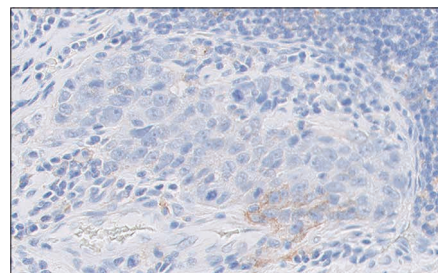


図 26c: 腫瘍細胞を 20 倍視野のほぼ中心に配置した
とき、PD-L1 発現を示す単核炎症細胞のうち、同一視
野内に存在するものを分子に含めます (対物レンズ
20 倍)。

腫瘍細胞のサイズ

TNBC には、さまざまな形態および腫瘍細胞のサイズが含まれ、分母となる総腫瘍細胞数を過大または過小評価することで、Combined Positive Score (CPS) に影響を与えることがあります。高分化型扁平上皮癌では、細胞質が豊富なサイズの大きな腫瘍細胞が認められる場合があり、一般に 20 倍視野での細胞数は少ないですが、低分化型の類基底のパターンでは、腫瘍細胞のサイズが小さく細胞質が少ないため、一般に 20 倍視野での腫瘍細胞数は多くなります。分母に含まれる腫瘍細胞数が多くなると、全体スコアを CPS 10 以上にあげるために必要な分子の PD-L1 陽性腫瘍細胞、リンパ球、およびマクロファージの数が増えます。ガイドラインとして、直径 20 μm の腫瘍細胞が 20 倍の視野全体に広がる場合、その視野中に腫瘍細胞がおおよそ 2500 個存在すると考えられます。

小さな腫瘍細胞

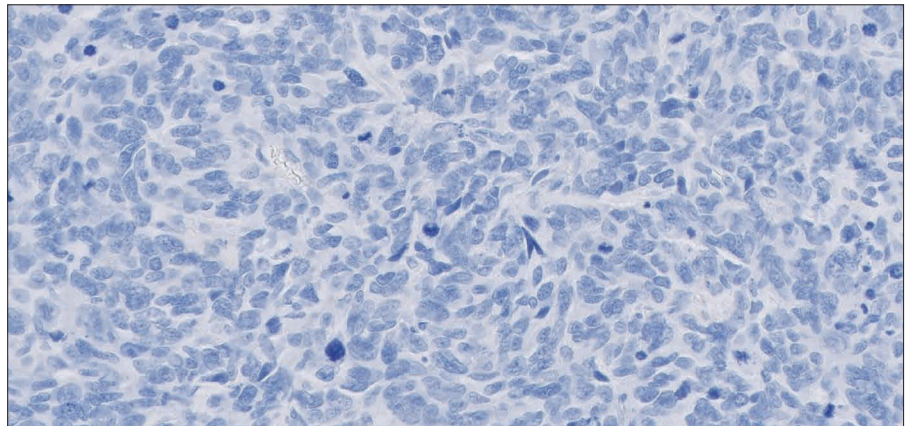


図 27: 小さな腫瘍細胞を含む TNBC 検体 (対物レンズ 20 倍)

中等度の腫瘍細胞

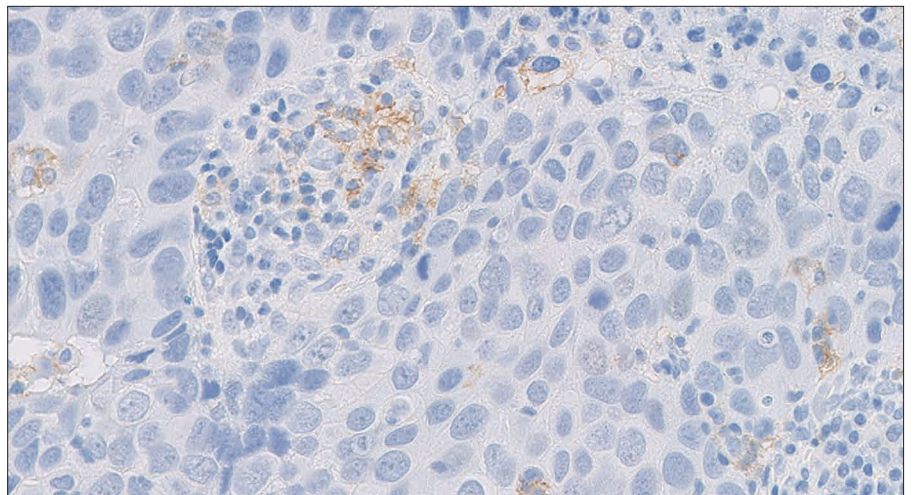


図 28: 中等度の腫瘍細胞を含む TNBC 検体 (対物レンズ 20 倍)

大きな腫瘍細胞

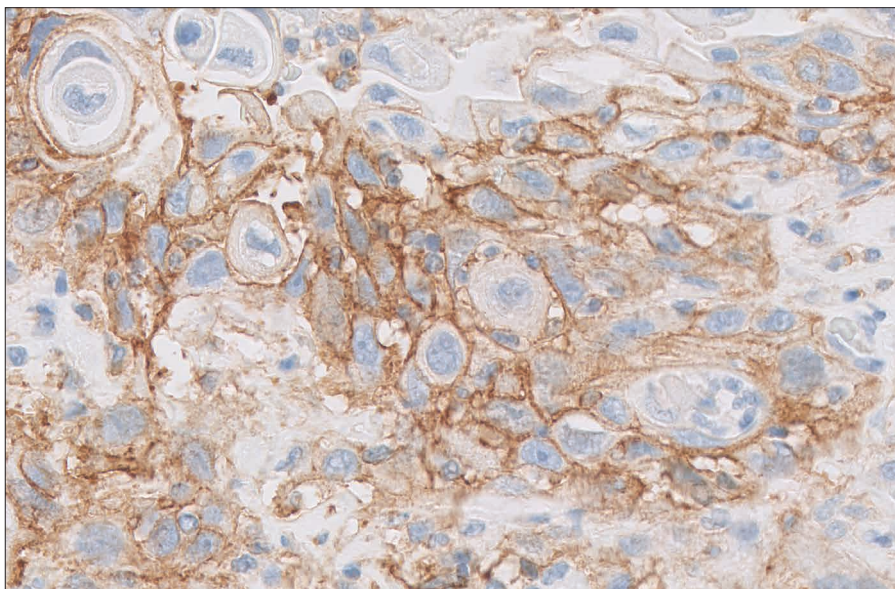


図 29: 大きな腫瘍細胞を含む TNBC 検体 (対物レンズ 20 倍)

重要なポイント

腫瘍細胞のサイズによって、分母中の総腫瘍細胞数が増加または減少し、CPS に影響が生じます。

CPS から除外される細胞

PD-L1 細胞膜染色を示す腫瘍細胞および PD-L1 細胞膜染色または細胞質染色を示す MIC のみを CPS の分子に含めます。PD-L1 染色を示すものの、CPS 計算（CPS の分子および分母）からは除外される細胞を以下に示します。

注意事項: 最も多く認められる除外要素を表す画像を以下に示します。そのため、除外対象の画像すべてがこのマニュアルに掲載されているわけではありません。全除外基準については、26 ページの表 1 および 2 を参照してください。

細胞質染色のみの腫瘍細胞

細胞質染色のみを示す腫瘍細胞は CPS の分子から除外します。ただし、CPS の分母には含めます。

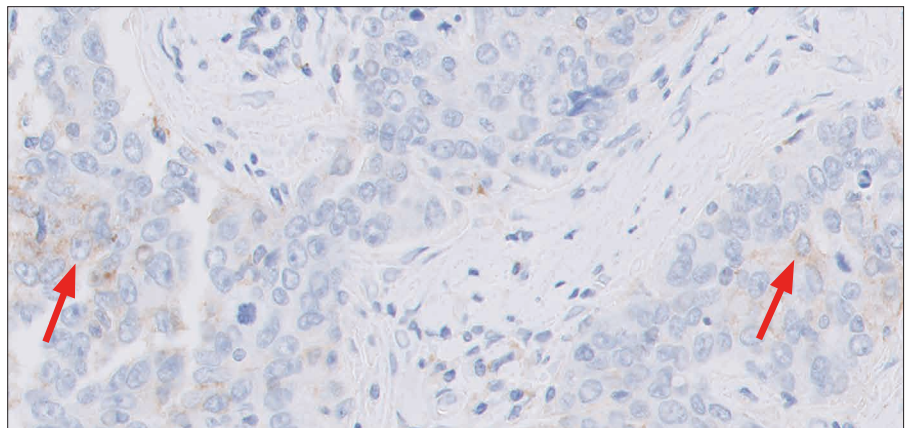


図 30: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。細胞質染色のみを呈する腫瘍細胞が認められます（矢印）。

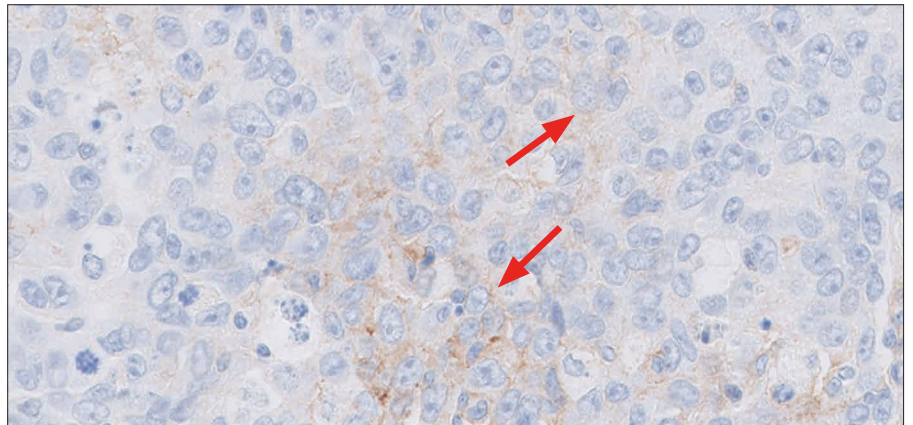


図 31: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。細胞質染色のみを呈する腫瘍細胞が認められます（矢印）。

重要なポイント

細胞質染色のみを示す腫瘍細胞は CPS の分子に含めません。

上皮内癌（CIS）

上皮内癌（非浸潤性乳管癌（DCIS）および非浸潤性小葉癌（LCIS））が TNBC で認められることがあり、分子および分母の両方から除外する必要があります。CIS 構成に関連するPD-L1 染色を呈する単核炎症細胞（MIC）も分子から除外します。

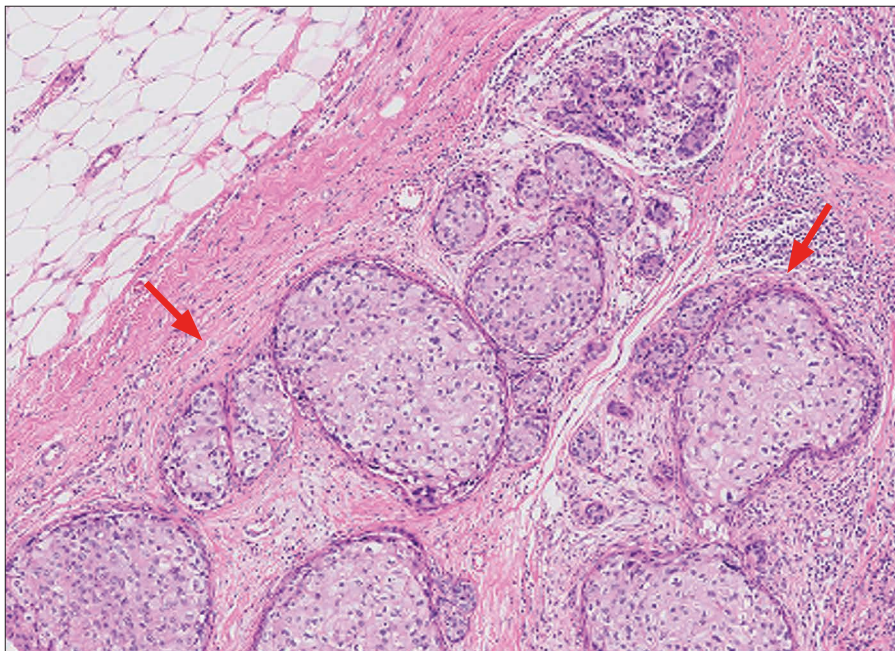


図 32a: 非浸潤性乳管癌 (DCIS) を示す HE 切片 (矢印) (対物レンズ 2 倍)。

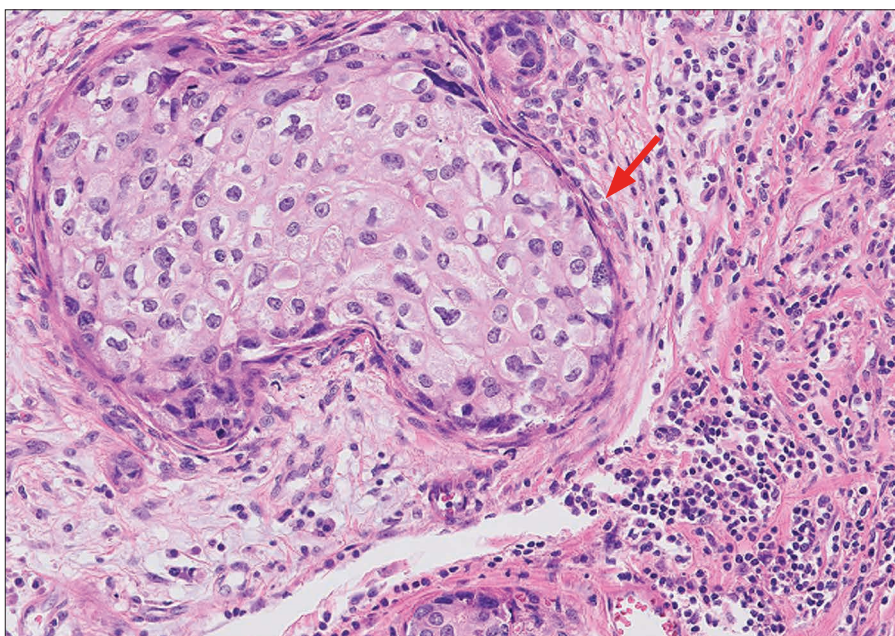


図 32b: 非浸潤性乳管癌 (DCIS) を示す HE 切片 (矢印) (対物レンズ 20 倍)

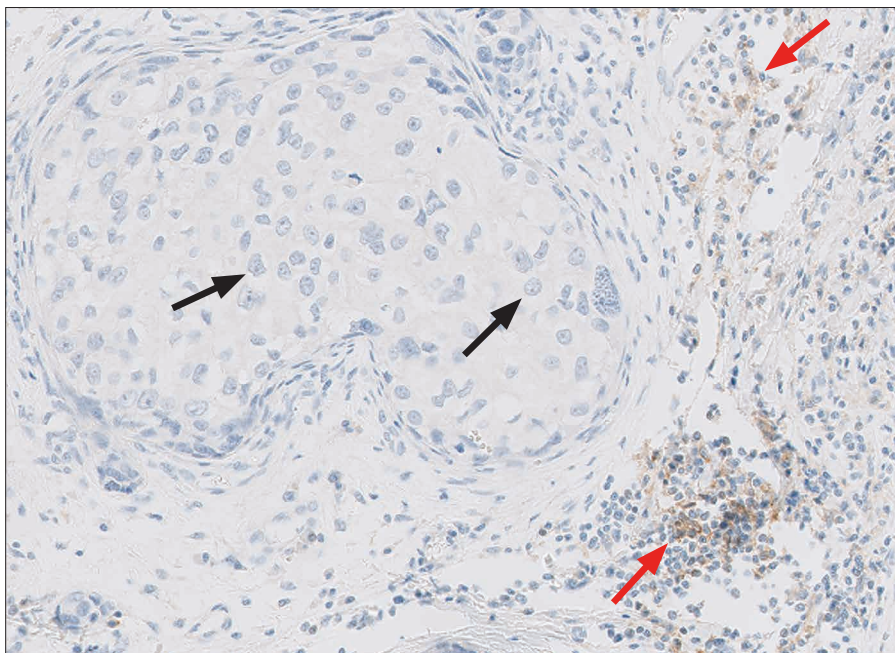


図 33: CIS 成分である腫瘍細胞（黒矢印）は、分子および分母から除外します。
DCIS に関連する単核炎症細胞（MIC）（赤矢印）も分子から除外します（対物レンズ 20 倍）。

重要なポイント

腫瘍細胞や MIC が CIS 構成に関連している場合はスコアリングから除外します。

間質細胞

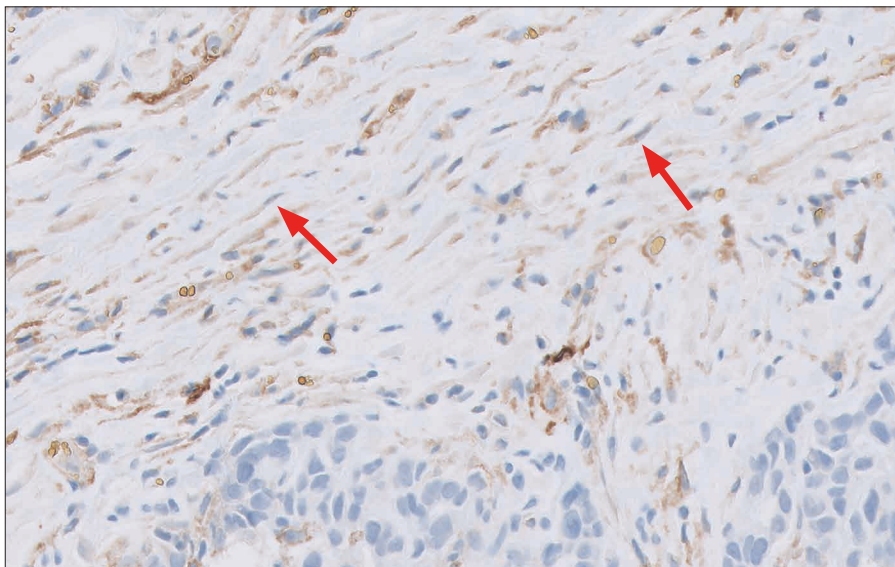


図 34: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した間質細胞 (矢印) (対物レンズ 20 倍)。

重要なポイント

PD-L1 染色を示す間質細胞はスコアリングから除外します。

CPS から除外されるその他の免疫細胞

さまざまな種類の免疫細胞が PD-L1 陽性を示す可能性がありますが、CPS 計算に含めるのは腫瘍関連リンパ球およびマクロファージのみです。免疫細胞の組み入れ/除外の 20 倍ルールに関しては、43 ページを参照してください。PD-L1 染色を示す好中球、好酸球、および形質細胞はスコアリングから除外します。

良性細胞

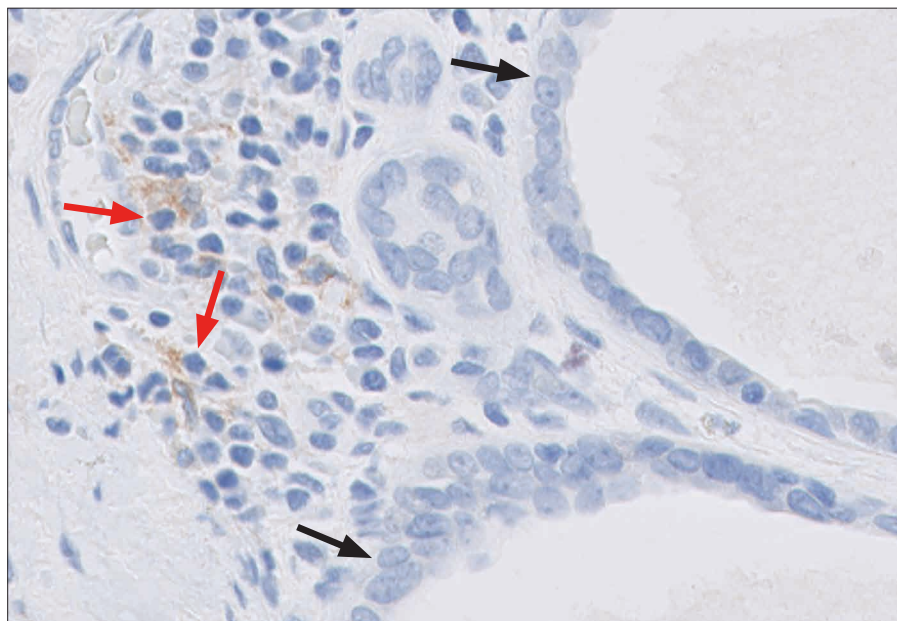


図 35: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体。
良性腺腫（黒矢印）および良性病変に関連する単核炎症細胞（MIC）（赤矢印）の染色が認められます（対物レンズ 20 倍）。

重要なポイント

良性細胞および 良性病変に関連する MIC は PD-L1 発現を示すことがありますが、スコアリングからは除外します。

好中球

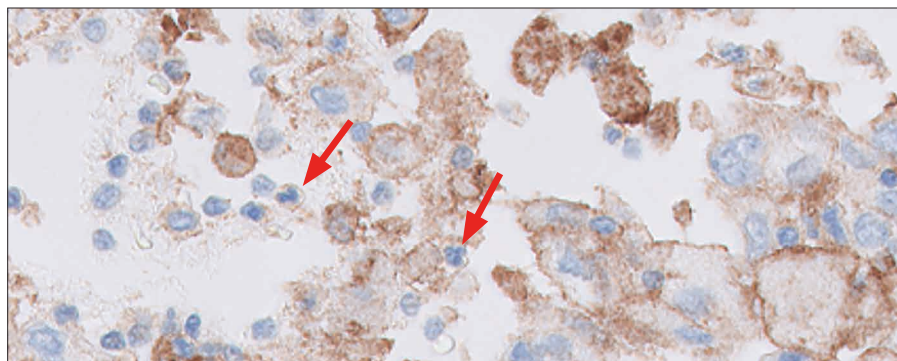


図 36: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した好中球（対物レンズ 20 倍）。

形質細胞

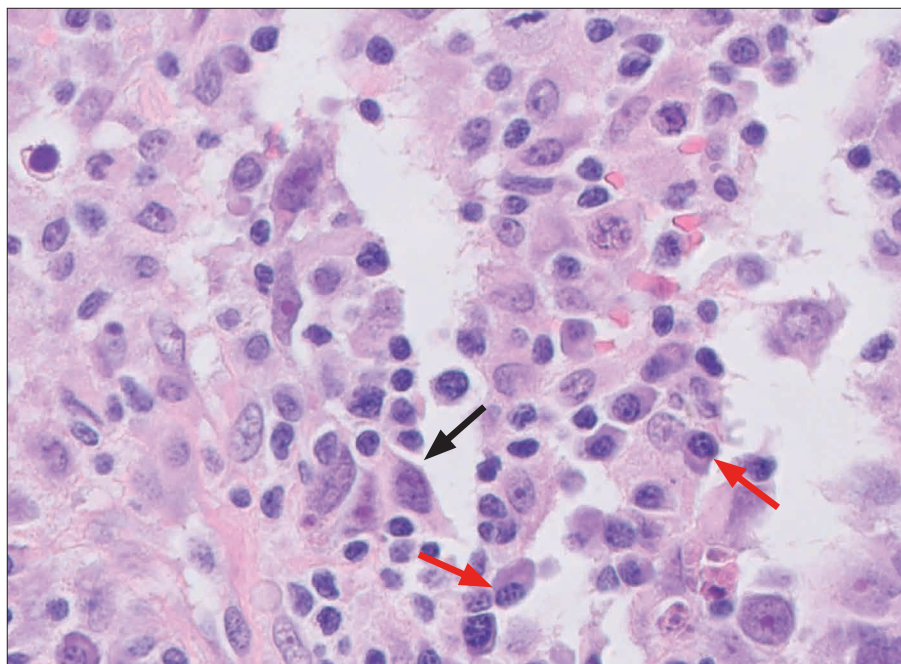


図 37a: HE 染色した TNBC 検体 (対物レンズ 20 倍)。腫瘍細胞 (黒矢印) と形質細胞 (赤矢印) が認められます。

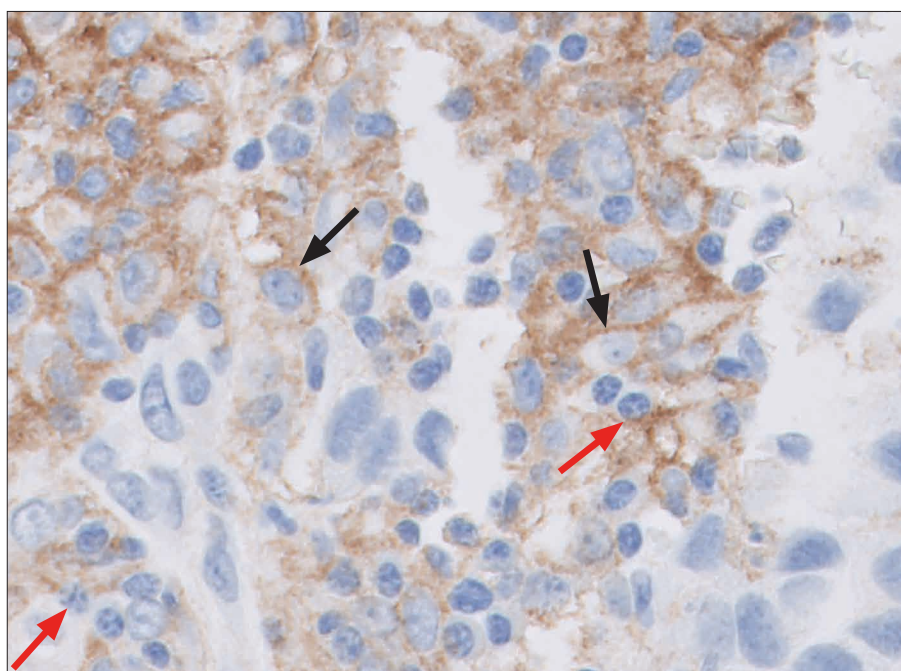


図 37b: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体 (対物レンズ 20 倍)。腫瘍細胞 (黒矢印) と形質細胞 (赤矢印) の両方の染色が認められます。

重要なポイント

PD-L1 陽性の好中球、好酸球、および形質細胞はスコアリングから除外します。

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
- － 染色中の不十分なスライド洗浄
- － スライドの乾燥。Autostainer Link 48 にスライドを乗せる時、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。
- － 脱パラフィン不良
- － スライドの洗浄不良

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、PD-L1 抗体で染色した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。

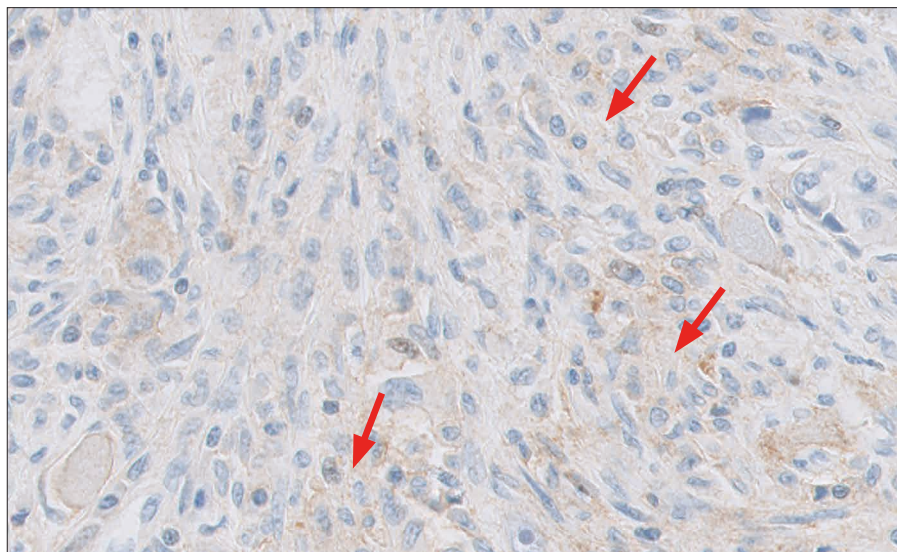


図 38a: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色された、非特異的染色を示す TNBC 検体（矢印）。非特異的バックグラウンド染色を示す細胞はスコアリングから除外します。（対物レンズ 20 倍）

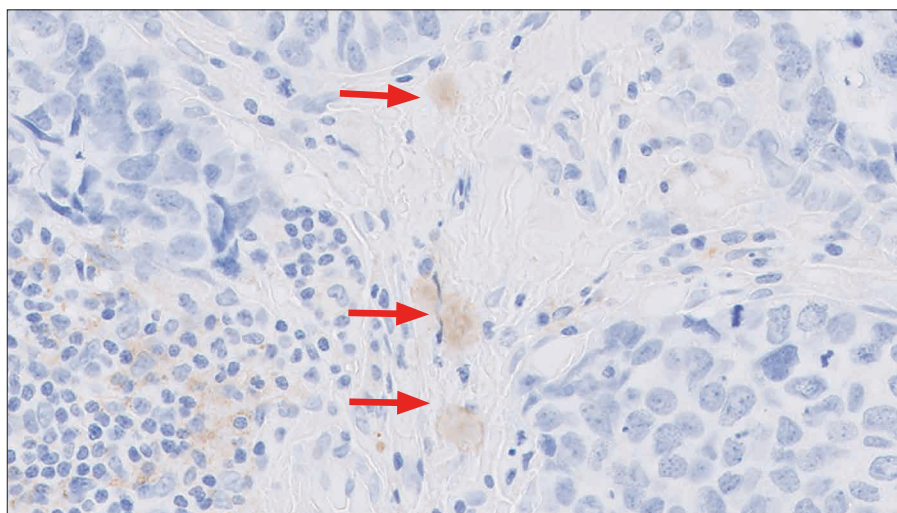


図 38b: 非特異的バックグラウンド染色を示す一次抗体陰性コントロール（NCR）で染色した TNBC 検体（矢印）（対物レンズ 20 倍）。

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。この場合、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。

注意事項: エッジアーチファクトが存在することがありますが、他の IHC 染色ほど一般には見られません。

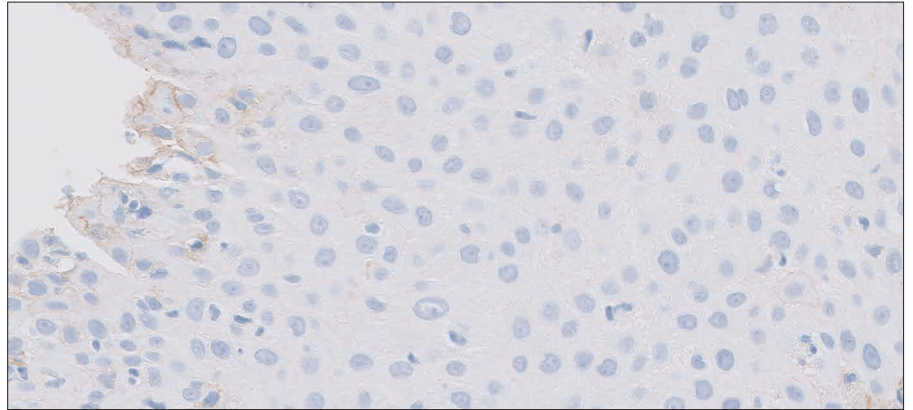


図 39: エッジアーチファクトはスコアリング（対物レンズ 20 倍）から除外します。

注意事項: 子宮頸部の扁平上皮細胞癌が示されています。

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

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。

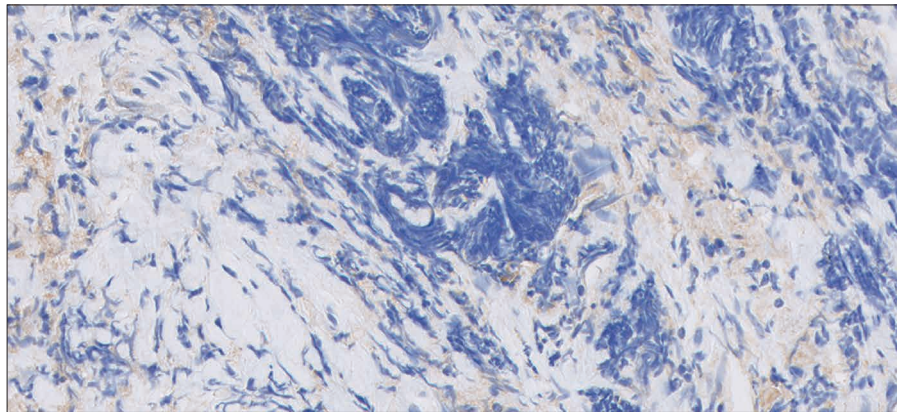


図 40: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色された、クラッシュアーチファクトを示す TNBC 検体。クラッシュアーチファクトはスコアリングから除外します（対物レンズ 20 倍）。

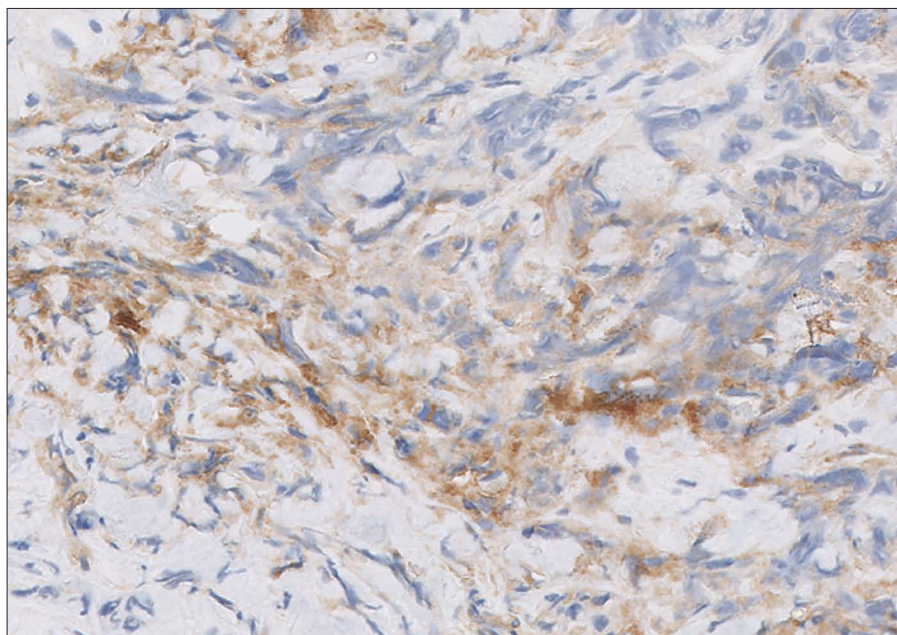


図 41: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色された、クラッシュアーチファクトを示す TNBC 検体。クラッシュアーチファクトはスコアリングから除外します（対物レンズ 20 倍）。

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。

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。

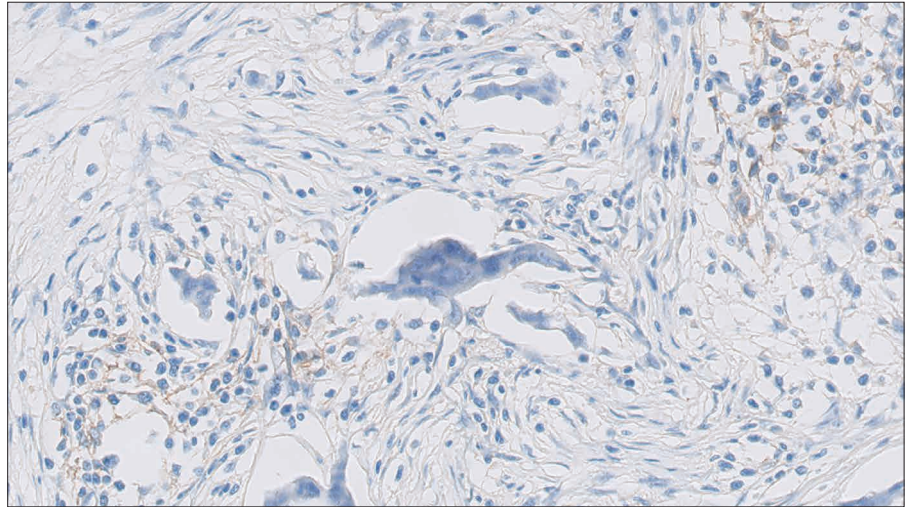


図 42: 組織固定が不十分な TNBC 検体 (対物レンズ 20 倍)

重要なポイント

PD-L1 の正確な評価には、適切な組織固定法が重要です。

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。PD-L1 抗体で染色された壊死領域は TNBC 検体に高頻度に認められますが、スコアリングから除外します。

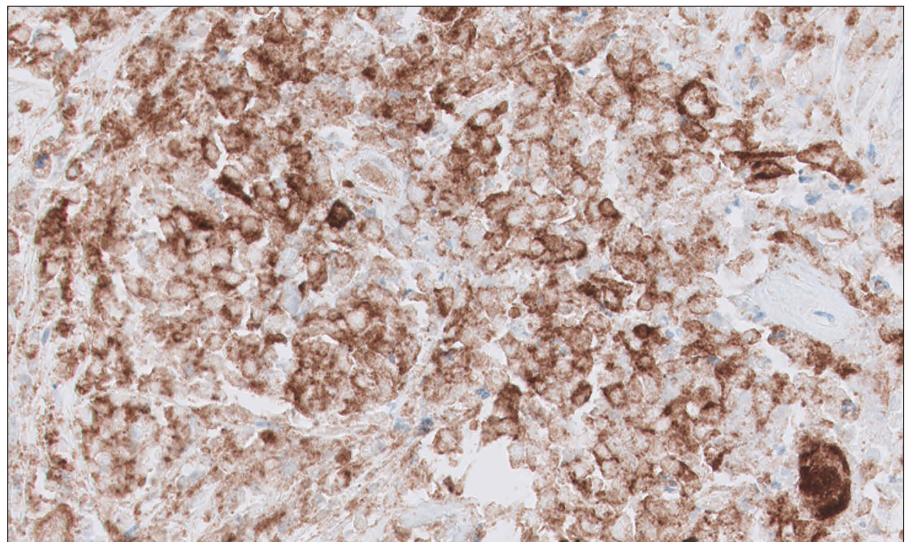


図 43: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、壊死領域に反応が見られる TNBC 検体。壊死部の反応はスコアリングから除外します (対物レンズ 20 倍)。

重要なポイント

壊死領域は CPS の計算から除外します。

ヘモシデリン

ヘモシデリン色素が TNBC 組織に認められることがあり、この色素はよく黄金色を呈し、DAB 染色と混同される場合があります。ヘモシデリン色素は無視し、スコアリングからも除外します。一次抗体陰性コントロールスライドを使用することで、ヘモシデリン色素と DAB 染色を区別するのに有用です。

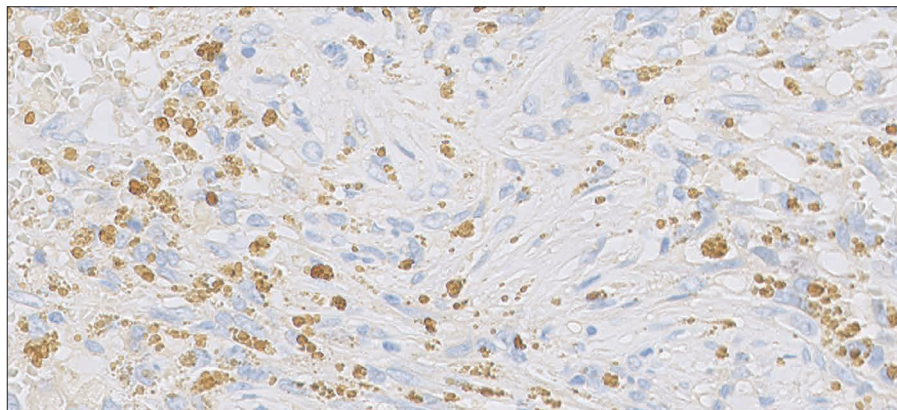


図 44: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。ヘモシデリン色素の染色が認められます。

重要なポイント

PD-L1 染色を示すヘモシデリンは CPS の計算から除外します。

核染色

検体を PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した後に細胞核が染色されている場合、その染色はアーチファクトと判断します。染色強度が 1 以下であれば、スコアリングから除外します。核染色強度が 1 を超える場合、PD-L1 染色スライドは評価不可能とし、コントロールスライドを再評価し、この検査を無効とみなすかどうかを決定します。

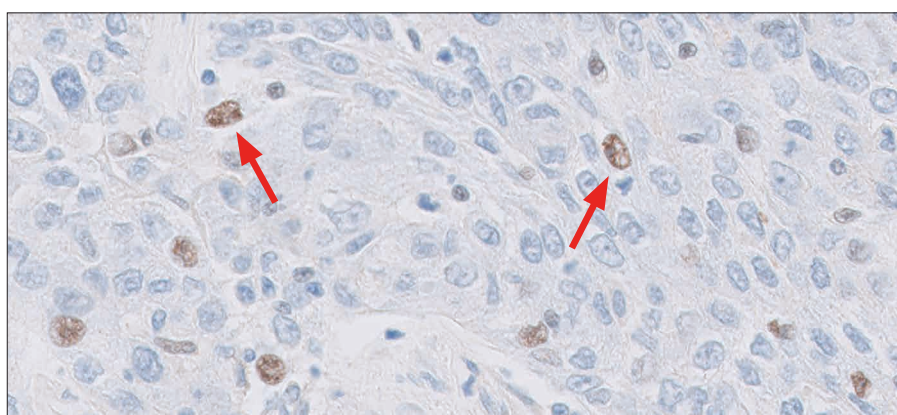


図 45: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した TNBC 検体（対物レンズ 20 倍）。染色強度が1を超える核染色が認められます（矢印）。

重要なポイント

核染色が認められる場合、染色強度は 1 以下でなければならず、CPS の計算から除外します。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の CPS の症例

CPS < 10 の症例

症例 1: CPS < 10

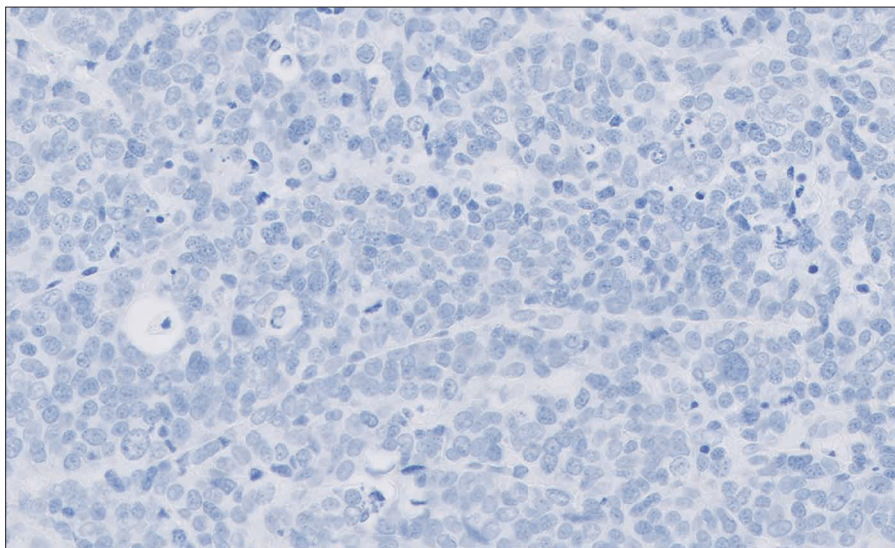


図 46: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 0 を示す TNBC 検体 (対物レンズ 20 倍)。

症例 2: CPS < 10

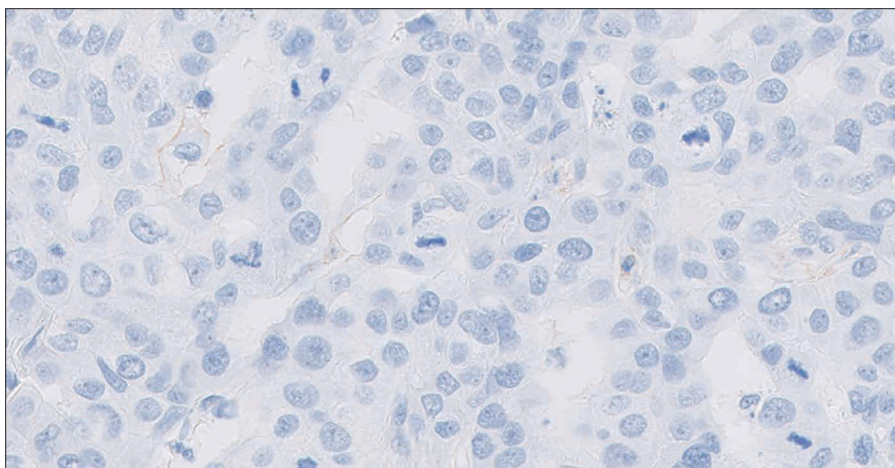


図 47: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 0 を示す TNBC 検体 (対物レンズ 20 倍)。

症例 3: CPS < 10

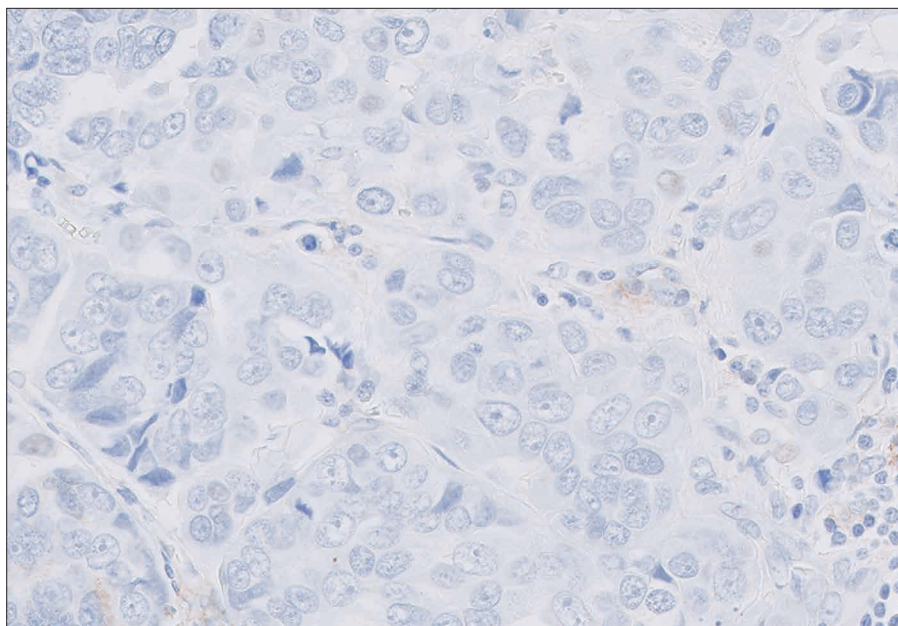


図 48: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 1 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 1 ～ 2 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

症例 4: CPS < 10

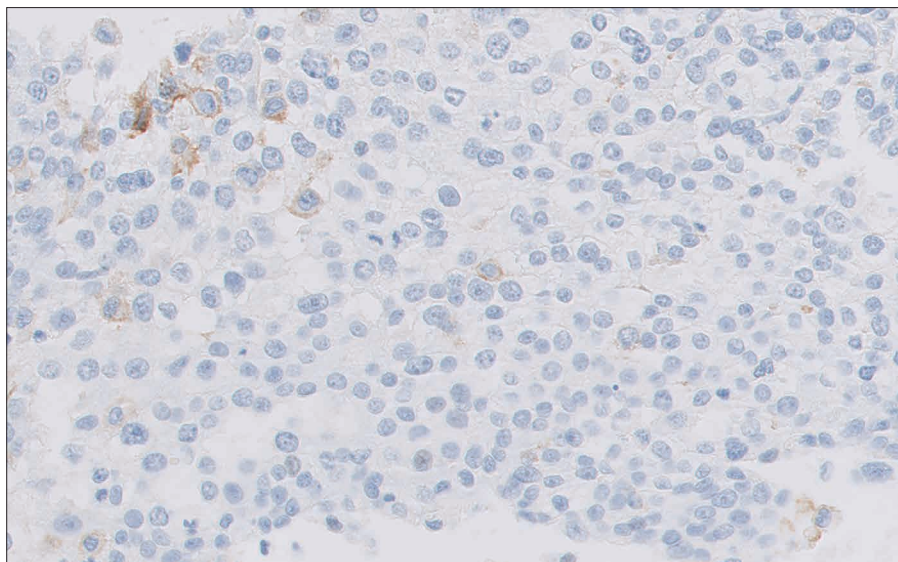


図 49: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 2 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 1 ～ 3 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

症例 5: CPS < 10

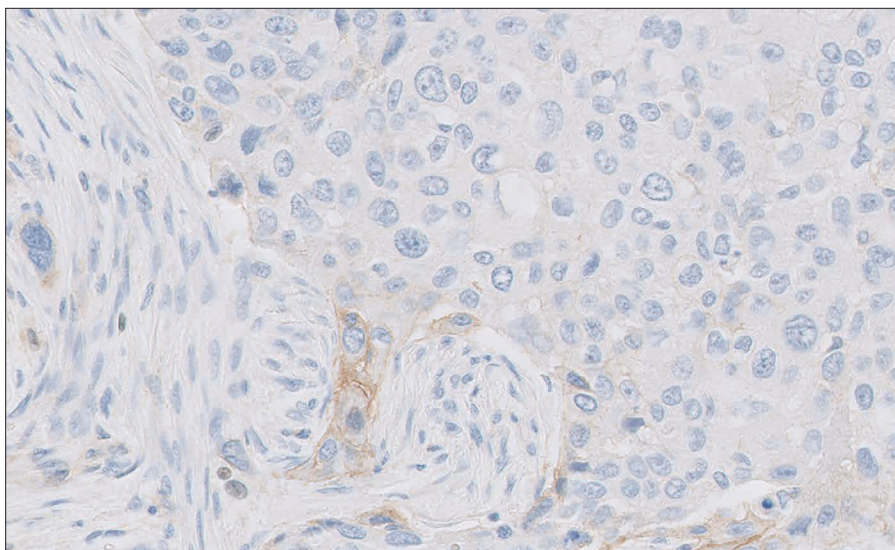


図 50: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 3 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 2 ～ 4 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

カットオフ付近の症例 (CPS 5 ～ 15)

症例 1: カットオフ付近の症例 (CPS 5 ～ 15)

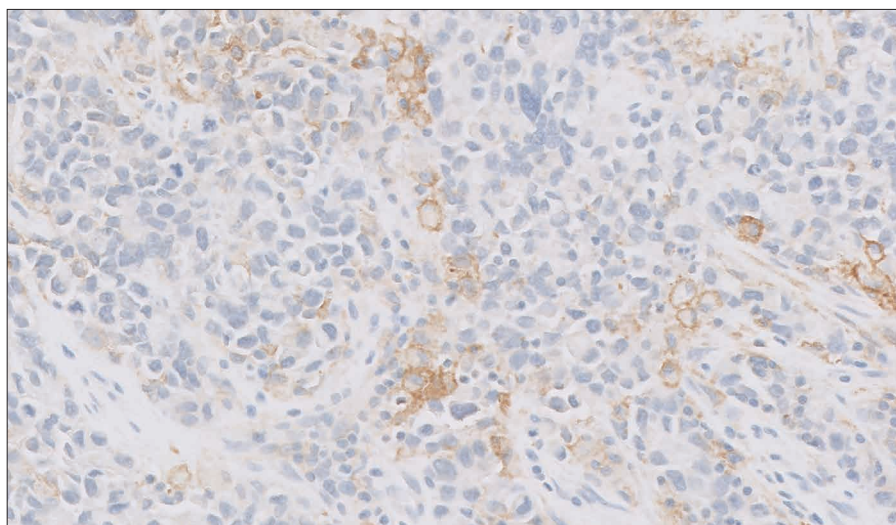


図 51: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 5 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 3 ～ 7 が割り当てられる可能性があります (対物レンズ 20 倍)。

症例 2: カットオフ付近の症例 (CPS 5 ～ 15)

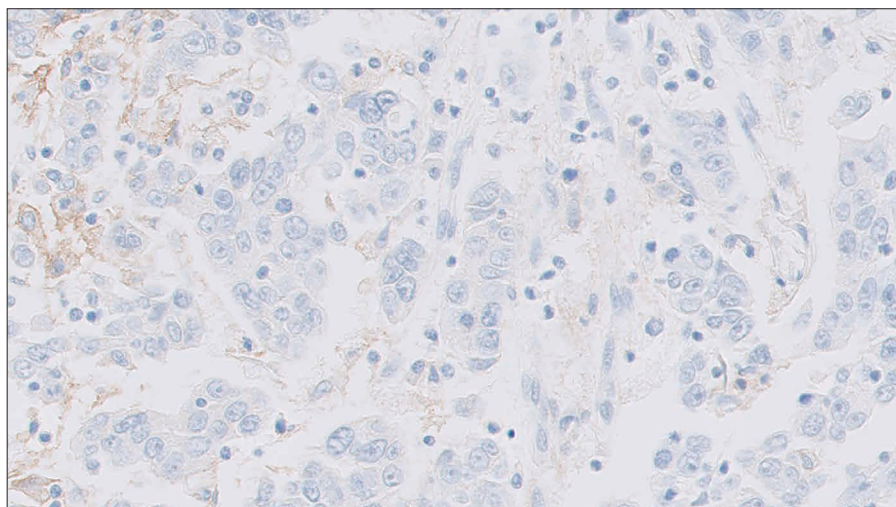


図 52: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 5 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 3 ～ 7 が割り当てられる可能性があります (対物レンズ 20 倍)。

症例 3: カットオフ付近の症例 (CPS 5 ~ 15)

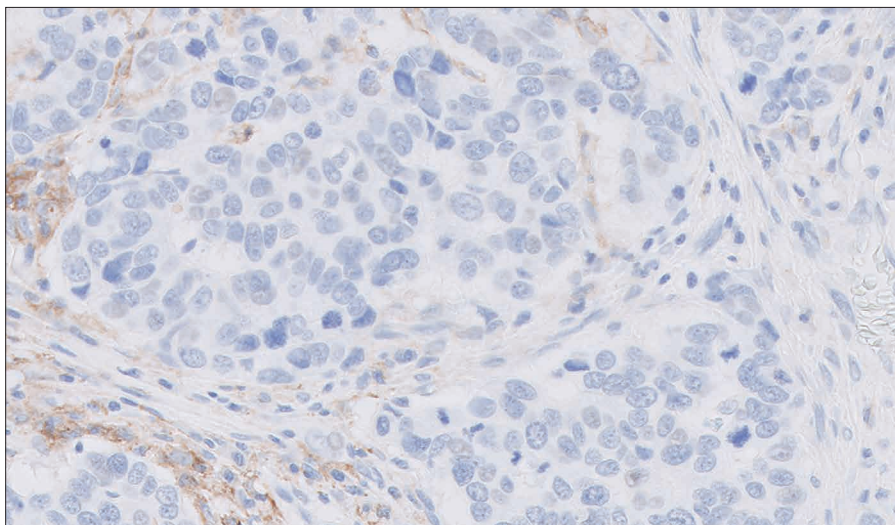


図 53: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 6 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 4 ~ 8 が割り当てられる可能性があります (対物レンズ 20 倍)。

症例 4: カットオフ付近の症例 (CPS 5 ~ 15)

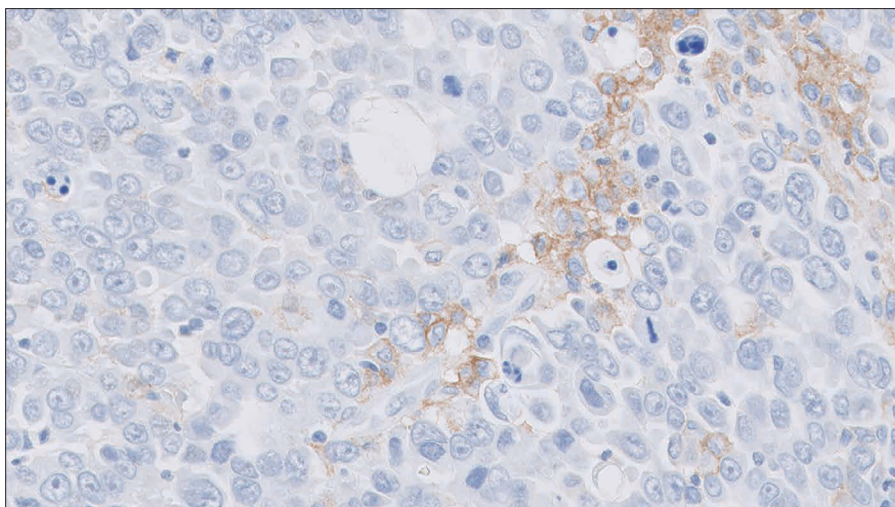


図 54: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 6 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 4 ~ 8 が割り当てられる可能性があります (対物レンズ 20 倍)。

症例 5: カットオフ付近の症例 (CPS 5 ~ 15)

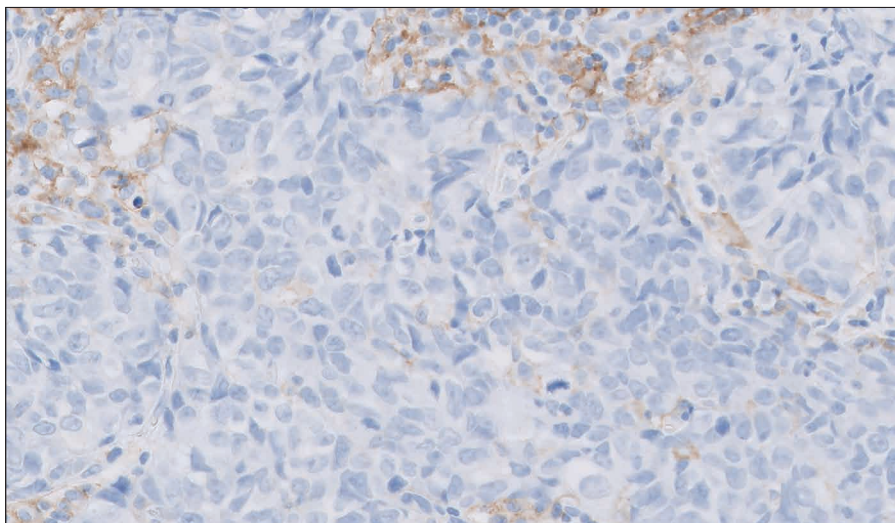


図 55: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 7 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 5 ~ 9 が割り当てられる可能性があります (対物レンズ 20 倍)。

症例 6: カットオフ付近の症例 (CPS 5 ~ 15)

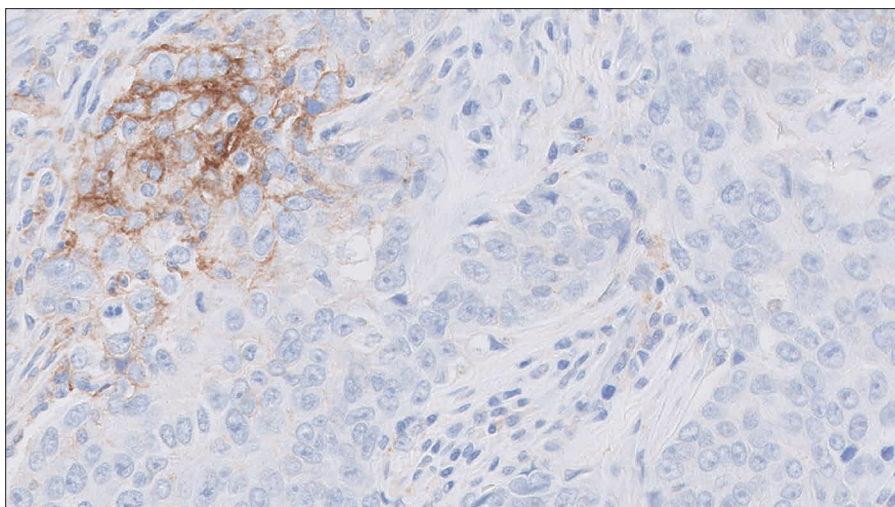


図 56: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 8 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 6 ~ 9 が割り当てられる可能性があります (対物レンズ 20 倍)。

症例 7: カットオフ付近の症例 (CPS 5 ~ 15)

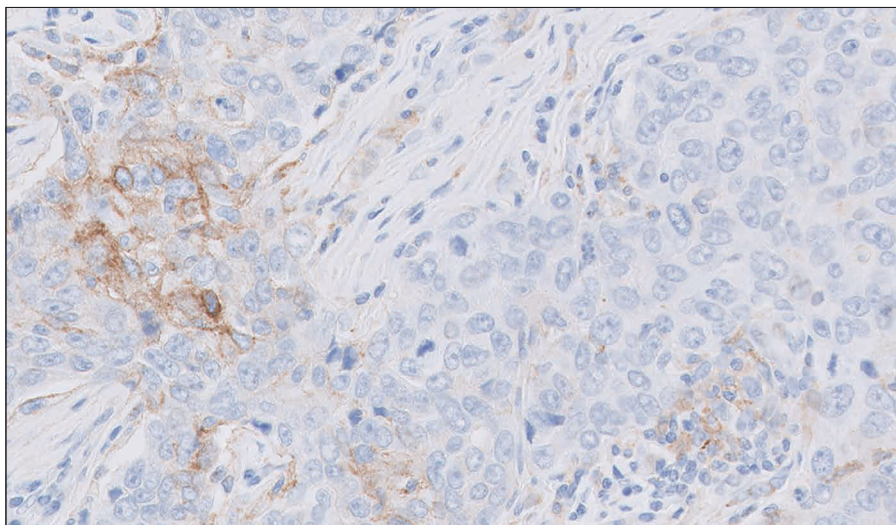


図 57: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 8 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 6 ~ 9 が割り当てられる可能性があります (対物レンズ 20 倍)。

症例 8: カットオフ付近の症例 (CPS 5 ~ 15)

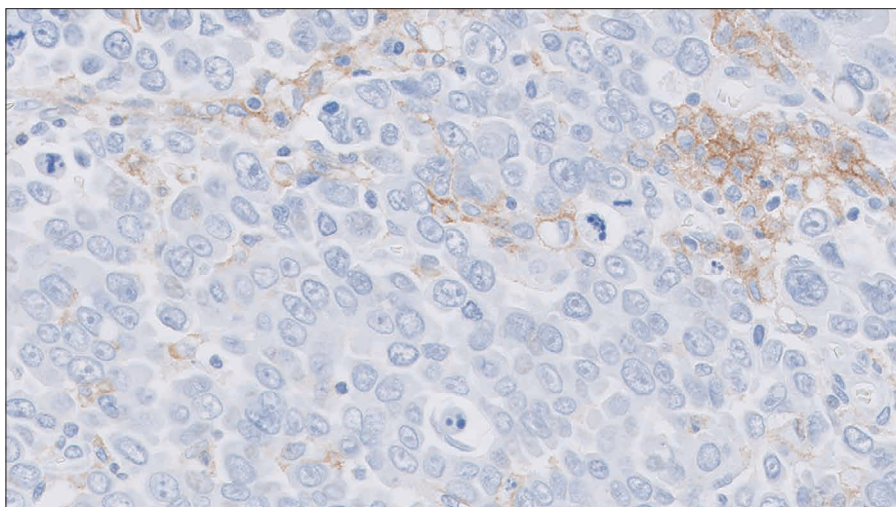


図 58: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 8 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 6 ~ 9 が割り当てられる可能性があります (対物レンズ 20 倍)。

症例 9: カットオフ付近の症例（CPS 5 ～ 15）

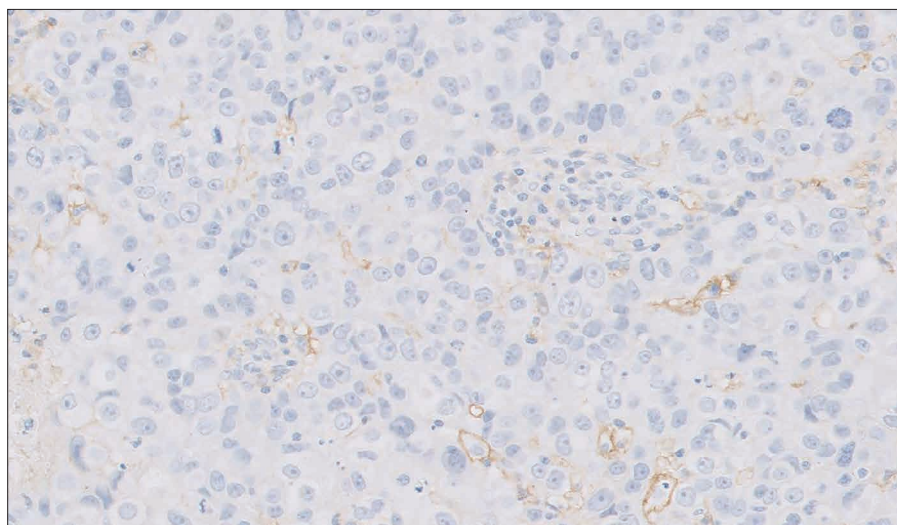


図 59: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 11 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 10 ～ 13 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

症例 10: カットオフ付近の症例（CPS 5 ～ 15）

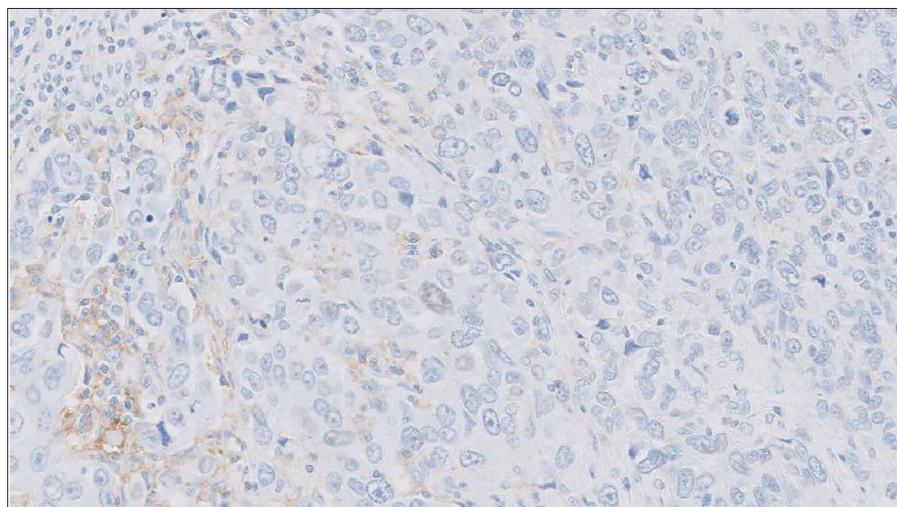


図 60: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 12 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 10 ～ 14 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

症例 11: カットオフ付近の症例（CPS 5 ～ 15）

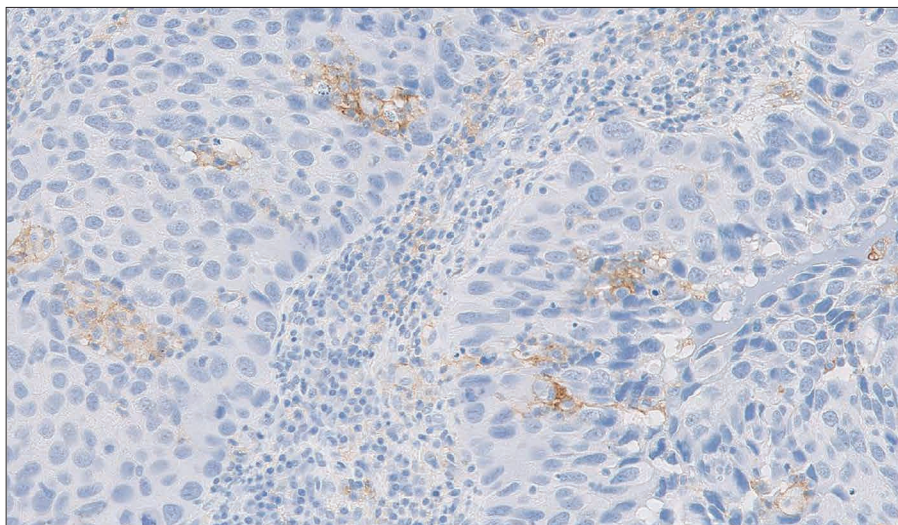


図 61: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 15 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 13 ～ 17 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

CPS ≥ 10 の症例

症例 1: CPS ≥ 10

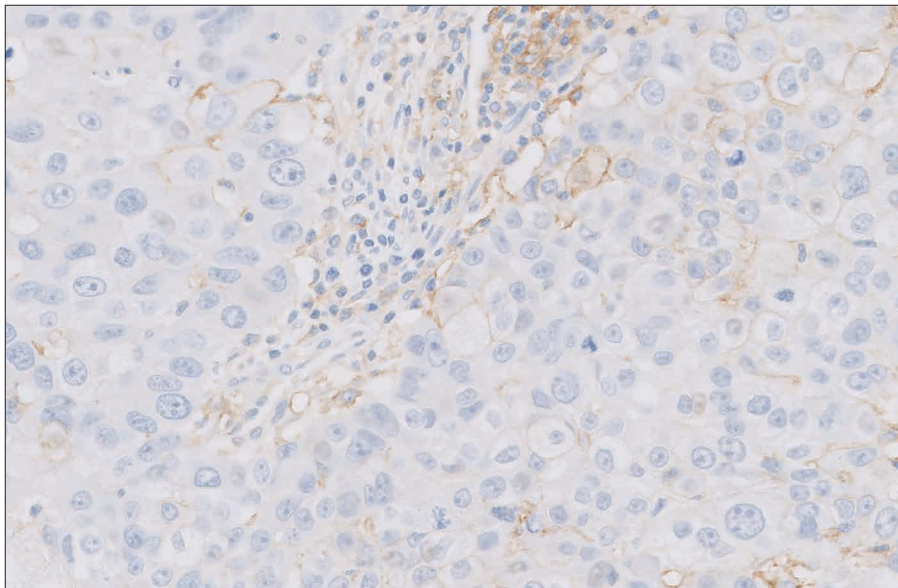


図 62: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 16 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 14 ~ 18 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

症例 2: CPS ≥ 10

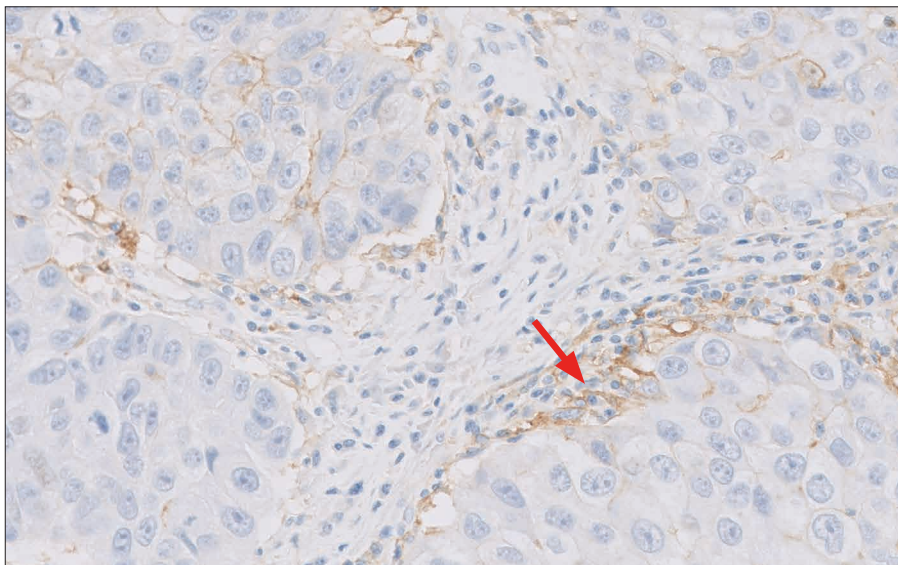


図 63: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 30 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 27 ~ 33 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

注意事項: 腫瘍細胞に隣接する PD-L1 陽性形質細胞（矢印）は、スコアリングの分子から除外します。

症例 3: CPS ≥ 10

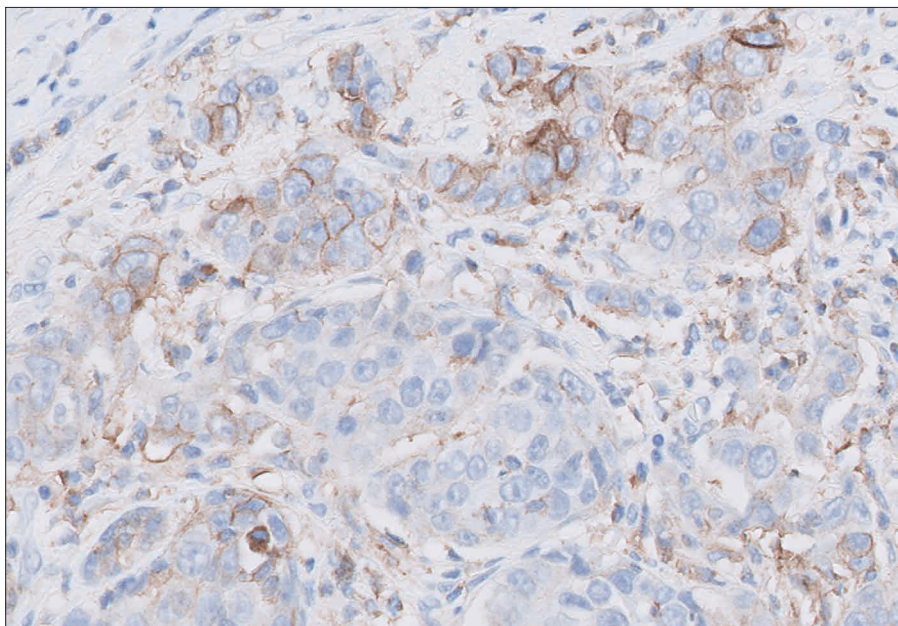


図 64: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 30 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 27 ~ 33 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

症例 4: CPS ≥ 10

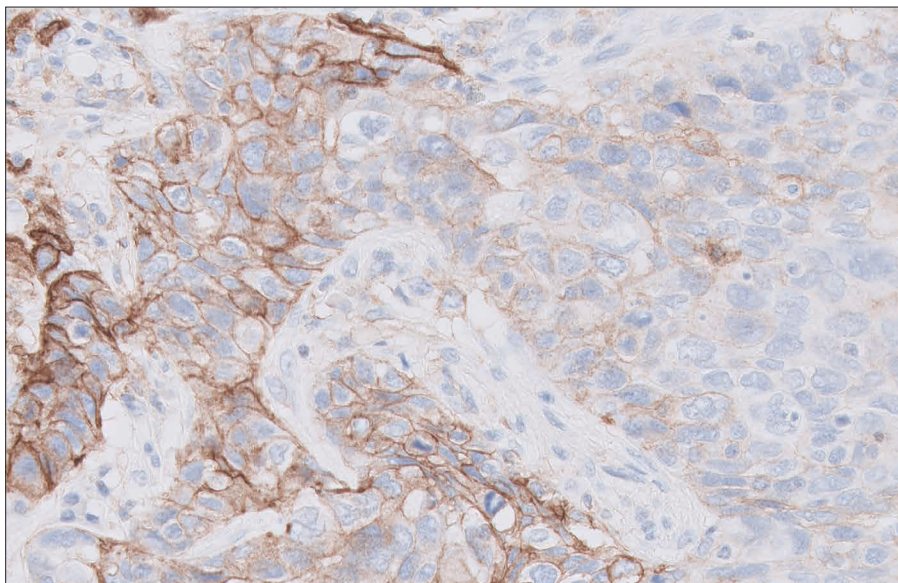


図 65: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 60 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 57 ~ 63 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

症例 5: CPS ≥ 10

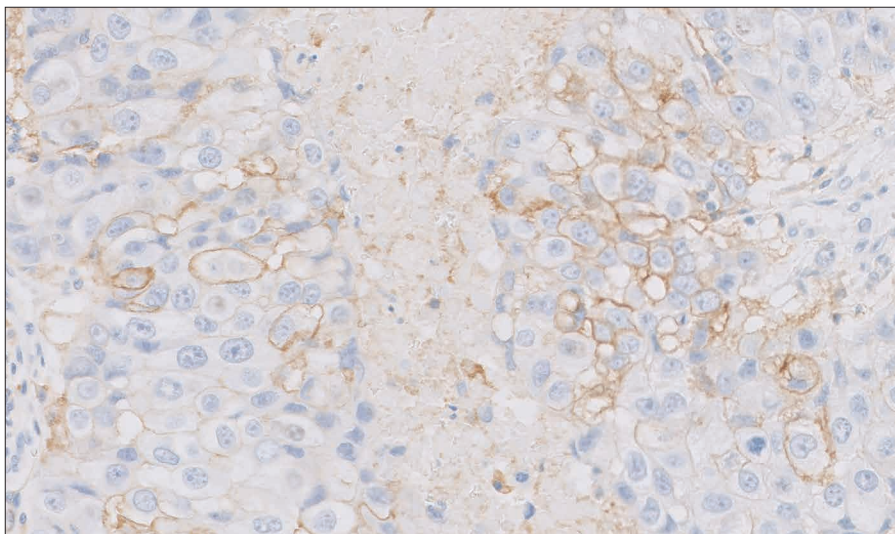


図 66: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 75 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 72 ～ 78 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

症例 6: CPS ≥ 10

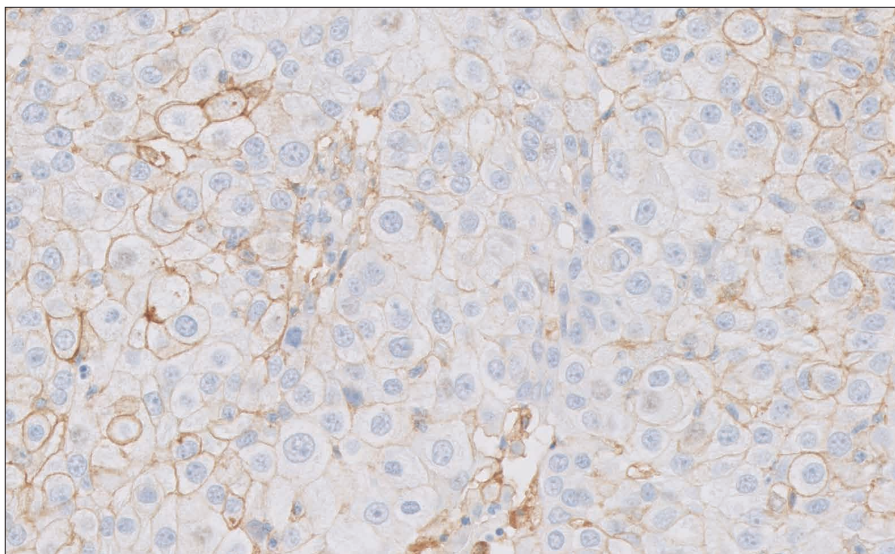


図 67: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 85 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 82 ～ 88 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

症例 7: CPS ≥ 10

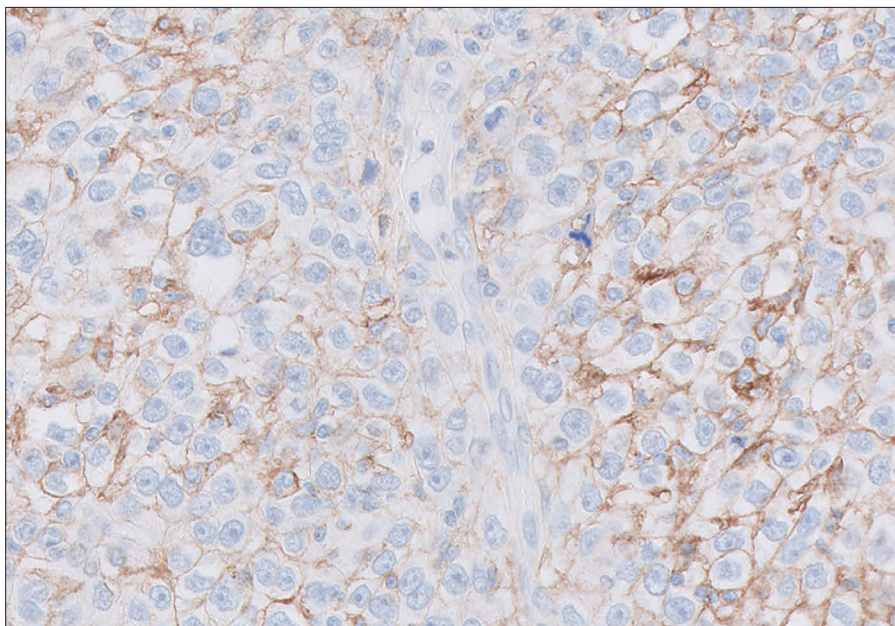


図 68: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 94 を示す TNBC 検体。
ただし、この画像には CPS 91 ~ 97 が割り当てられる可能性があります（対物レンズ 20 倍）。

症例 8: CPS ≥ 10

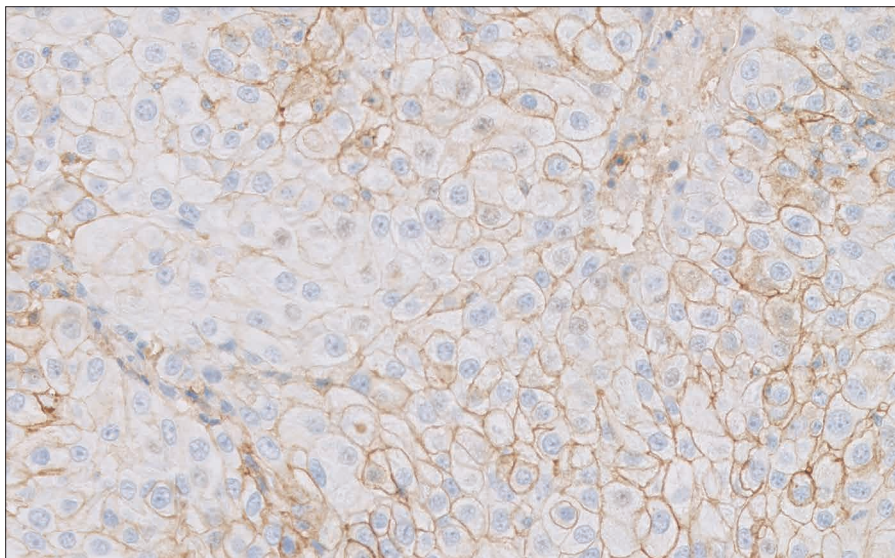


図 69: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」一次抗体で染色した、CPS 100 を示す TNBC 検体
(対物レンズ 20 倍)。

コントロールスライド（CCL）付録

合格コントロールスライド

合格 PD-L1 陰性コントロール細胞

- － 特異的染色なし
- － 非特異的染色の染色強度は 1+ 未満
- － MCF-7 細胞の観察範囲内で、明らかな細胞膜染色を呈する細胞、または強度 1 以上の細胞質染色を呈する細胞が合計 10 個以下の場合は許容範囲内

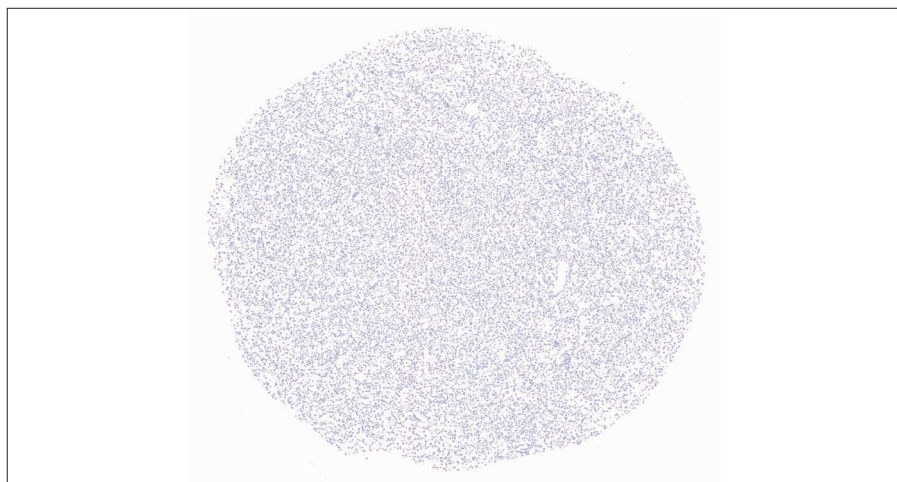


図 70: MCF-7 細胞 (対物レンズ 2 倍)。

合格 PD-L1 陽性コントロール細胞

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



図 71: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 2 倍)。

ボーダーライン合格の コントロールスライド

ボーダーライン合格と合格 PD-L1 陽性コントロール細胞との比較

ボーダーライン合格の PD-L1 陽性コントロール細胞

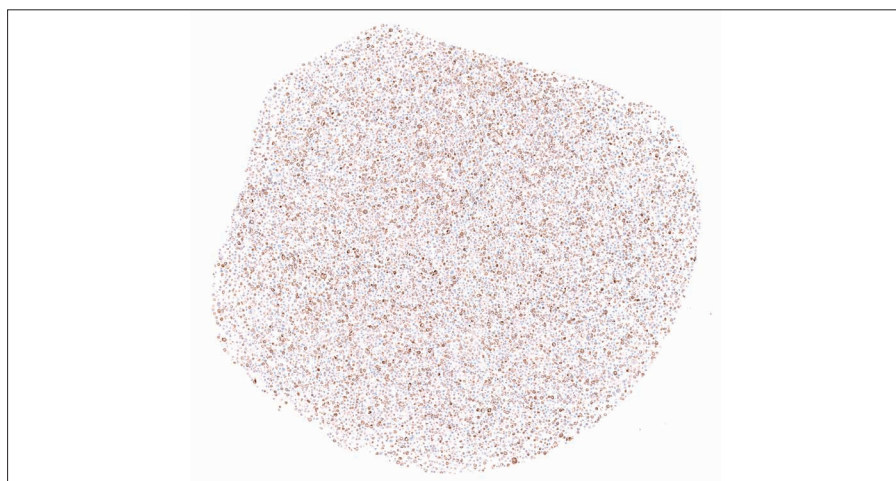
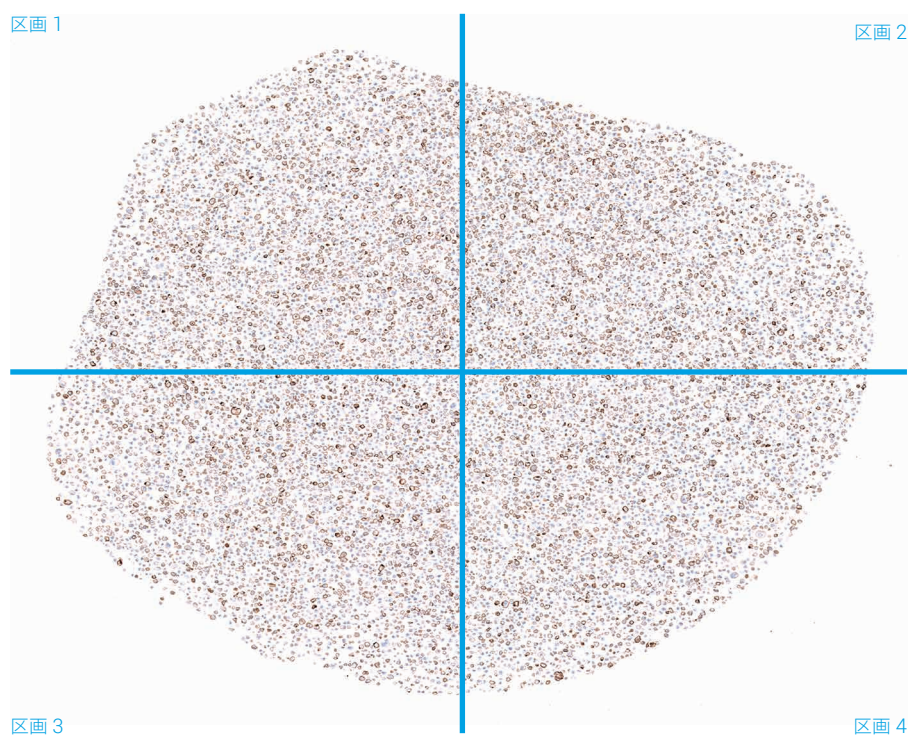


図 72: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 2 倍)。

ボーダーライン合格の PD-L1 陽性コントロール細胞の評価方法

ボーダーラインの PD-L1 陽性コントロール細胞では、スライド上のセルブロック切片を 4 区画に分け、20 倍の倍率で検証して、陽性細胞の全体に占める割合と、全細胞の平均染色強度を決定します。



区画 1

区画 1 では、細胞の約 70 % が細胞膜染色を示しており、この区画での全細胞の平均染色強度は 2+ 以上です。

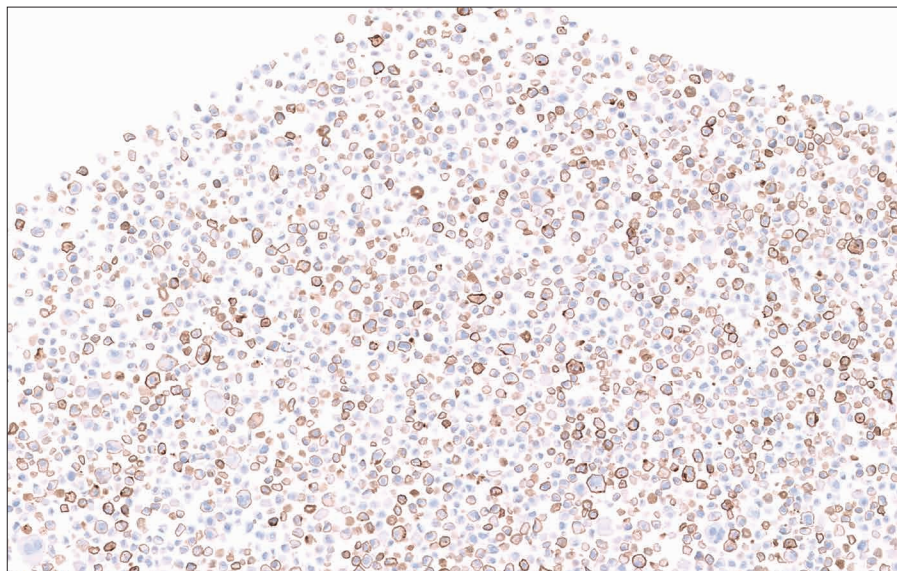


図 73: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 5 倍)。

区画 2

区画 2 では、細胞の約 75 % が細胞膜染色を示しており、この区画での全細胞の平均染色強度は 2+ 以上です。

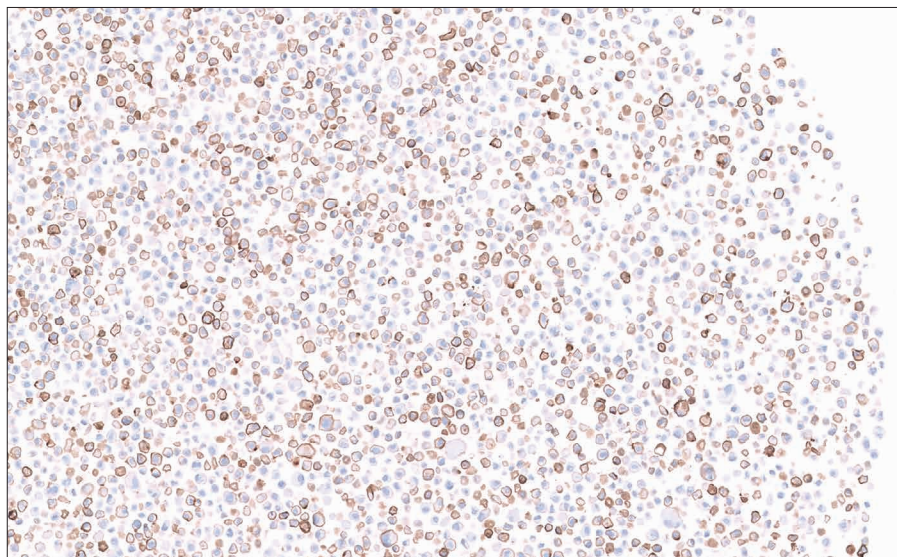


図 74: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 5 倍)。

区画 3

区画 3 では、細胞の約 70 % が細胞膜染色を示しており、この区画での全細胞の平均染色強度は 2+ 以上です。

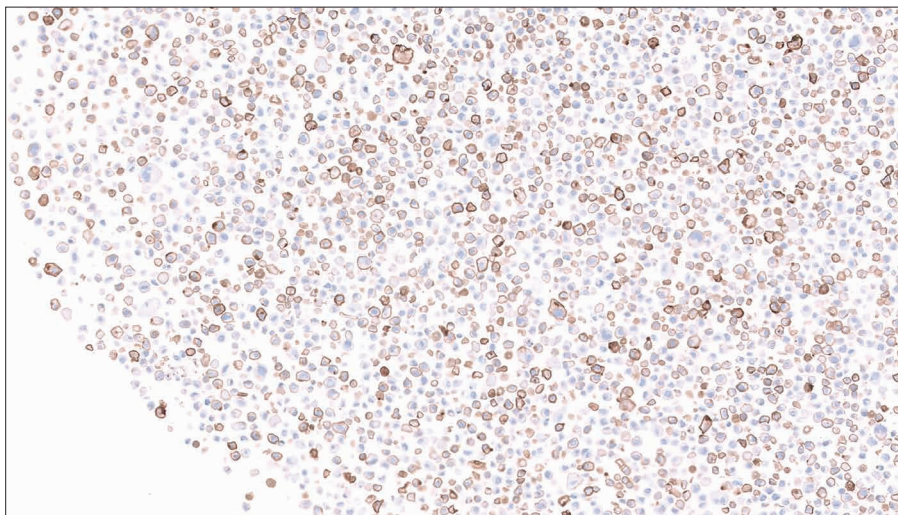


図 75: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 5 倍)。

区画 4

区画 4 では、細胞の約 65 % が細胞膜染色を示しており、この区画での全細胞の平均染色強度は 2+ 以上です。

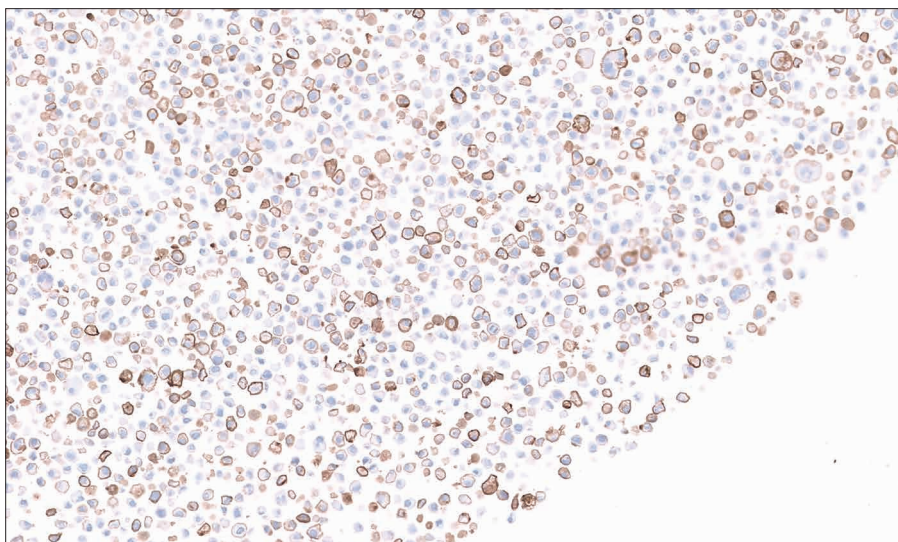
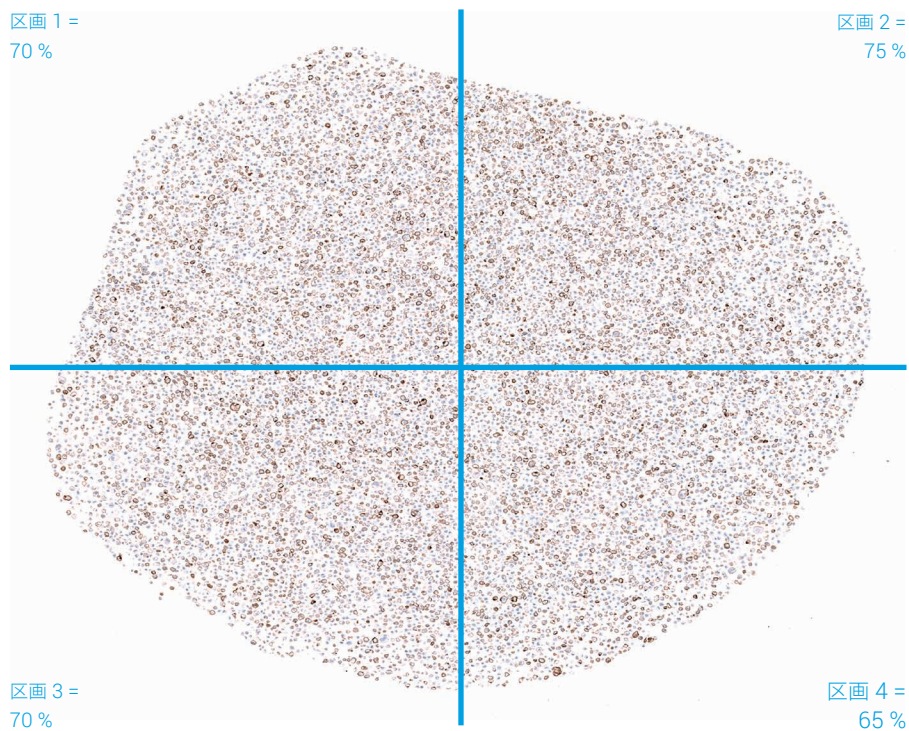


図 76: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 5 倍)。

算出

1. 全 4 区画中から細胞膜染色を示す細胞の平均比率を算出し、PD-L1 陽性コントロールセルブロック切片中の細胞膜染色を示す細胞の全体に占める割合を推定
2. 陽性コントロールセルブロック切片上の全細胞の平均染色強度が 2+ 以上であるかどうかを確認



$$\frac{70 + 75 + 70 + 65}{4} = 70$$

- ー 細胞膜染色を示す細胞の全体に占める割合 = 70 %
- ー 陽性コントロールセルブロック切片上の全細胞の平均染色強度 $\geq 2+$

NCI 226 陽性コントロール細胞は許容基準を満たします。

不合格コントロールスライド

例 1: 合格した PD-L1 陰性コントロール細胞と不合格の PD-L1 陽性コントロール細胞

合格 PD-L1 陰性コントロール細胞

- － 特異的染色なし
- － 非特異的染色の染色強度は 1+ 未満
- － PD-L1 陰性細胞の観察範囲内で、明らかな細胞膜染色を呈する細胞、または染色強度 1 以上の細胞質染色を呈する細胞が合計 10 個以下の場合は許容範囲内

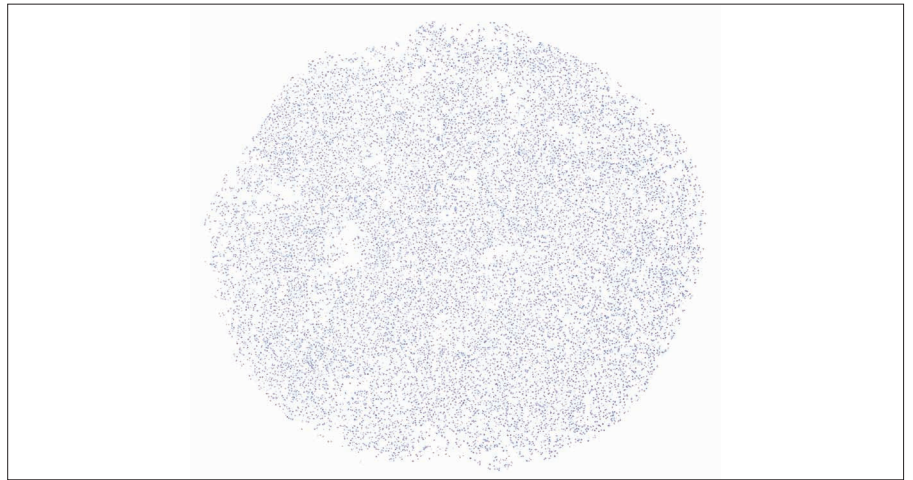


図 77: MCF-7 細胞 (対物レンズ 2 倍)。

不合格 PD-L1 陽性コントロール細胞

- － 細胞膜染色を示す細胞の割合が 70 % 未満であり、陽性コントロールセルブロック切片上の全細胞の平均染色強度が 2+ 未満

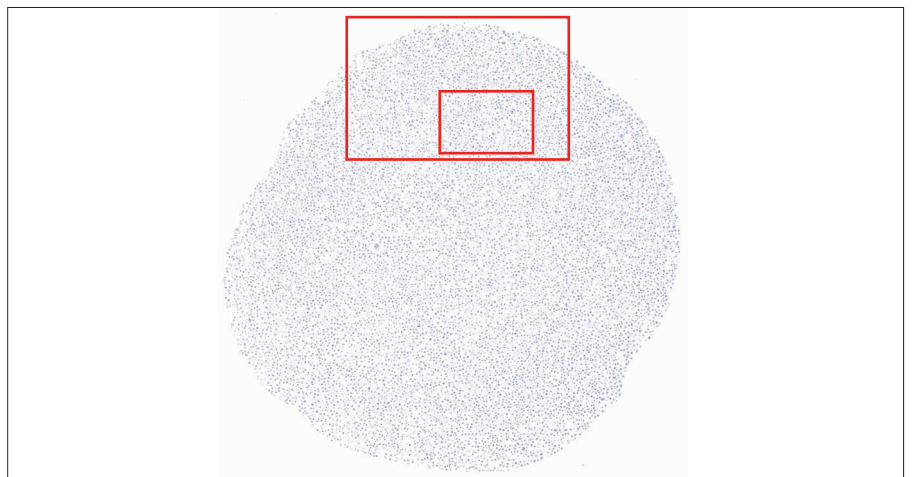


図 78: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 2 倍)。

不合格の詳細を示した高倍率画像について、以下の画像を参照してください。

不合格 PD-L1 陽性コントロール細胞 (10 倍)

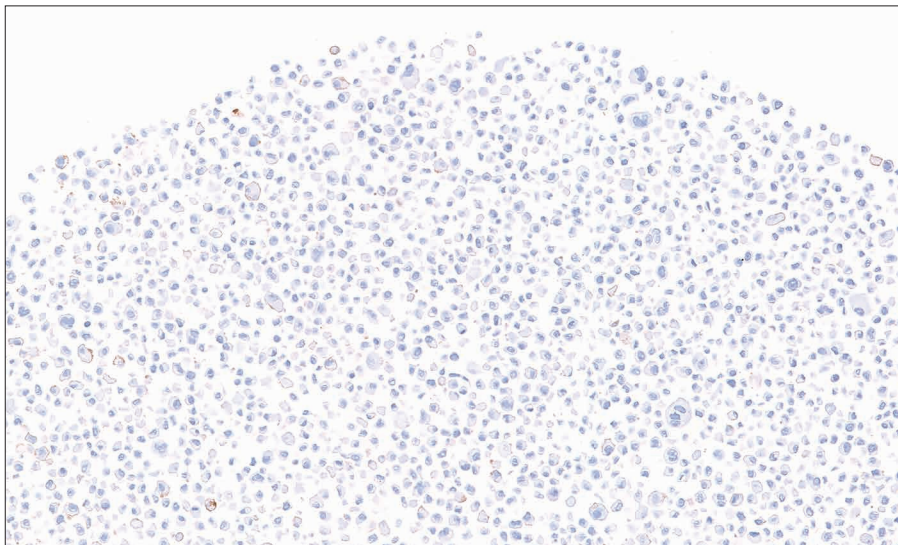


図 79: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 10 倍)。

不合格 PD-L1 陽性コントロール細胞 (20 倍)

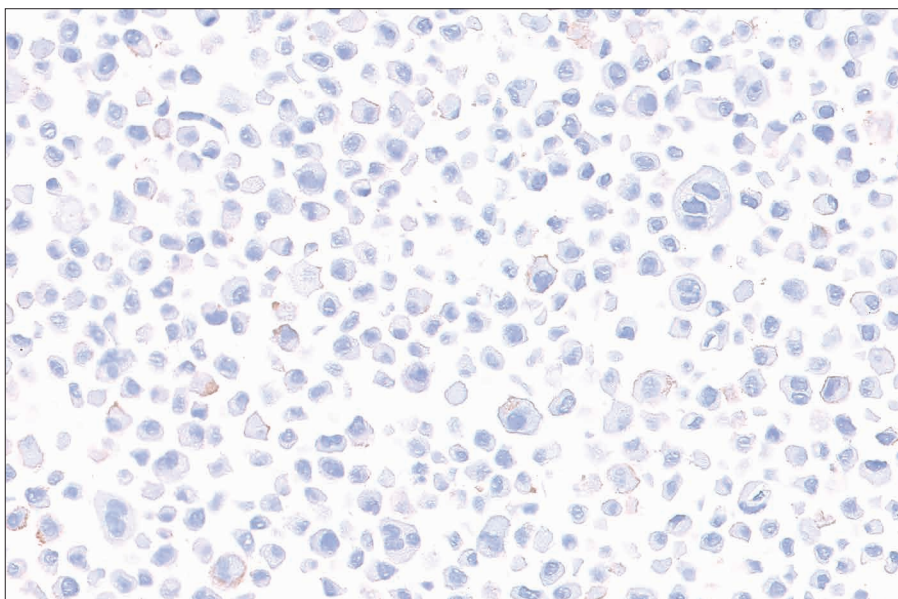


図 80: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 20 倍)。

例 2: 合格した PD-L1 陰性コントロール細胞と不合格の PD-L1 陽性コントロール細胞

合格 PD-L1 陰性コントロール細胞

- － 特異的染色なし
- － 非特異的染色の染色強度は 1+ 未満
- － PD-L1 陰性細胞の観察範囲内で、明らかな細胞膜染色を呈する細胞、または染色強度 1 以上の細胞質染色を呈する細胞が合計 10 個以下の場合は許容範囲内

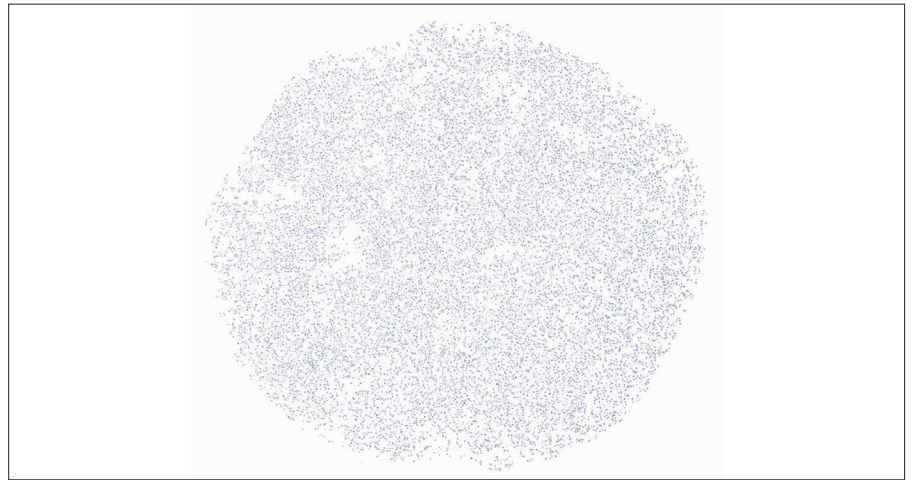


図 81: MCF-7 細胞 (対物レンズ 2 倍)。

不合格 PD-L1 陽性コントロール細胞

- － 細胞膜染色を示す細胞の割合が 70 % 未満であり、陰性コントロールセルブロック切片上の全細胞の平均染色強度が 2+ 未満

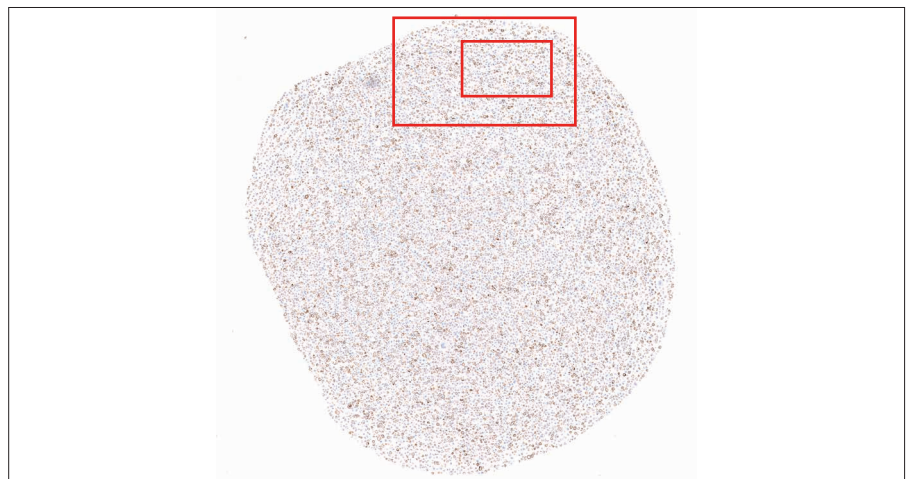


図 82: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 2 倍)。

不合格の詳細を示した高倍率画像について、以下の画像を参照してください。

不合格 PD-L1 陽性コントロール細胞 (10 倍)

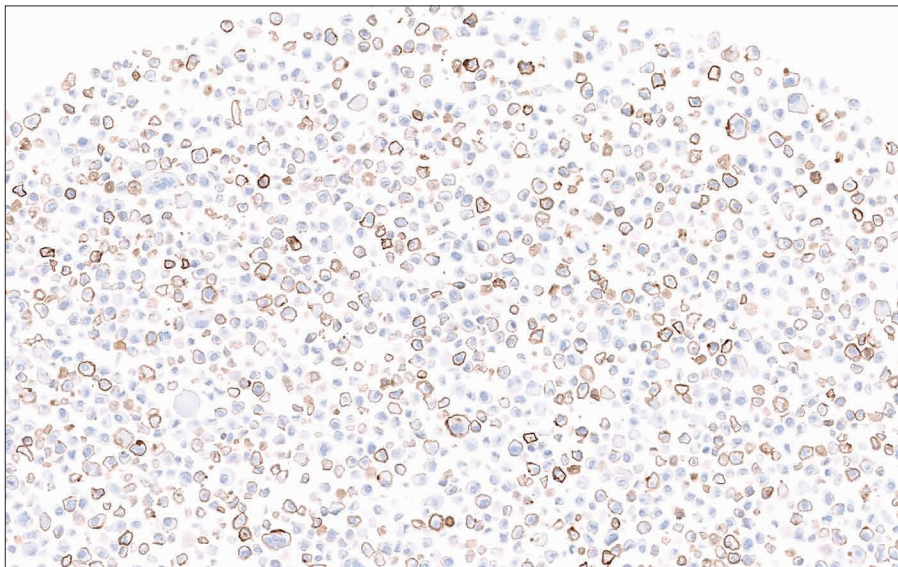


図 83: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 10 倍)。

不合格 PD-L1 陽性コントロール細胞 (20 倍)

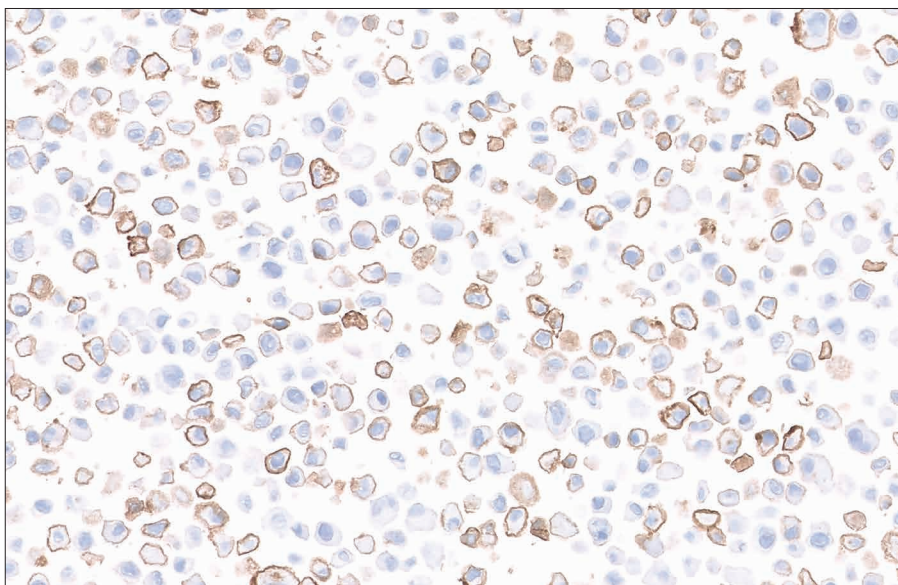


図 84: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 20 倍)。

例 3: 合格した PD-L1 陽性コントロール細胞と不合格の PD-L1 陰性コントロール細胞

合格 PD-L1 陽性コントロール細胞

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

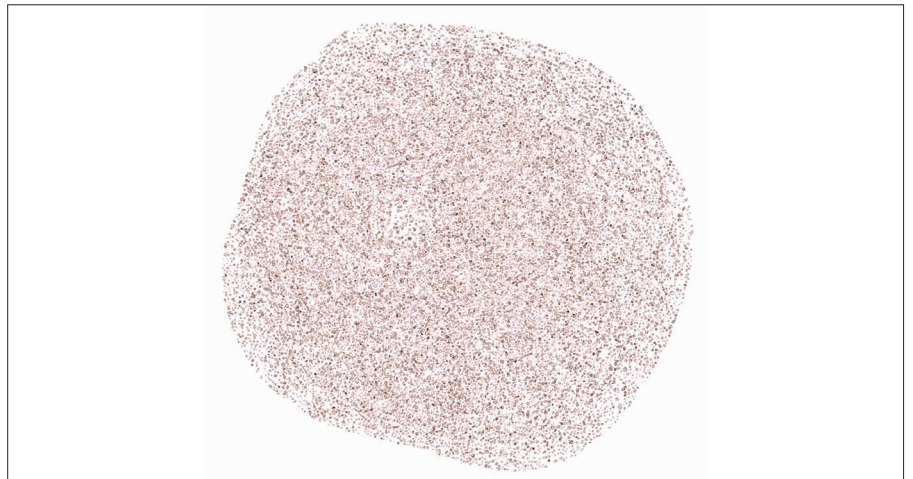


図 85: NCI-H226 細胞 (対物レンズ 2 倍)。

不合格 PD-L1 陰性コントロールスライド

- － 非特異的 (核) 染色の染色強度は 1+ 以上
- － 明らかな細胞膜染色を呈する細胞、または染色強度 1 以上の細胞質染色を呈する細胞が合計 10 個を超えている

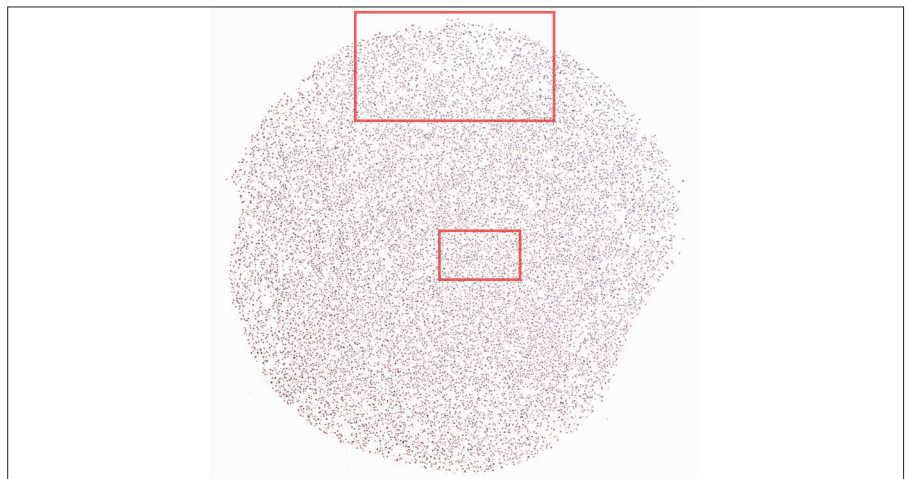


図 86: MCF-7 細胞 (対物レンズ 2 倍)。

不合格の詳細を示した高倍率画像について、以下の画像を参照してください。

不合格 PD-L1 陰性コントロール細胞 (10 倍)

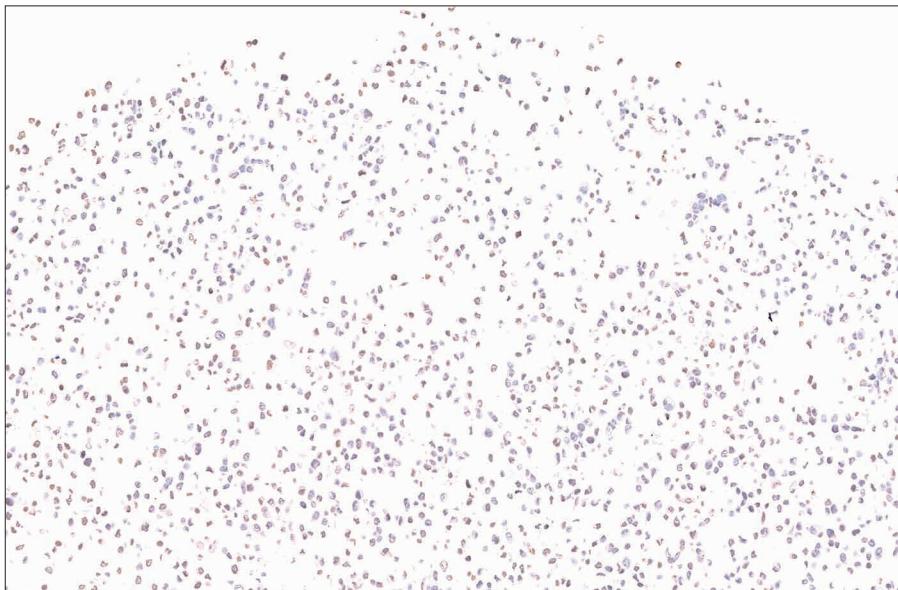


図 87: MCF-7 細胞 (対物レンズ 10 倍)。

不合格 PD-L1 陰性コントロール細胞 (20 倍)

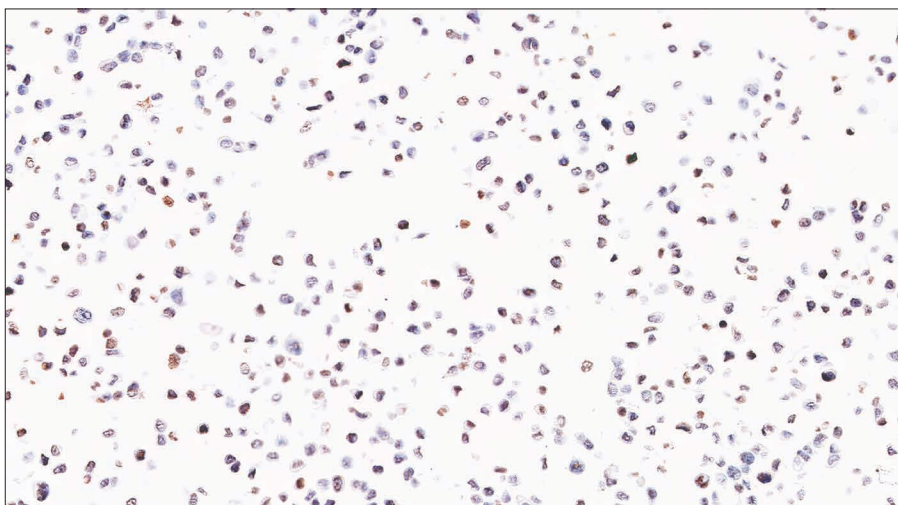


図 88: MCF-7 細胞 (対物レンズ 20 倍)。

トラブルシューティングガイド

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 「ダコ」のトラブルシューティング ガイド

詳細なトラブルシューティングが必要な場合には、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 | プログラミングエラー | スライドオーダーに際し、PD-L1 IHC 22C3pharmDx「ダコ」プロトコールが選択されていることを確認 |
| | DAB の発色不足 | 基質溶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 (20 x)、型番 K800721-2 のみを使用すること |
| | 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固定液と推奨される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 (20 x)、型番 K800721-2 のみを使用すること |
| 本品中のコントロールスライドの陽性対照細胞の染色が弱い | 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 (20 x)、型番 K800721-2 のみを使用すること |
| 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潤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固定液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 時間放置すること |
| 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 (20 x)、型番 K800721-2 のみを使用すること |
| 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 |

次ページに続く

| 問題 | 考えられる原因 | 推奨される処置 |
|--------------------------|-------------------------|--|
| 1 x 抗原賦活液が pH 仕様を満たしていない | pH メータが正しく較正されていない | pH メータが製造業者の推奨に従って校正されていることを確認する。再較正後、1 x 抗原賦活液の pH を再検証する。1 x 抗原賦活液の pH を変更しないでください。pH が許容範囲（6.1 ± 0.2）外である場合、1 x 抗原賦活液を廃棄する。新たに 1 x 抗原賦活液を調製する。新しい 1 x 抗原賦活液の pH を確認する |
| | 低品質な水を濃縮抗原賦活液の希釈に使用している | 精製水を使用して 1 x 抗原賦活液を調製していることを確認 |
| | 誤った抗原賦活液を使用している | 「キットの構成」や「試薬の調製」の章で指定された正しい抗原賦活液を使用していることを確認 |

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。免疫組織化学染色法のガイドブック (アジレント) もご参照ください。

臨床性能評価

パクリタキセル、nab-パクリタキセル、またはゲムシタビンとカルボプラチンと併用するキイトルーダの有効性は、腫瘍の PD-L1 発現に関わらず、転移がんに対する化学療法を受けたことがない、局所再発切除不能または転移性のトリプルネガティブ乳癌患者 847 例を対象に、多施設二重盲検無作為化プラセボ対照試験である KEYNOTE-355 試験で検証されました。2 年間の投与期間中に全身治療が必要な活動性自己免疫疾患患者、または免疫抑制が必要な病状の患者は不適格としました。無作為割付けは、化学療法（パクリタキセルまたは nab-パクリタキセル対ゲムシタビンとカルボプラチン）、PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」に基づく腫瘍の PD-L1 発現率（CPS ≥ 1 対 CPS < 1 ）、および術前化学療法における同一クラスの化学療法による前治療（あり対なし）で層別化しました。事前に規定した解析計画に従って、本試験の解析集団には腫瘍の PD-L1 発現率が CPS ≥ 1 および CPS ≥ 10 の患者集団が含まれました。

患者は、次の投与群のうちの 1 つに 2:1 で無作為に割り付けられました。すべての治療薬は静脈内注射で投与されました。

- キイトルーダ 200 mg を 3 週間ごとの 1 日目に投与し、併用療法として nab-パクリタキセル 100 mg/m² を 28 日ごとの 1、8、15 日目、パクリタキセル 90 mg/m² を 28 日ごとの 1、8、15 日目、またはゲムシタビン 1000 mg/m² とカルボプラチン AUC 2 mg/mL/分を 21 日ごとの 1、8 日目に投与。
- プラセボを 3 週間ごとの 1 日目に投与し、併用療法として nab-パクリタキセル 100 mg/m² を 28 日ごとの 1、8、15 日目、パクリタキセル 90 mg/m² を 28 日ごとの 1、8、15 日目、またはゲムシタビン 1000 mg/m² とカルボプラチン AUC 2 mg/mL/分を 21 日ごとの 1、8 日目に投与。

腫瘍ステータスの評価は Week 8、16、24 で実施された後、1 年目は 9 週間ごと、その後は 12 週間ごとに行われました。主要有効性評価項目は PFS であり、標的病変数最大 10 個および CPS ≥ 10 のサブグループの患者で検証した 1 臓器あたり標的病変数最大 5 個を追跡できるように修正済みの RECIST v1.1 に基づく BICRによって評価しました。その他の有効性評価項目は、OS、ならびに BICR によって評価した ORR および DoR でした。

患者の被験者集団の特性は、年齢中央値 53 歳（範囲：22 ～ 85 歳）、65 歳以上 21 %、女性 100 %、白人 68 %、アジア系 21 %、黒人 4 %。ECOG PS 0 は 60 %、ECOG PS 1 は 40 %。閉経後状態は 68 %。患者の 75 % が腫瘍の PD-L1 発現率が CPS ≥ 1 であり、38 % が CPS ≥ 10 でした。

表 5 および図 89 に、KEYNOTE-355 試験における有効性の結果の概要を示します。

表 5: KEYNOTE-355 試験の有効性の結果 PD-L1 陽性 (CPS ≥ 10)

| 評価項目 | キイトルーダ 200 mg を 3 週間ごとに投与 化学療法併用 n = 220 | プラセボ 3 週間ごとに投与 化学療法併用 n = 103 |
|------------------------------|---|--|
| PFS | | |
| イベント数（%） | 136 (62 %) | 79 (77 %) |
| 中央値（月）(95 % CI) | 9.7 (7.6, 11.3) | 5.6 (5.3, 7.5) |
| ハザード比 [*] (95 % CI) | 0.65 (0.49, 0.86) | |
| p 値 [†] | 0.0012 | |
| ORR | | |
| 客観的に確認した 奏効率（95 % CI） | 53 % (46, 60) | 40% (30, 50) |
| 完全奏効率 | 17 % | 13 % |
| 部分奏効率 | 36 % | 27 % |
| DoR | | |
| 中央値（月）(範囲) | 19.3 (1.6+, 29.8) | 7.3 (1.5, 32.5+) |

* 層別 Cox 回帰モデルに基づきます
† 片側 p 値は層別ログランク検定に基づきます

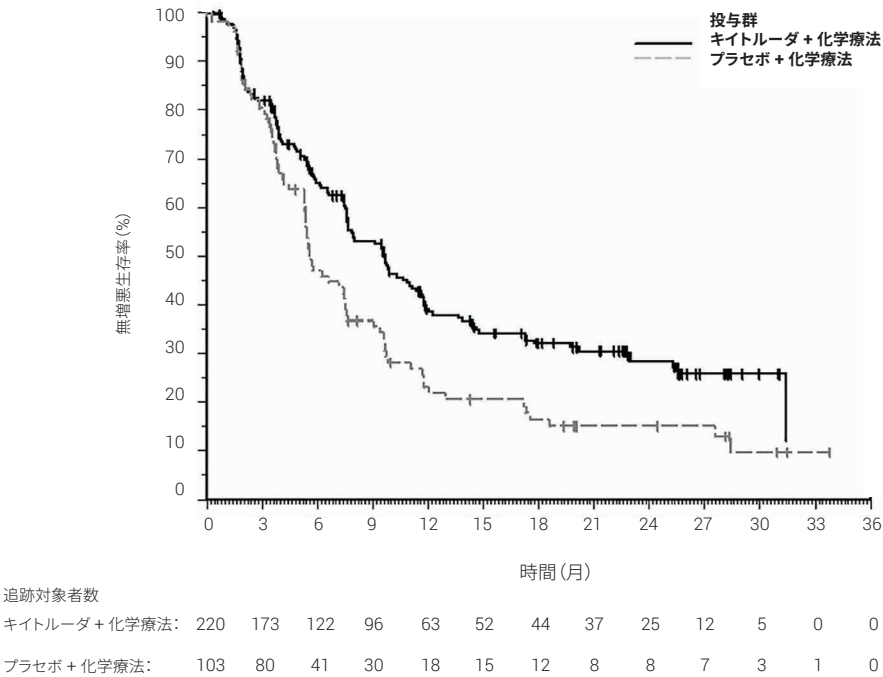


図 89: KEYNOTE-355 試験における無増悪生存率のカプランマイヤー曲線 (CPS ≥ 10)

参考文献

- － キイトルーダ 添付文書 MSD 株式会社
- － PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」添付文書 アジレント・テクノロジー株式会社
- － Herbst, R.S.; Soria, J.C.; Kowanetz, M.; Fine, G.D.; Hamid, O.; Gordon, M.S.; Sosman, J.A.; McDermott, D.F.; Powderly, J.D.; Gettinger, S.N.; Kohrt, H.E.; Horn, L.; Lawrence, D.P.; Rost, S.; Leabman, M.; Xiao, Y.; Mokatrín, A.; Koeppen, H.; Hegde, P.S.; Mellman, I.; Chen, D.S.; Hodi, F.S. Predictive Correlates of Response to the Anti-PD-L1 Antibody MPDL3280A in Cancer Patients. *Nature*. 2014, 515 (7528), 563–567.
- － Tume, P.C.; Harview, C.L.; Yearley, J.H.; Shintaku, I.P.; Taylor, E.J.; Robert, L.; Chmielowski, B.; Spasic, M.; Henry, G.; Ciobanu, V.; West, A.N.; Carmona, M.; Kivork, C.; Seja, E.; Cherry, G.; Gutierrez, A.J.; Grogan, T.R.; Mateus, C.; Tomasic, G.; Glaspy, J.A.; Emerson, R.O.; Robins, H.; Pierce, R.H.; Elashoff, D.A.; Robert, C.; Ribas, A. PD-1 Blockade Induces Responses by Inhibiting Adaptive Immune Resistance. *Nature*. 2014, 515 (7528), 568–571.
- － Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011, 144 (5), 646–674.
- － Sharpe, A.H.; Freeman, G.J. The B7-CD28 Superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2002, 2 (2), 116–126.
- － Keir, M.E.; Butte, M.J.; Freeman, G.J.; Sharpe, A.H. PD-1 and its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2008, 26, 677–704.
- － Freeman, G.J.; Long, A.J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H.; Fitz, L.J.; Malenkovich, N.; Okazaki, T.; Byrne, M.C.; Horton, H.F.; Fouser, L.; Carter, L.; Ling, V.; Bowman, M.R.; Carreno, B.M.; Collins, M.; Wood, C.R.; Honjo, T. 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, S.E.; Salomao, D.R.; Tamura, H.; Hirano, F.; Flies, D.B.; Roche, P.C.; Lu, J.; Zhu, G.; Tamada, K.; Lennon, V.A.; Celis, E.; Chen, L. Tumor-associated B7-H1 Promotes T-cell Apoptosis: A Potential Mechanism of Immune Evasion. *Nat. Med.* 2002, 8 (8), 793–800.
- － Brahmer, J.R.; Tykodi, S.S.; Chow, L.Q.; Hwu, W.J.; Topalian, S.L.; Hwu, P.; Drake, C.G.; Camacho, L.H.; Kauh, J.; Odunsi, K.; Pitot, H.C.; Hamid, O.; Bhatia, S.; Martins, R.; Eaton, K.; Chen, S.; Salay, T.M.; Alaparthi, S.; Grosso, J.F.; Korman, A.J.; Parker, S.M.; Agrawal, S.; Goldberg, S.M.; Pardoll, D.M.; Gupta, A.; Wigginton, J.M. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012, 366 (26), 2455–2465.

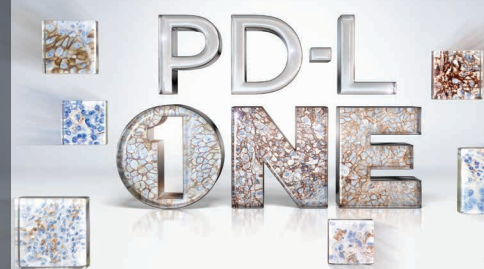
- Topalian, S.L.; Hodi, F.S.; Brahmer, J.R.; Gettinger, S.N.; Smith, D.C.; McDermott, D.F.; Powderly, J.D.; Carvajal, R.D.; Sosman, J.A.; Atkins, M.B.; Leming, P.D.; Spigel, D.R.; Antonia, S.J.; Horn, L.; Drake, C.G.; Pardoll, D.M.; Chen, L.; Sharfman, W.H.; Anders, R.A.; Taube, J.M.; McMiller, T.L.; Xu, H.; Korman, A.J.; Jure-Kunkel, M.; Agrawal, S.; McDonald, D.; Kollia, G.D.; Gupta, A.; Wigginton, J.M.; Sznol, M. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012, 366 (26), 2443–2454.
- Roach, C.; Zhang, N.; Corigliano, E.; Jansson, M.; Toland, G.; Ponto, G.; Dolled-Filhart, M.; Emancipator, K.; Stanforth, D.; Kulangara, K. 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.
- Cortes, J.; Cescon, D.W.; Rugo, H.S.; et al. KEYNOTE-355: Randomized, double-blind, phase III study of pembrolizumab + chemotherapy versus placebo + chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2020, 15 (Supp 1000), abstr.
- 社内資料 Agilent Technologies, Inc.

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.

[illegible]

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に用いられる
先進的アッセイ PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」



キイトルーダの臨床試験のすべてにおいて、
使用された診断薬^{1,2}



キイトルーダを用いるためにPD-L1 検査が
必要なすべての適応に対して初めて承認
された診断薬^{1,2}



多くの患者を対象にキイトルーダに関する
検査を行い全世界で高い信頼を得た診断薬³



1. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」添付文書 アジレント・テクノロジー株式会社
2. キイトルーダ 添付文書 MSD 株式会社
3. 社内資料 Agilent Technologies, Inc.

詳細はこちら：

<https://www.agilent.com>

承認された適応症および療法の指針となる発現カットオフ値についてはキイトルーダ又は PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の添付文書をご確認ください。

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/>

D66489 / P210237-1

© Agilent Technologies, Inc. 2021

本書の一部または全部を画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, Jun. 2021

29425JA 2021JUN