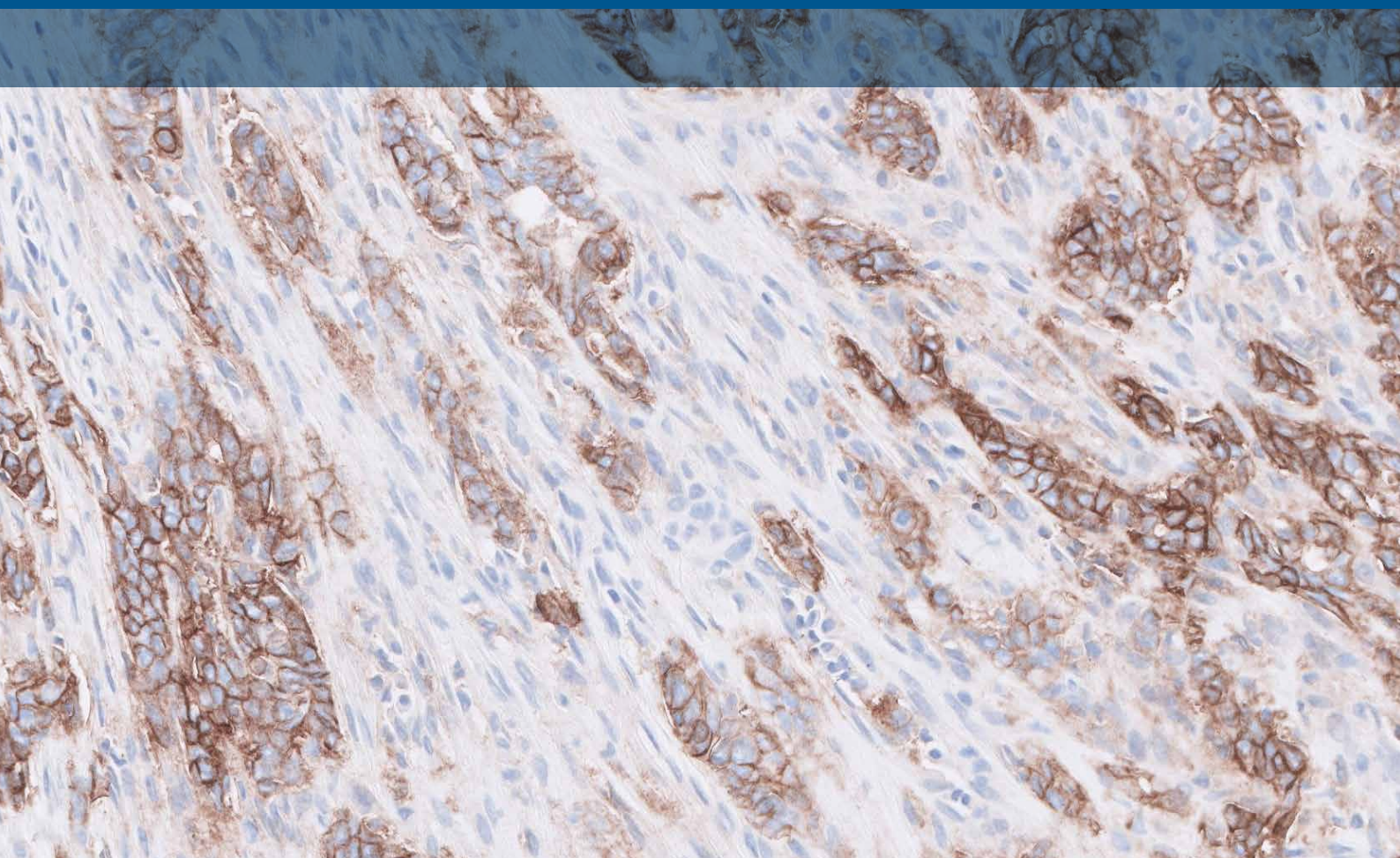


PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 染色結果判定マニュアル：胃癌

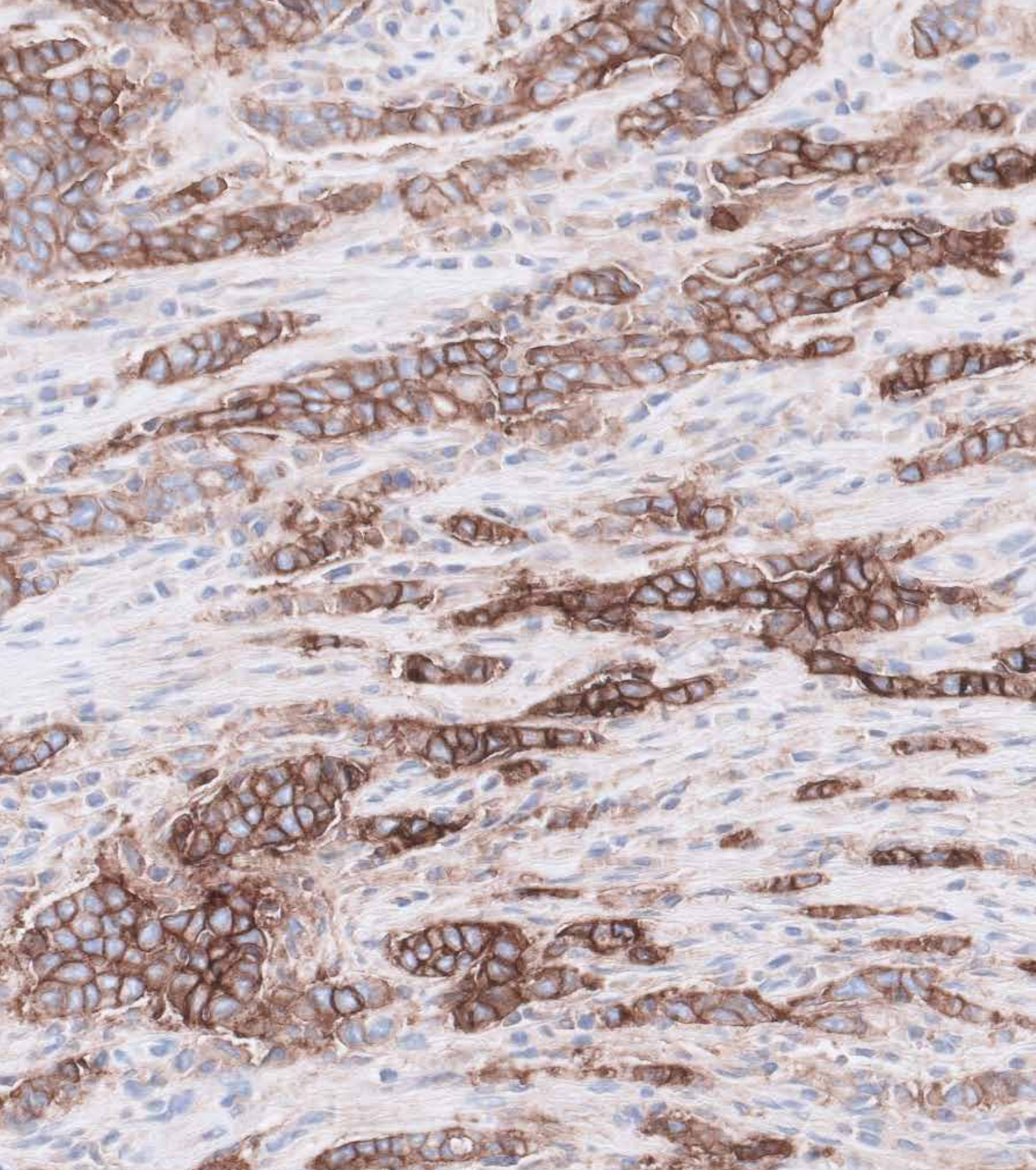
体外診断用

体外診断用医薬品 承認番号：22800EZ00077000



目次

はじめに	5
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
ご確認事項	6
PD-L1 の概要	7
PD-1/PD-L1 パスウェイの役割	8
胃癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床試験データ	9
胃癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床的価値	10
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の概要	11
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～	13
検体採取と作製	13
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色手順	14
コントロールスライド	15
染色プロトコール	16
脱パラフィン、親水化、抗原賦活化	16
染色と対比染色	16
封入	16
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」テクニカルチェックリスト	17
胃癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の結果判定に関する推奨事項	18
HE 染色した組織検体	18
本品中のコントロールスライド	18
陽性対照のコントロール組織スライド	20
陰性対照のコントロール組織スライド	20
一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体	20
一次抗体で染色した組織検体	21
スライド評価フローチャート	22
Combined Positive Score (CPS)	23
Combined Positive Score (CPS) の算出に関して推奨されるスコアリング方法	25
胃癌症例のさまざまな染色像とその解釈	28
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」結果報告：胃癌	29
胃癌の Combined Positive Score (CPS) 要約 および免疫染色例	30
CPS に組み入れられる細胞および除外される細胞	31
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の胃癌症例	46
アーチファクト	53
その他：下位組織構造	57
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」トラブルシューティングガイド	59
参考文献	60



PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」

染色結果判定マニュアル：胃癌

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、頭頸部癌患者又は胃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。

重要な基本的注意

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及び胃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。



CHECKMATE-649 試験の結果により、胃癌（胃食道接合部癌を含む）患者におけるニボルマブと化学療法（フッ化ピリミジン系抗悪性腫瘍剤及びプラチナ製剤）の併用療法が全生存期間（OS）を延長することが示されました。

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

このPD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の胃癌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）胃癌（GC）（GC および胃食道接合部癌（GEJ）を含む）検体中の PD-L1 発現率を評価する際に、正確で再現性のある結果を得られるようサポートするためのものです。PD-L1 発現の評価は、抗 PD-L1 免疫療法に適した患者の特定に使用できます。

このマニュアルでは、適した染色と診断評価が得られるよう、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の添付文書に記載されているスコアリングガイドラインと技術情報を詳述します。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」を用いた胃癌検体の染色のスコアリングに必要な事項を十分に知っていただくために、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、信頼性のある結果を得るために、このような症例や胃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。

注意事項：本アッセイは、50 % 以上の腺癌を含むがん種を有する患者を対象に使用します。

ご確認事項

結果の判定

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 29 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

この染色判定マニュアルに含まれる顕微鏡写真は、特に記載のない限り、腺癌のものです。扁平上皮癌（SQCC）検体は、腺癌検体内に認められる扁平上皮癌を示すため、胃食道接合部癌（GEJ）に含めます。食道癌（EC）検体例は、胃食道接合部に近接する下部の食道腫瘍を表すものとして含まれます。**食道癌検体は本検査の使用適応の一部ではありません。**

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。

1. 組織検体は BioIVT Asterand より提供されました。
2. このプロジェクトで使用されたデータと胃食道接合部組織は、Sapien Biosciences Pvt. Ltd. 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。
3. このプロジェクトで使用されたデータと胃食道接合部組織は、GLAS 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。
4. このプロジェクトで使用されたデータと胃食道接合部組織は、Nottingham University Hospitals NHS Trust 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。
5. 生物学的材料は Ontario Tumour Bank より提供されました。Ontario Tumour Bank は、オンタリオ政府が提供した資金を通じて、オンタリオがん研究所の支援を受けています。
6. このプロジェクトで使用されたデータと胃食道接合部組織は、National BioService LLC 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。
7. 検体および組織は Conversant Biologics より提供されました。

PD-L1 の概要

PD-1/PD-L1 パスウェイは、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 a)。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 パスウェイ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 b)。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

抗 PD-1 療法では、腫瘍細胞と活性化された T 細胞との間の PD-1/PD-L1 相互作用を阻害して、免疫抑制の回避に役立ち、細胞傷害性 T 細胞が腫瘍細胞を能動的に除去します。

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

胃癌における 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 28-8 pharmDx「ダコ」は、PD-L1 発現と臨床効果の関係を評価するための、ニボルマブの臨床試験 (CHECKMATE-649 試験) で用いられた唯一の PD-L1 アッセイです。

PD-1/PD-L1 パスウェイの役割

正常細胞への攻撃を阻害

T 細胞の不活性化により、正常組織への攻撃が阻害されます。

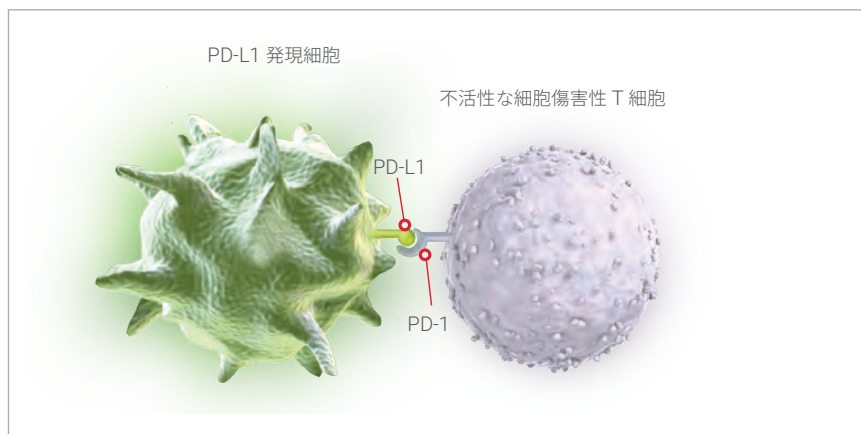


図 a.

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。

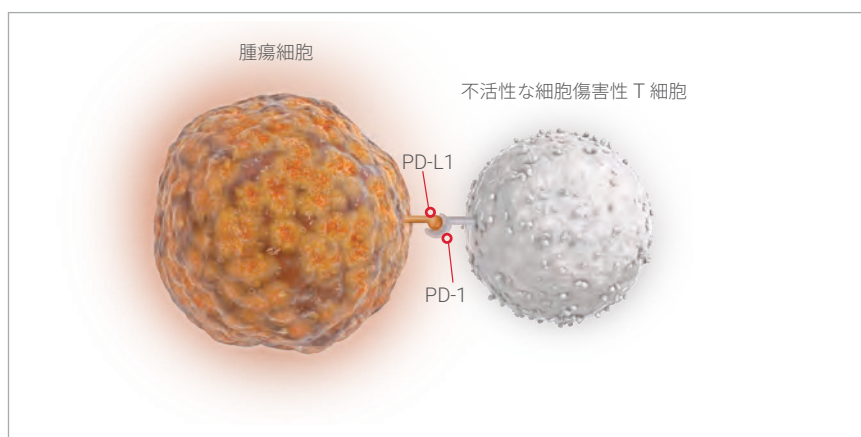


図 b.

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。

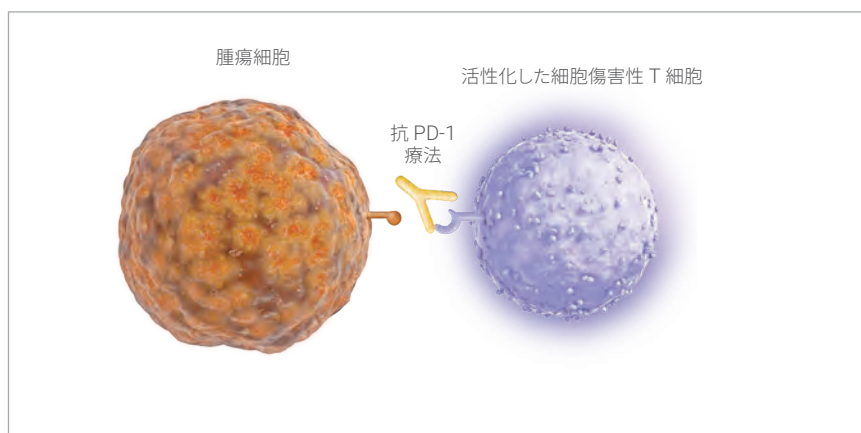


図 c.

胃癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床試験データ

CHECKMATE-649 試験の結果により、胃癌（胃食道接合部癌を含む）患者におけるニボルマブと化学療法（フッ化ピリミジン系抗悪性腫瘍剤及びプラチナ製剤）の併用療法が全生存期間（OS）を延長することが示されました。

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。

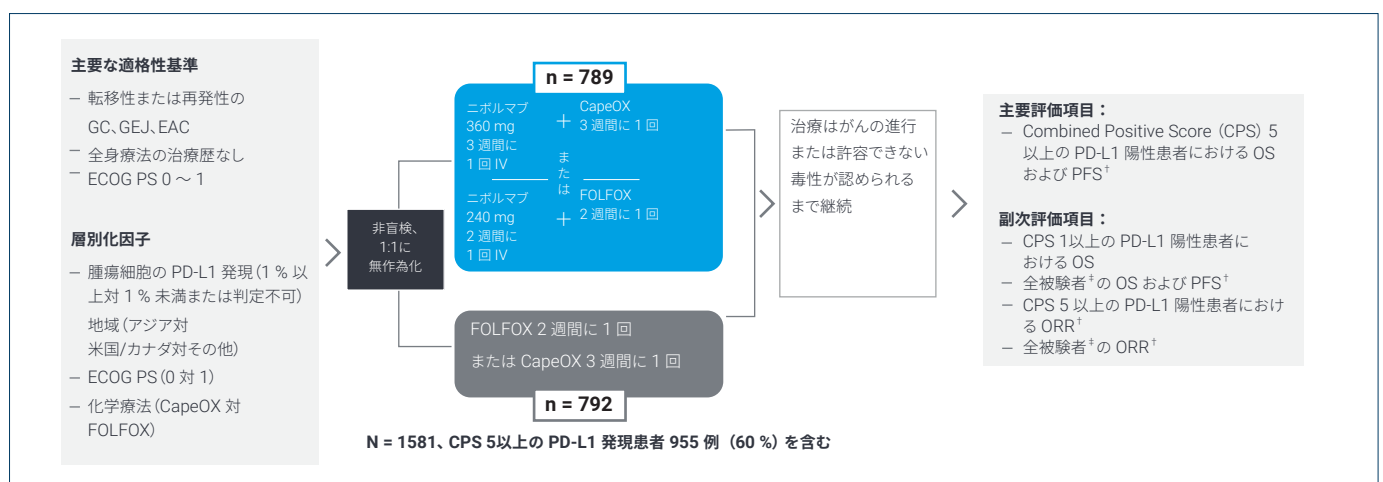
- CHECKMATE-649 試験により、ニボルマブと化学療法（フッ化ピリミジン系抗悪性腫瘍剤及びプラチナ製剤）の併用療法を行った胃癌患者の PD-L1 発現率の評価に関する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の妥当性が検証されました。
- CHECKMATE-649 試験は、HER2 陰性、切除不能の進行または再発した未治療の胃癌（胃食道接合部癌を含む）患者を対象とした第 III 相無作為化多施設非盲検試験です。

切除不能な進行または再発した胃癌（胃食道接合部癌を含む）患者を対象としたニボルマブと化学療法（フッ化ピリミジン系抗悪性腫瘍剤及びプラチナ製剤）の併用療法を評価した無作為化第 III 相試験

CHECKMATE-649** 試験デザイン（n = 1,581）

HER2 陰性、進行胃癌における免疫療法と化学療法の併用一次療法*に関する最大の無作為化第 III 相試験

CHECKMATE-649 試験での PD-L1 発現が CPS 5 以上の患者の割合は 60 % でした。また、すべての患者における PD-L1 発現の割合は 82 % でした。



*Moehler による ESMO 2020 における発表。

*FOLFFOX または CapeOX。†盲検下独立中央判定（BICR）を用いて評価。ECOG PS = 米国東海岸臨床試験グループパフォーマンスステータス、IHC = 免疫組織化学、IV = 静脈内投与、ORR = 全奏効率、PFS = 無増悪生存期間、OS = 全生存期間
EAC = 食道腺癌

**Janjigian Y. Y., Shitara K., et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. The Lancet. 2021

胃癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床的価値

- CHECKMATE -649 試験の結果より、腫瘍の PD-L1 発現が CPS 5 以上の患者において全生存期間中央値はニボルマブと化学療法 (FOLFOX または CapeOX) 併用療法群では 14.4か月、化学療法単剤投与群では 11.1 か月でした。また、すべての患者において、全生存期間中央値はニボルマブと化学療法 (FOLFOX または CapeOX) 併用療法群では 13.8か月、化学療法単剤投与群では 11.6 か月でした。

腫瘍の PD-L1 発現が CPS 5 以上、CPS 1 以上、および無作為化されたすべての患者における有効性評価項目：
ニボルマブと化学療法 (FOLFOX または CapeOX) 併用療法群および化学療法単剤投与群における全生存期間

表 1. 腫瘍の PD-L1 発現が CPS 5 以上、CPS 1 以上、および無作為化されたすべての患者における有効性の結果 (CHECKMATE-649 試験)

	ニボルマブと化学療法 (FOLFOX または CapeOX) の併用療法群 (n = 789)	化学療法群 (n = 792)
全生存期間 (CPS 5 以上)		
中央値 (月) (95 % CI) ^a	14.4(13.1, 16.2)	11.1(10.0, 12.1)
ハザード比 (98.4 % CI) ^b	0.71(0.59, 0.86)	
p 値 ^c	< 0.0001	
全生存期間 (CPS 1 以上)		
中央値 (月) (95 % CI) ^a	13.7(12.6, 15.0)	11.3(10.6, 12.3)
ハザード比 (99.3 % CI) ^b	0.77(0.64, 0.92)	
p 値 ^c	< 0.0001	
全生存期間 (無作為化されたすべての患者)		
中央値 (月) (95 % CI) ^a	13.8(12.55, 14.55)	11.6(10.87, 12.48)
ハザード比 (99.3 % CI)	0.80(0.68, 0.94)	
p 値 ^c	0.0002	
無増悪生存期間 ^d (CPS 5 以上)		
中央値 (月) (95 % CI) ^a	7.7(7.03, 9.17)	6.0(5.55, 6.90)
ハザード比 (98 % CI) ^b	0.68(0.56, 0.81)	
p 値 ^c	< 0.0001	
無増悪生存期間 (無作為化されたすべての患者)		
中央値 (月) (95 % CI) ^a	7.7(7.10, 8.54)	6.7(6.60, 7.13)
ハザード比 (95 % CI)	0.77(0.68, 0.87)	
全奏効率 (%) ^d (CPS 5 以上)	59.8	45.3
(95 % CI)	(54.7, 64.8)	(40.3, 50.4)
全奏効率 (%) ^d (無作為化されたすべての患者)	58	46.1
(95 % CI)	(54.0, 62.0)	(42.0, 50.1)

^a カプランマイヤー推定法

^b 層別 Cox 比例ハザードモデルに基づく

^c 層別ログランク検定に基づく

^d BICR によって判定

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、ホルマリン固定パラフィン包埋 (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 FFPE 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

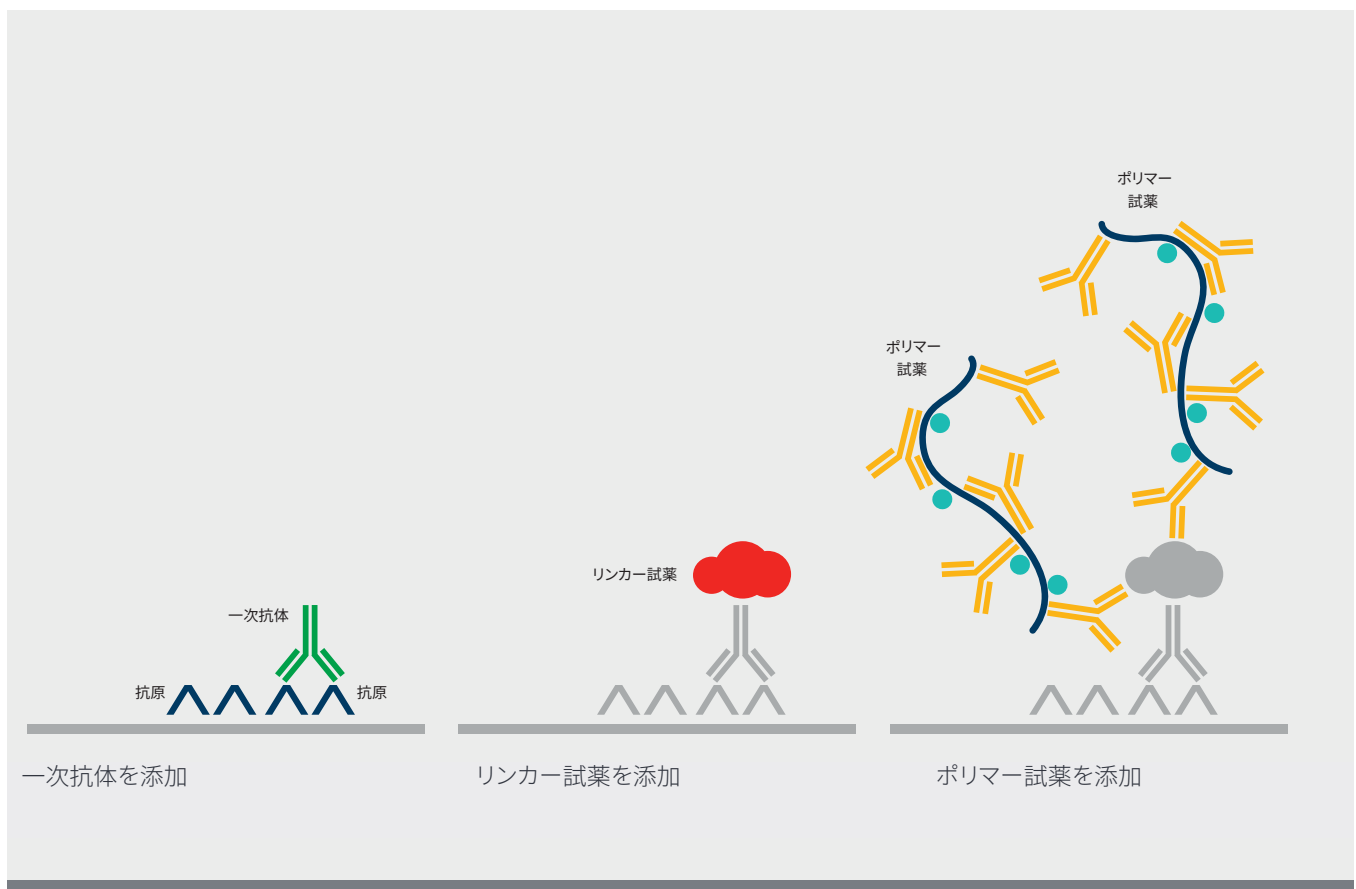


図 1a. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色手順

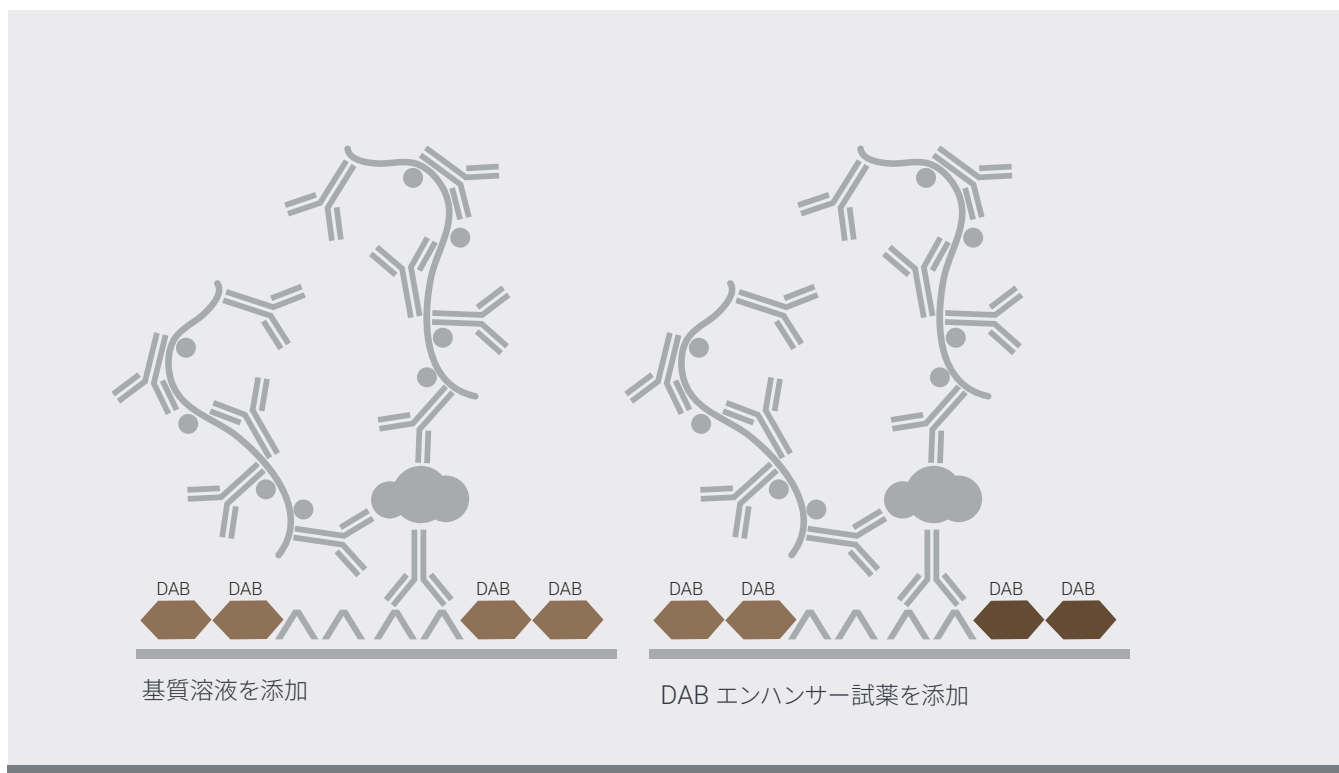


図 1b. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色手順



図 2. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色構成試薬

PD-L1 IHC 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 2）。

- 濃縮抗原賦活液
- ブロッキング試薬
- 一次抗体：抗 PD-L1 ウサギモノクローナル抗体 (Clone 28-8)
- 一次抗体陰性コントロール
- リンカー試薬
- ポリマー試薬
- 基質緩衝液
- 発色基質
- DAB エンハンサー試薬
- コントロールスライド

この他、ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20x) (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及ぼす 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。

施設内コントロール組織

検査室内での組織検体の処理および包埋方法のばらつきは、検査結果の不安定さを引き起こします。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。理想的な陽性対照のコントロール組織では、PD-L1 を染色した際に細胞膜に弱から中等度の強度に染色される腫瘍細胞が観察されます。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。

組織の前処理

FFPE 組織の使用が適しています。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、10 % の中性緩衝ホルマリンに 24 ～ 48 時間浸漬することを推奨します。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で順に処理した後、パラフィンに浸透させます。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 µm 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 ± 2 °C で 1 時間ベーキングします。

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（20x）

洗浄ステップ用に、ダコ Envision FLEX 洗浄液（20x）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（20x）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も、品質には影響しません。

- － 基質緩衝液のボトル全量を使用する場合は、発色基質を 9 滴加えます。基質緩衝液のボトルラベルには 7.2 mL と記載されていますが、これは使用可能な容積を示しており、実際には Dead volume 分の余分な基質緩衝液が含まれています。
- － 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 FFPE 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癌由来)。

**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/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。

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、ランの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）。
- － 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）（型番：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/所属：_____

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. 抗原賦活液は適切に調製されていますか？	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20x) は適切に調製されていますか？	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. 基質溶液は適切に調製されていますか？	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. 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"/>
14. 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て湿润状態を保っていますか？	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15. 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"/>
16. 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"/>
17. 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？ 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：_____

胃癌に対する 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 HE 染色ならびに本品中のコントロールスライドを検証することが必須です。HE 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、試薬の性能評価のために、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（NCR）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と単核炎症細胞（MIC）を陽性と判定します。細胞質染色は MIC のみ陽性とし、腫瘍細胞の細胞質染色は除外します。MIC はCPS の分子の評価に含め、PD-L1 染色の決定に含めてください。


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。

HE 染色した組織検体

組織構造および保存状態は、HE 染色標本で評価します。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」を用いた染色は、HE 染色と同一パラフィンブロックの連続切片に対して実施します。


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みなします。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

0	陰性
1+	弱陽性
2+	中等度陽性
3+	強陽性



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。

図 3. 本品中に含まれる各コントロールスライドには、PD-L1 発現が陽性および陰性の細胞の切片が含まれています。

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
- 細胞膜染色を認める細胞のうち、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

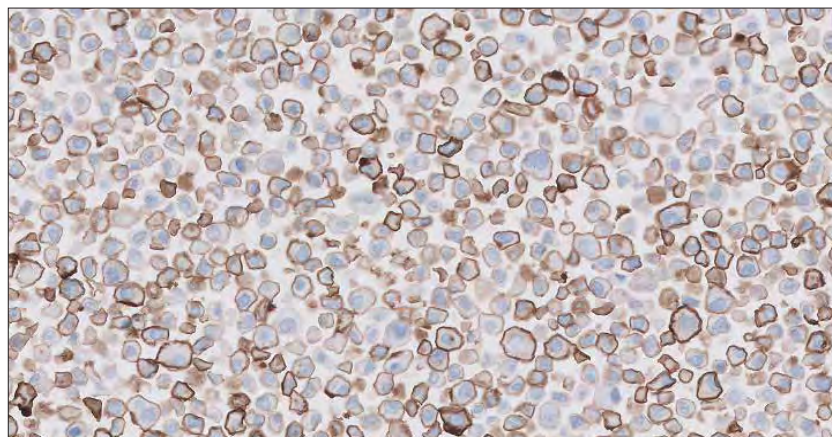


図 4. 条件を満たす染色性を示す PD-L1 陽性コントロール

PD-L1 陰性の条件として以下の染色所見を満たすことを確認する（図 5）。

- 細胞膜染色を認めない
- すべての非特異的な染色の強度が 1+ 未満に抑えられている

陰性コントロール細胞内に数個の染色された細胞を観察する場合があります。その場合でも、10 個以下の場合または、強度 1+ 以上でも細胞質が染色されている場合、陰性条件を満たすものと判断します。

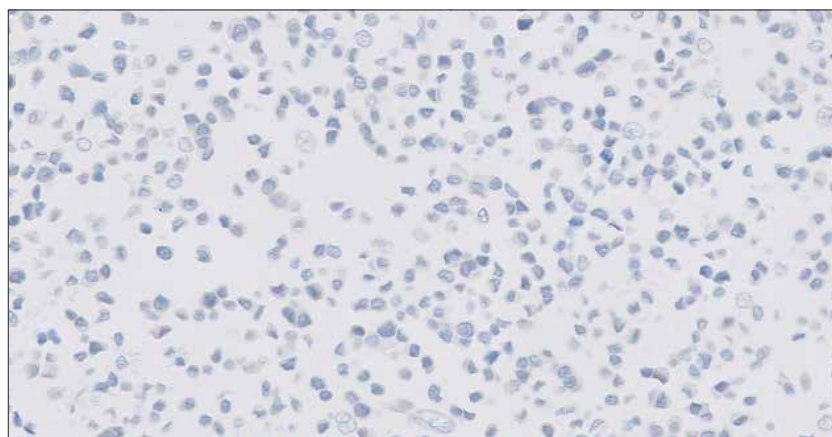


図 5. 条件を満たす染色性を示す PD-L1 陰性コントロール

陽性対照のコントロール組織スライド

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。すべての非特異的な染色の強度は 1+ 以下のはずです。評価の際は、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みなします。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

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。すべての非特異的な染色の強度は 1+ 以下のはずです。陰性対照のコントロール組織で、腫瘍細胞の細胞膜に染色を認めた場合は、すべての組織検体結果を無効と判定します。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ければ染色過程は良好であり、非特異的染色は染色強度が 1+ 以下のはずです。良好でない場合は、該当する組織検体の結果を無効とみなします。

一次抗体陰性コントロールで染色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。

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染色と比較しながら行います。

評価を実施するには、PD-L1 が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 ～ 20 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。 壊死細胞または細胞片は除外します。 非特異的な細胞質染色がもしあれば除外します。
2	PD-L1 発現を確認するには、20 倍の対物レンズが必要です。腫瘍細胞は、強度を問わず細胞膜が部分的または完全に染色されている場合、PD-L1 陽性と判断されます。MIC は、強度を問わず細胞膜または細胞質が部分的または完全に染色されている場合、陽性と判断されます。
3	検体全体の CPS を算出する場合、分子は染色された腫瘍細胞および腫瘍関連 MIC（リンパ球およびマクロファージ [^] ）の数であり、分母は検体中の腫瘍細胞の総数です。検体の PD-L1 発現率が CPS 5 以上かどうかを記録します。

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数 (腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ[^])}}{\text{全腫瘍細胞数}} \times 100^*$$

[^]マクロファージと組織球は同じ細胞と判断します。

*注：計算結果が CPS 100 を超えた場合でも、最大 CPS は 100 とします。

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
- 細胞の鑑別のため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
- 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。

スライド評価フローチャート

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、13 ～ 16 ページをご参照ください。

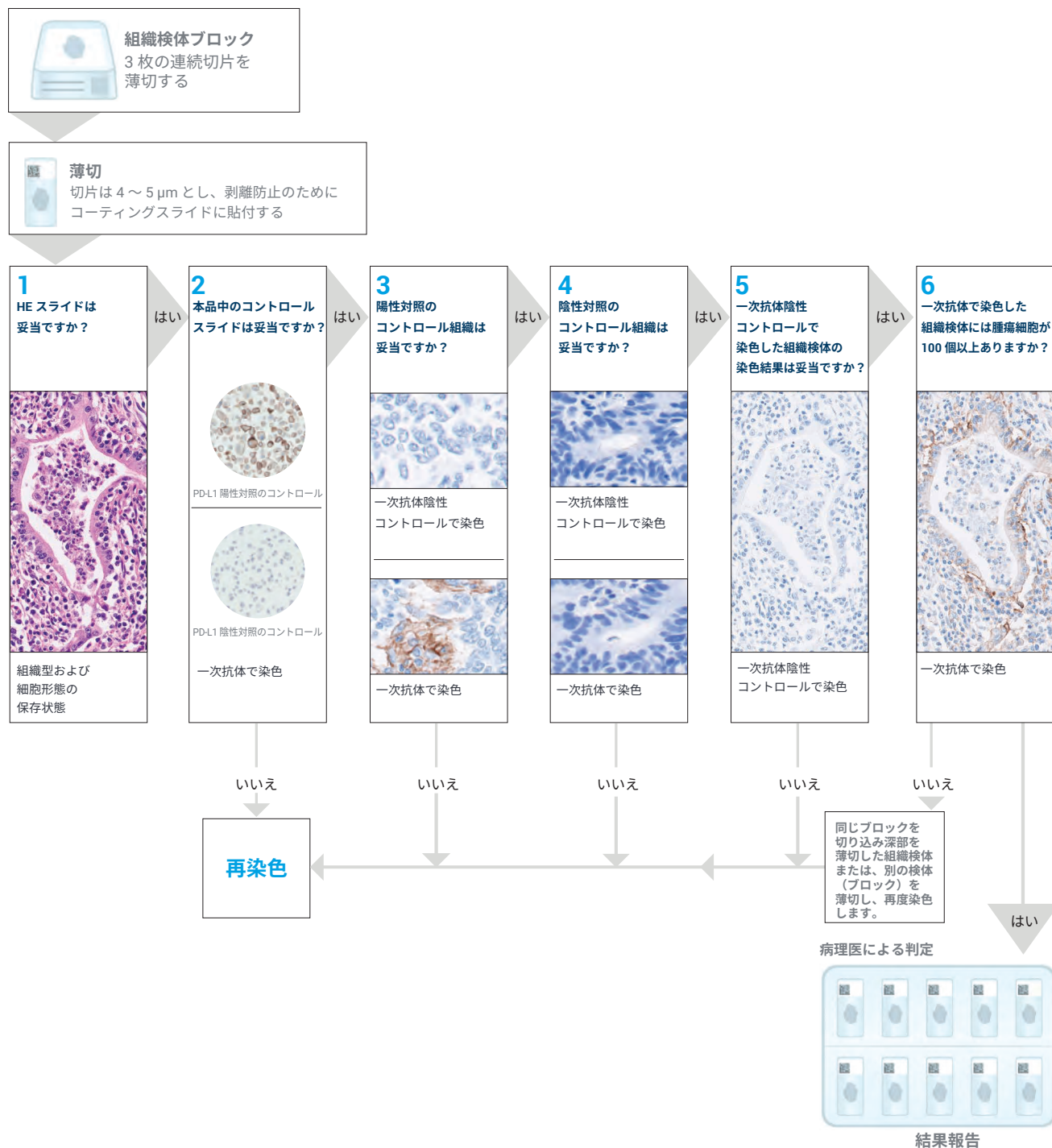


図 6. スライド評価手順のステップ

Combined Positive Score (CPS)

Combined Positive Score (CPS) の定義

未治療と考えられる患者については、胃癌における PD-L1 発現率は、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。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。

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数 (腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ[^])}}{\text{全腫瘍細胞数}} \times 100^*$$

[^]マクロファージと組織球は同じ細胞と判断します。

*注：計算結果が CPS 100 を超えた場合でも、最大 CPS は 100 とします。

表 2. 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	浸潤し、転移した胃癌を対象とした、明瞭な部分的または完全な細胞膜染色（強度は問わない）	<ul style="list-style-type: none"> 陰性腫瘍細胞 細胞質染色のみの腫瘍細胞 異形成 上皮内癌
免疫細胞	腫瘍巣および隣接する支持間質組織 [†] 内に存在する単核炎症細胞（MIC）の細胞膜または細胞質 [*] 染色（強度は問わない）： <ul style="list-style-type: none"> リンパ球（リンパ球凝集を含む） マクロファージ[‡] 20 倍視野内で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	<ul style="list-style-type: none"> 陰性 MIC 腫瘍に関連しない MIC（リンパ球凝集を含む） 上皮内癌に関連する MIC 良性病変に関連する MIC 好中球、好酸球および形質細胞
その他の細胞	含まれない	<ul style="list-style-type: none"> 正常細胞 間質細胞（線維芽細胞を含む） 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、細胞膜染色と細胞質染色を判別できない場合があります。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 倍視野内に存在すると定義されます。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判断します。

表 3.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	浸潤腫瘍細胞および転移細胞を含む全腫瘍細胞	<ul style="list-style-type: none"> すべての壊死細胞、または非生存腫瘍細胞 異形成 上皮内癌
免疫細胞	含まれない	すべての種類の全免疫細胞
その他の細胞	含まれない	<ul style="list-style-type: none"> 正常細胞 間質細胞（線維芽細胞を含む） 壊死細胞または細胞片

Combined Positive Score (CPS) の決定

- 免疫組織化学染色の評価には、4 ～ 20 倍の対物レンズが適しています。腫瘍領域全体を検証し、PD-L1 陽性及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（生検または切除検体）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な細胞を得られる場合があります。ブロックを切り込み深部を薄切した組織検体や別の検体を用いて、再度染色する場合は、病理医と相談した上で行ってください。
- PD-L1 発現の判定には、20 倍の対物レンズが必要です。PD-L1 発現の評価および CPS の計算：**
 - 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 陽性の腫瘍細胞、リンパ球およびマクロファージの数を決定します（CPS の分子）。
 - その他の CPS の組み入れ/除外基準については、23 ページの表 2 および 24 ページの表 3 を参照してください。
 - CPS を計算します。

Combined Positive Score (CPS) の算出に関して推奨されるスコアリング方法

スコアリングは病理医が実施してください。ここでは例として 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 CPS を決定する方法として参考になしてください。

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

第一に：23 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 %

第二に：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）を概算します。

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。

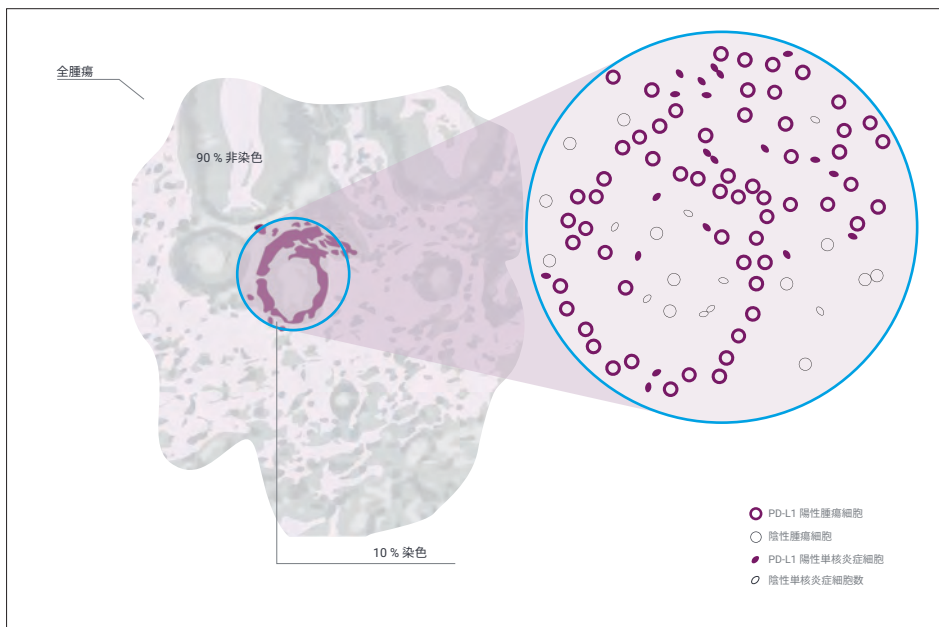


図 7. PD-L1 の染色領域が小さい腫瘍の例

腫瘍細胞領域全体の CPS を計算します。

判定：

染色領域の CPS：

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数}^{\ast}}{\text{全腫瘍細胞数}} \times 100 = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数約 80 個}}{\text{腫瘍細胞数 100 個}} \times 100 = 80$$

[＊]腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ

全腫瘍領域の CPS：

$$10\% \times 80 \approx \text{CPS } 8$$

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

第一に：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。

第二に：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 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。

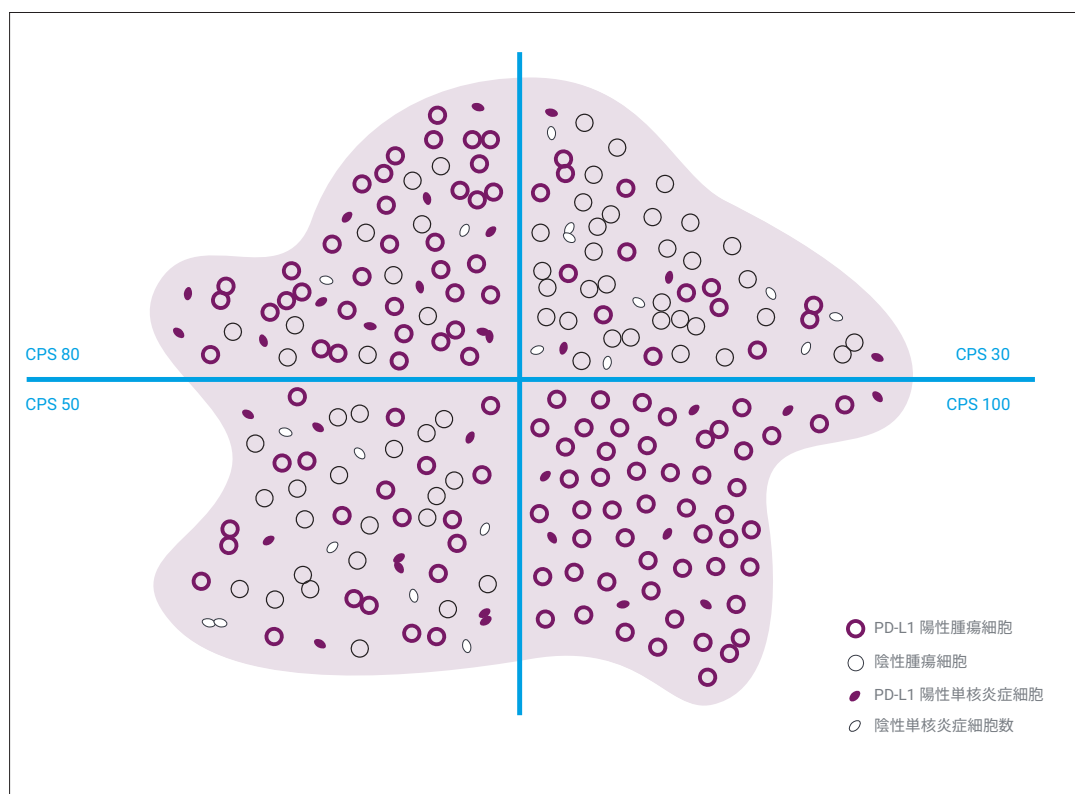


図 8. PD-L1 染色領域が不均一な検体の例

腫瘍細胞領域全体の CPS を計算します。

判定：

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数}^*}{\text{全腫瘍細胞数}} \times 100$$

* 腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ

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

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

第一に：23 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。

第二に：低倍率では非染色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（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。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 10 個存在します。全検体中に生存腫瘍細胞が 200 個存在します。

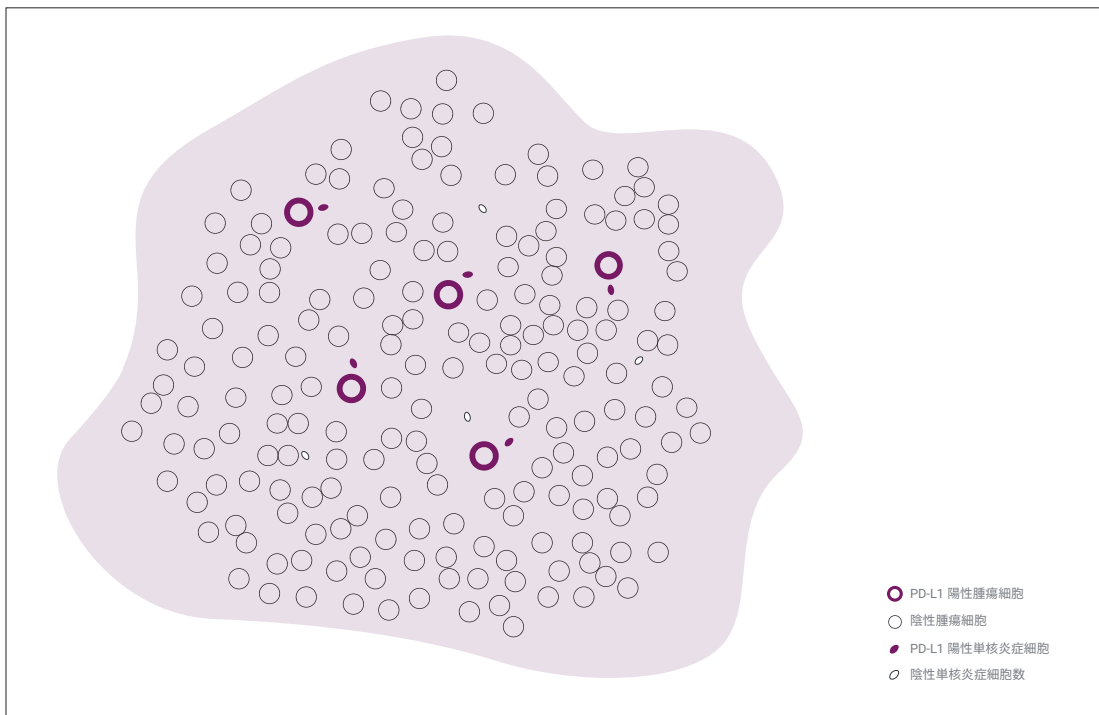


図 9. カットオフ付近の検体の例

腫瘍細胞領域全体の CPS を計算します。

判定：

染色領域の CPS

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数}^*}{\text{全腫瘍細胞数}} \times 100 = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数 10 個}}{\text{腫瘍細胞数 200 個}} \times 100 = \text{CPS 5}$$

* 腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ

胃癌症例のさまざまな染色像とその解釈

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。

CPS は PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の結果を決定します。以下のページに、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、29 ページ（結果報告フォーム）をご参照ください。以下の表 10 は PD-L1 発現なしまたはありのカットオフ付近の検体を示しています。

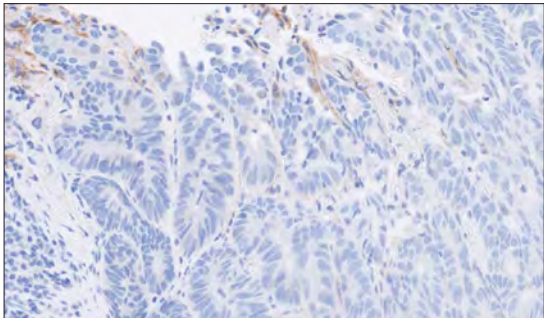
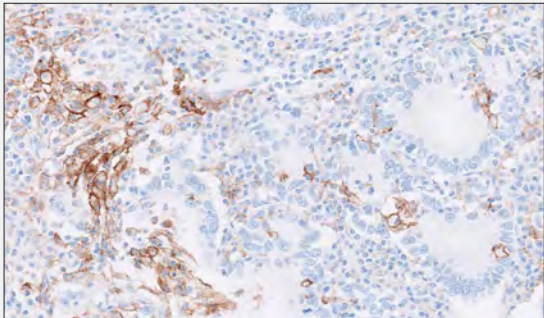
CPS	発現レベル	画像(対物レンズ 20 倍)
< 5	PD-L1 発現なし	
≥ 5	PD-L1 発現あり	

図 10. カットオフ付近の検体の例

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」

結果報告：胃癌

胃癌に対する 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：SK00502-2J

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 ☐

組織検体、一次抗体陰性コントロール組織スライド 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（フルオロピリミジン（FOLFOX）またはオキサリプラチン（XELOX））の併用療法を行う胃癌患者の特定のための補助に用います。

生存腫瘍細胞の存在： ☐ 100 細胞以上 ☐ 不適正

☐ $5 \leq \text{CPS}$ ☐ $1 \leq \text{CPS} < 5$ ☐ $\text{CPS} < 1$

病理医のコメント：_____

胃癌の Combined Positive Score (CPS) 要約および免疫染色例

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色結果の CPS の要約

胃癌における 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（強度は問わない）のある腫瘍細胞。
- ー 細胞膜染色または細胞質染色（強度は問わない）のある、腫瘍巣や隣接する支持間質組織内単核炎症細胞（MIC：リンパ球およびマクロファージ[^]）。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。

胃癌における 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 CPS によって決定します。

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数 (腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ[^])}}{\text{全腫瘍細胞数}} \times 100^*$$

[^]マクロファージと組織球は同じ細胞と判断します。

*注：計算結果が CPS 100 を超えた場合でも、最大 CPS は 100 とします。

この章は、CPS を正しく決定するための CPS の組み入れおよび除外の基準を定義および説明します。図に別途説明のない限り、画像はすべて腺癌のものであります。

CPS に組み入れられる細胞および除外される細胞

適切な PD-L1 発現を示す CPS に含めた PD-L1 染色細胞を PD-L1 陽性細胞と定義します。PD-L1 陽性細胞は CPS の分子に含めて CPS を算出します（その他の CPS 組み入れ/除外基準については、23 ページの表 2 および 24 ページの表 3 を参照）。生存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。

CPS に含まれる腫瘍細胞

明瞭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、20 倍までの対物レンズでははっきりと認識できなければなりません。明瞭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。

部分的および完全な細胞膜染色

一次抗体で染色した胃食道接合部癌・扁平上皮癌検体。腫瘍細胞の部分的（赤色矢印）および完全な（黒色矢印）細胞膜染色が認められます。強度を問わず部分的または完全な細胞膜染色を示す腫瘍細胞は CPS の分子に含めます。

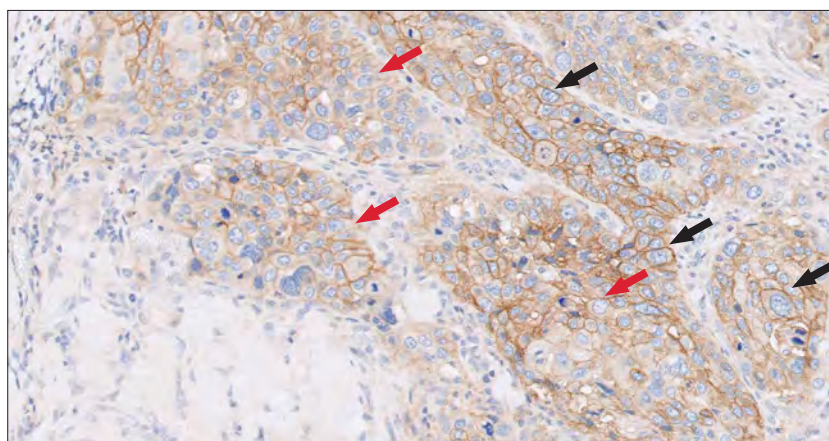


図 11. 対物レンズ 20 倍

強度 1 ～ 3+ の細胞膜染色

一次抗体で染色した食道癌・扁平上皮癌検体（赤色矢印）。腫瘍細胞に主に強度 1+ の細胞膜染色が認められます。

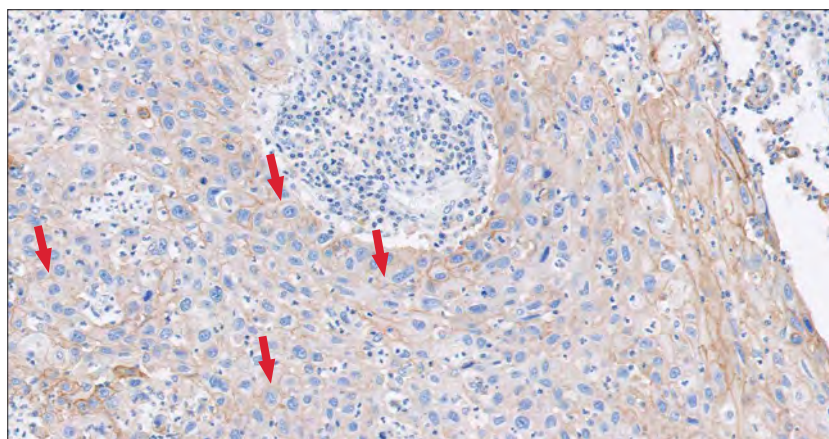


図 12. 対物レンズ 20 倍

強度 1 ～ 3+ の細胞膜染色

一次抗体で染色した食道癌・扁平上皮癌検体（赤色矢印）。腫瘍細胞に主に強度 2+ の細胞膜染色が認められます。

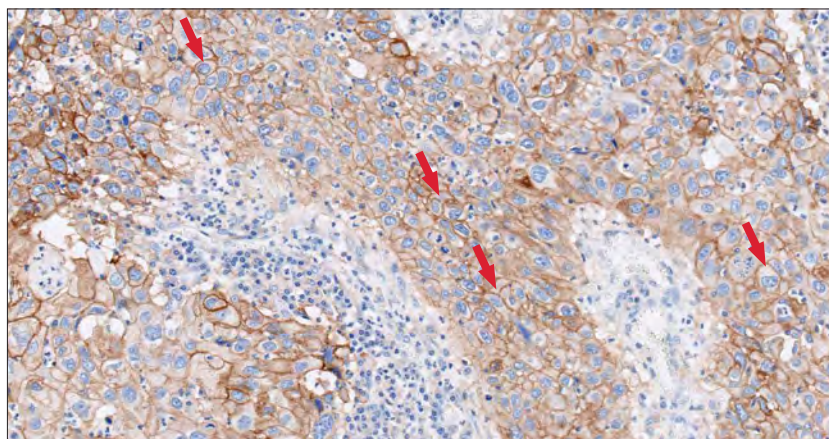


図 13. 対物レンズ 20 倍

強度 1 ～ 3+ の細胞膜染色

一次抗体で染色した胃癌検体（赤色矢印）。腫瘍細胞に主に強度 3+ の細胞膜染色が認められます。

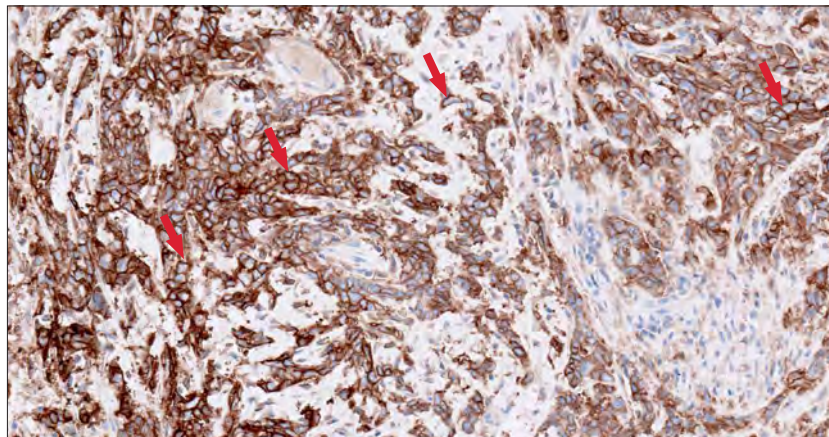


図 14. 対物レンズ 20 倍

重要事項

強度を問わず明瞭な部分的または完全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

一次抗体で染色した食道癌・扁平上皮癌検体（黒色矢印）。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。対物レンズ 20 倍で、細胞質染色とは区別される明瞭な細胞膜染色を示す腫瘍細胞は CPS の分子に含めます。細胞質染色のみを示す腫瘍細胞は CPS の分子から除外します。

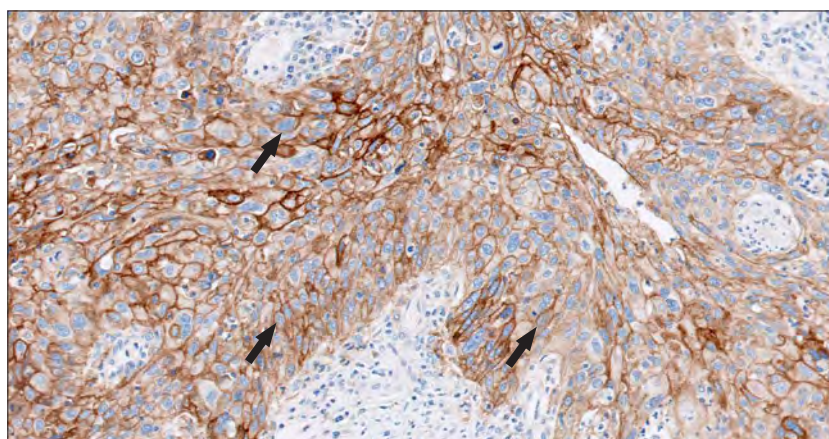


図 15. 対物レンズ 20 倍

細胞膜染色および顆粒状染色

一次抗体で染色した食道癌・扁平上皮癌検体（黒色矢印）。顆粒状の細胞膜染色が認められます。

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染色パターンを示す場合があります。対物レンズ 20 倍で、明らかに細胞膜染色と判定できる腫瘍細胞のみを CPS の分子に含めます。

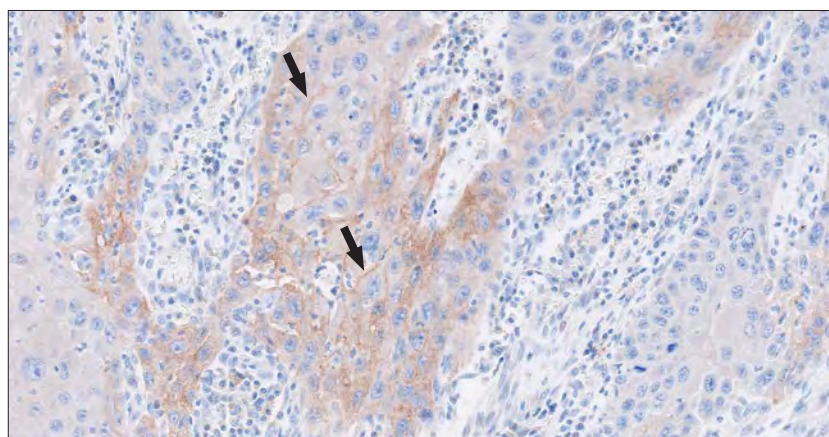


図 16. 対物レンズ 20 倍

重要事項

- 細胞質や顆粒状染色が存在す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。
- 細胞質や顆粒状染色が存在する区別できる細胞膜染色を示す腫瘍細胞は CPS の分子から除外します。

多核腫瘍細胞

胃癌、胃食道接合部癌、および食道腺癌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。

食道癌・扁平上皮癌検体。多核腫瘍細胞に細胞膜染色が認められます（黒色矢印）。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、分子および分母に含めます。

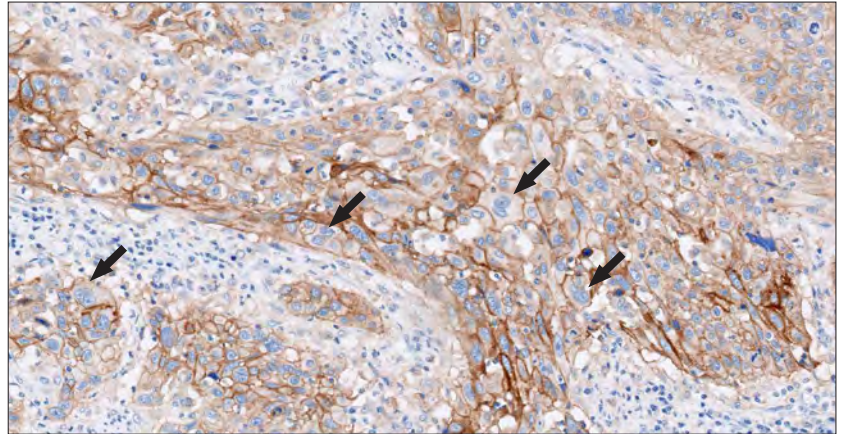


図 17. 対物レンズ 20 倍

印環細胞癌

印環細胞はびまん性の胃癌および胃食道接合部癌によく存在します。この腫瘍細胞の核は小さく、三日月形をしており、細胞の辺縁部に存在します。印環細胞は CPS の分母を計算する際に含めてはいけないうマクロファージと見間違ふ可能性があります。

一次抗体で染色した胃食道接合部癌検体と印環細胞の形態を示します。対物レンズ 20 倍で、強度を問わず明瞭な部分的または完全な細胞膜染色を示す印環細胞は PD-L1 陽性と考えられるため、CPS の分子に含めます。

細胞質染色のみを示す印環細胞は、非特異的染色と考えられるため、除外します。

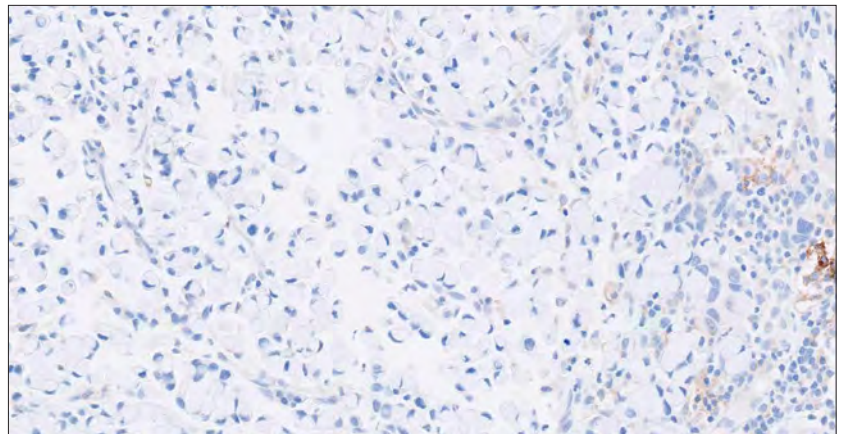


図 18. 対物レンズ 20 倍

重要事項

- 多核腫瘍細胞は 1 細胞として数えます。
- PD-L1 陽性の多核腫瘍細胞および印環細胞は CPS の分子に含めます。

腫瘍細胞密度パターン

胃癌には、さまざまな形態が含まれますので、分母に含まれる総腫瘍細胞数を増加または減少させることで CPS が影響を受ける可能性があります。細胞質の豊富な高分化腫瘍細胞のある扁平上皮細胞構成は、一般に 20 倍視野での細胞数は少ないですが、低分化の類基底のパターンでは、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増えると、全体スコアを CPS 5 以上に上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。目安として、腫瘍細胞が直径 20 μm で 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。

低密度

一次抗体で染色した胃食道接合部癌検体では、細胞質の豊富な高分化腫瘍細胞が認められます。

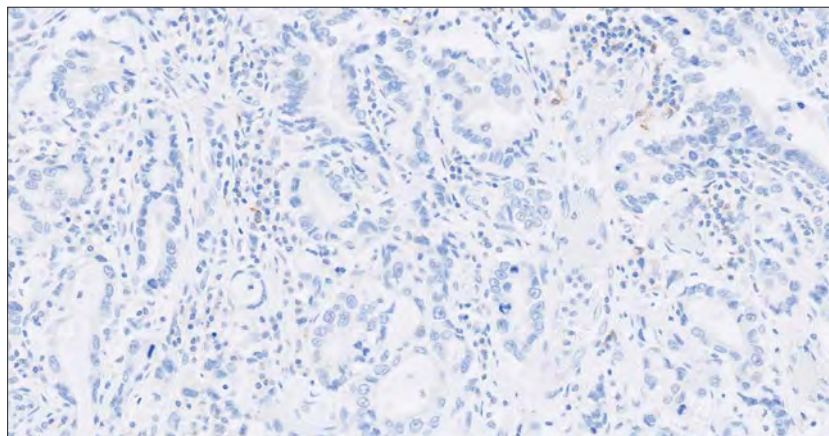


図 19. 対物レンズ 20 倍

中密度

胃食道接合部癌検体。中分化腫瘍細胞が認められます。高い増殖率を示す、高い細胞密度が認められます。

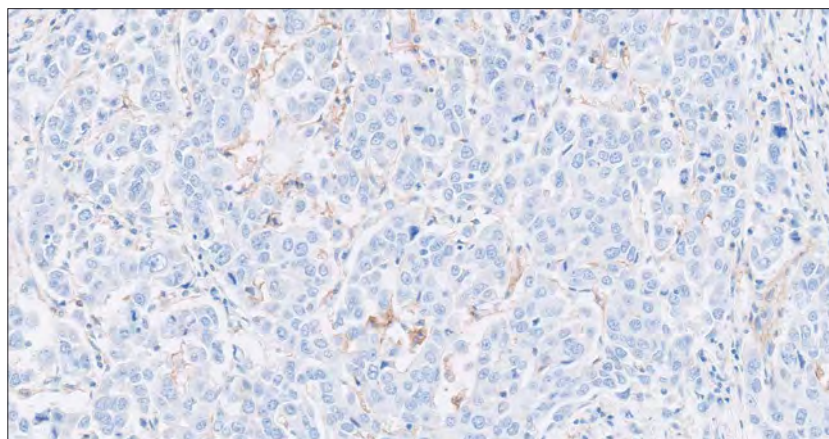


図 20. 対物レンズ 20 倍

高密度

胃癌検体。低分化基底腫瘍細胞が認められます。

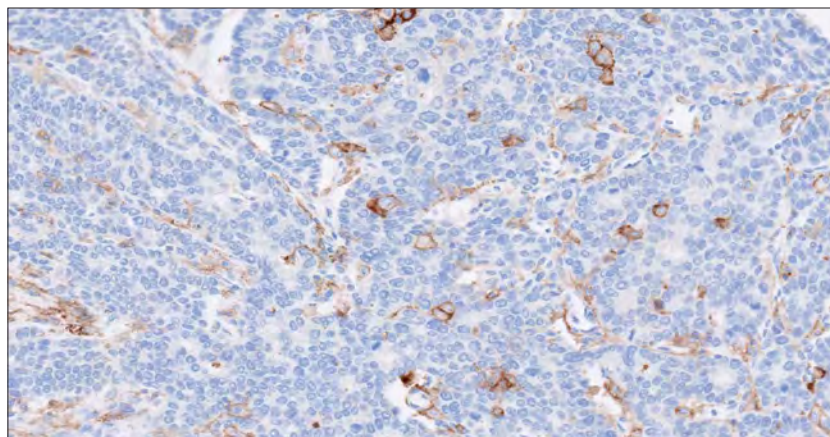


図 21. 対物レンズ 20 倍

重要事項

腫瘍細胞密度パターンによって、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 に含まれる免疫細胞

腫瘍関連単核炎症細胞（MIC）

対物レンズ 20 倍で、強度を問わず細胞膜染色または細胞質染色を示す、腫瘍関連単核炎症細胞（MIC：リンパ球およびマクロファージ）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、分子に含める腫瘍に対する反応に直接関連があります。

PD-L1 陽性リンパ球およびマクロファージ

一次抗体で染色した胃癌検体。腫瘍関連マクロファージ（黒色矢印）およびリンパ球（赤色矢印）の細胞膜染色または細胞質染色が認められます。

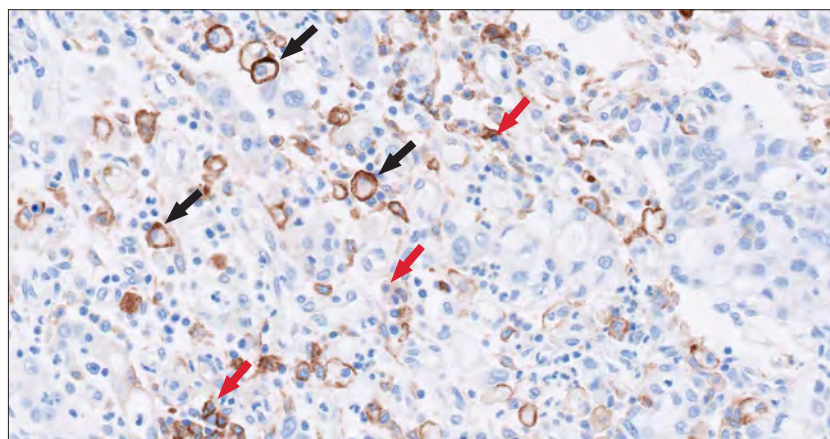


図 22. 対物レンズ 20 倍

PD-L1 陽性リンパ球

一次抗体で染色した胃食道接合部癌検体。腫瘍関連リンパ球（黒色矢印）の細胞膜染色または細胞質染色が認められます。

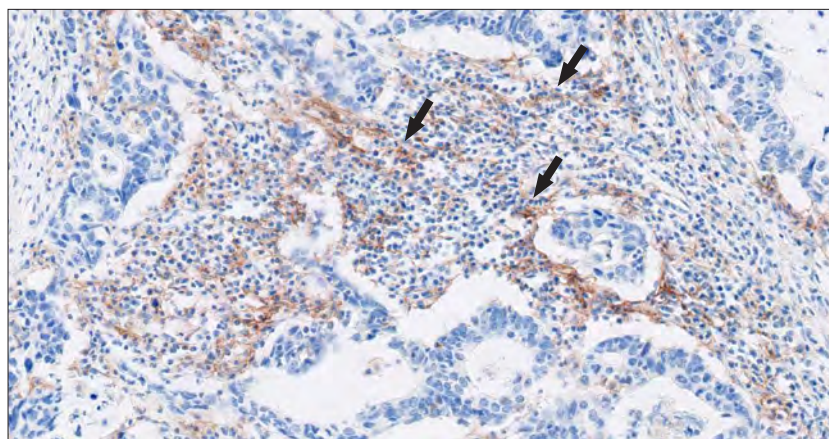


図 23. 対物レンズ 20 倍

PD-L1 陽性マクロファージ

一次抗体で染色した胃癌検体。腫瘍関連マクロファージ（黒色矢印）の細胞膜染色が認められます。

マクロファージの融合は、慢性炎症の結果として生じることがあります。PD-L1 陽性多核性マクロファージ（巨細胞）はそれぞれ 1 細胞として数え、分子に含めます。

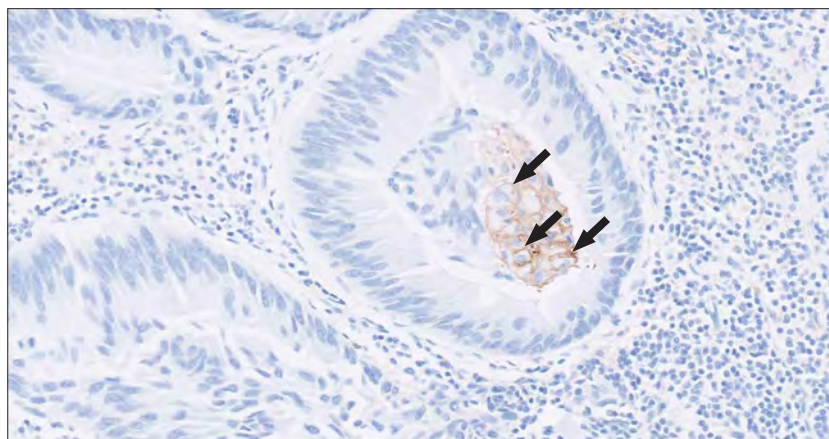


図 24. 対物レンズ 20 倍

重要事項

強度を問わず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。

20 倍の視野ルール

PD-L1 陽性 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は、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 陽性の 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 25 および 27 を参照してください。

一次抗体で染色した食道接合部癌・扁平上皮癌検体5 倍の対物レンズでは、陽性 MIC の複数の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。

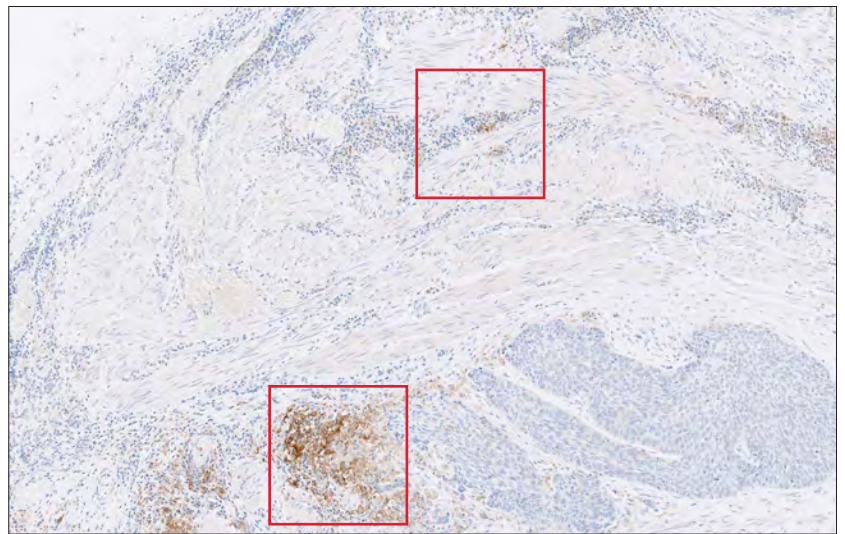


図 25. 対物レンズ 5 倍

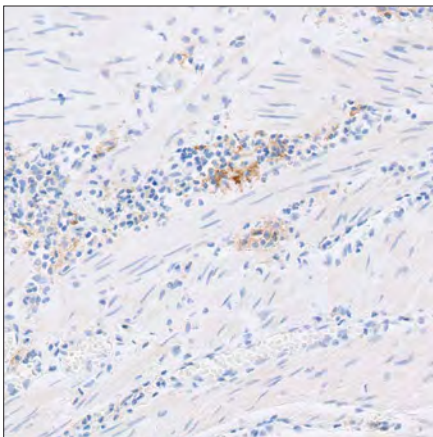


図 26. 対物レンズ 20 倍

PD-L1 陽性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、これらの細胞は分子には含めません。

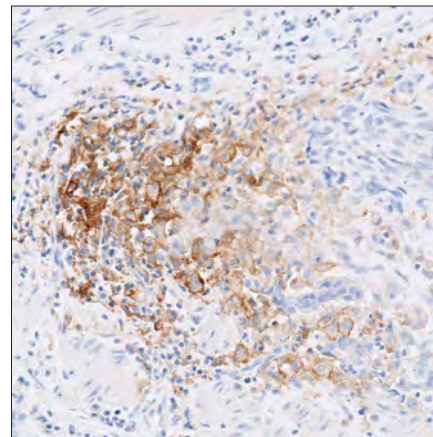


図 27. 対物レンズ 20 倍

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。

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。以下は PD-L1 発現を示すその他の一般的な細胞例ですが、CPS 計算（CPS の分子および分母）からは除外します。完全な組み入れ/除外基準については、23 ページの表 2 および 24 ページの表 3 を参照してください。

細胞質染色のみを示す腫瘍細胞

一次抗体で染色した食道癌・扁平上皮癌検体。細胞質染色のみが認められます。

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。

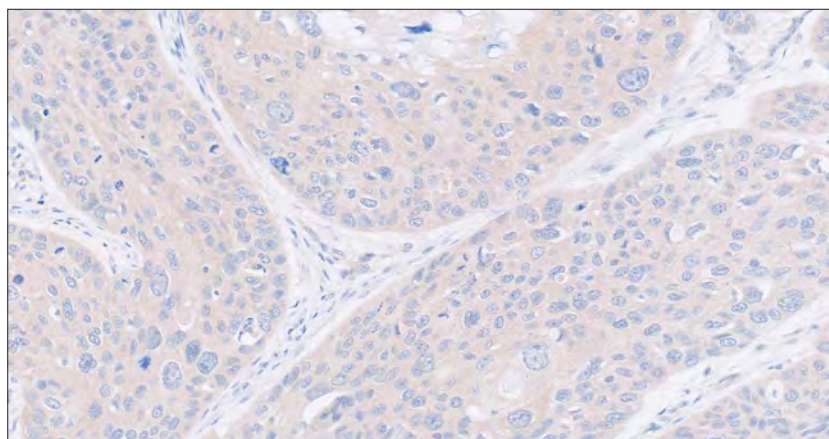


図 28. 対物レンズ 20 倍

中程度の細胞質染色の腫瘍細胞

一次抗体で染色した胃癌検体。細胞質と細胞膜の強い染色が認められます。一部の細胞膜は細胞質のバックグラウンド（赤色矢印）と区別できません（対物レンズ 20 倍）。

強い細胞質染色によって干渉された細胞膜染色は、CPS の分子および分母から除外します。大半の細胞膜染色が細胞質染色に干渉されている場合は、その検体を評価不適切 (NE) とします。

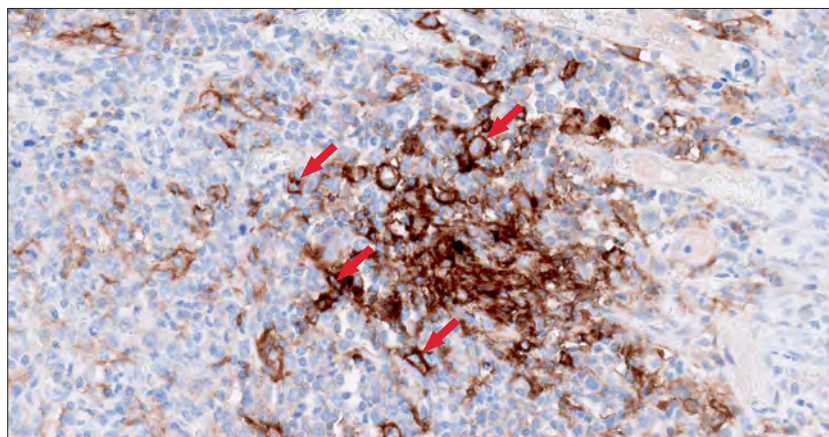


図 29. 対物レンズ 20 倍

重要事項

- 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。
- 強い細胞質染色によって干渉された細胞膜染色は、CPS の分子および分母から除外します

上皮内癌

上皮内癌（CIS）を示す食道癌・扁平上皮癌検体の HE 切片。箱枠で囲った部分は高倍率で以下に示しています。

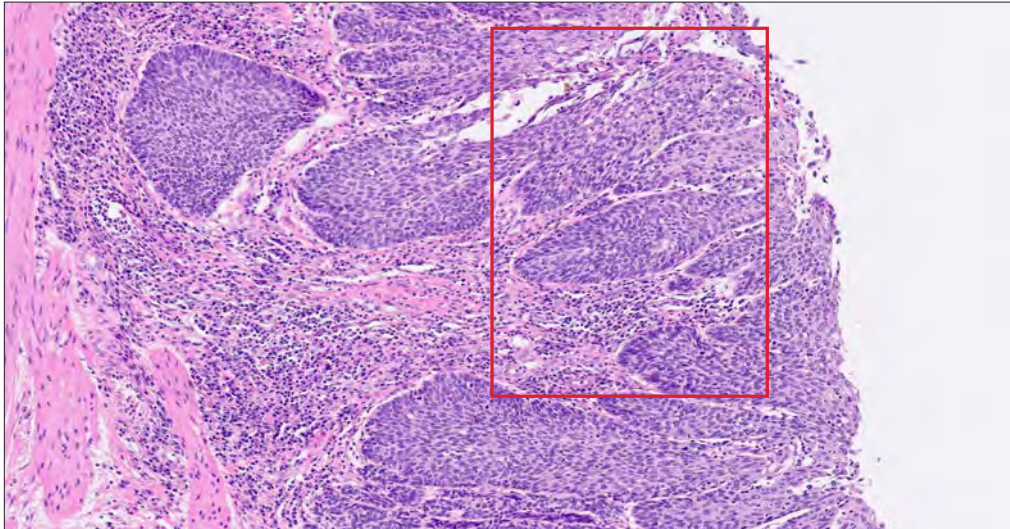


図 30 .対物レンズ 5 倍

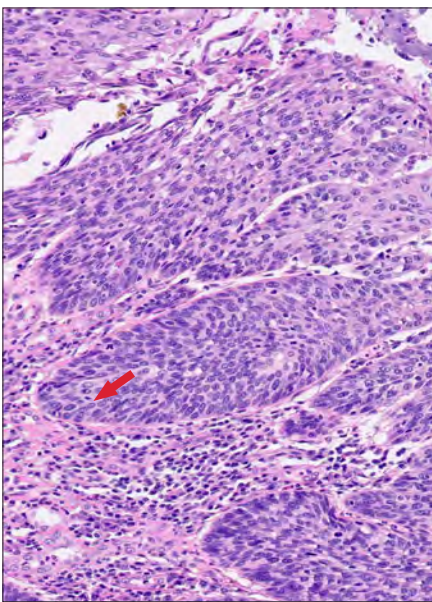


図 31. 対物レンズ 10 倍

CIS 構成（赤色矢印）に関与する腫瘍細胞を示す HE 切片。

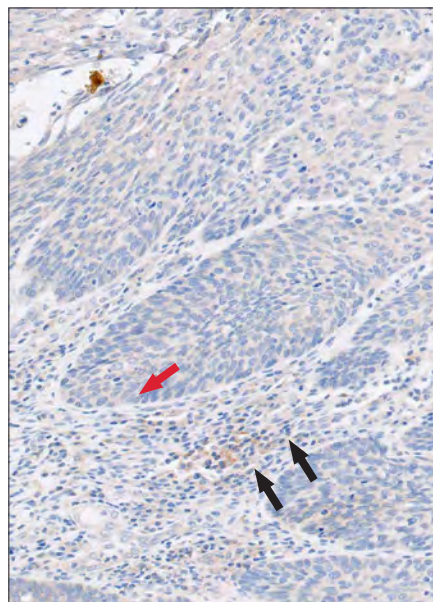


図 32. 対物レンズ 10 倍

腫瘍細胞が CIS 構成の一部である場合は、分子および分母（赤色矢印）から除外します。CIS 構成に関連する MIC（黒色矢印）は分子から除外します。

重要事項

CIS 構成に関連する腫瘍細胞や MIC はスコアリングから除外します。

正常な胃腺と関連する MIC

一次抗体で染色した胃癌検体。正常な胃腺と関連する MIC の染色が認められます。

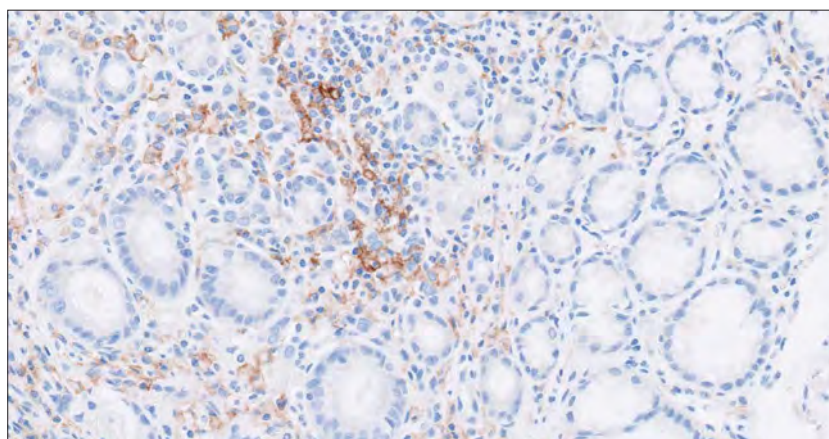


図 33. 対物レンズ 10 倍

胃炎に関連する MIC

一次抗体で染色した胃食道接合部癌検体。胃炎に関連する MIC の染色が認められます。慢性胃炎の特徴である形質細胞の増加が確認できます。

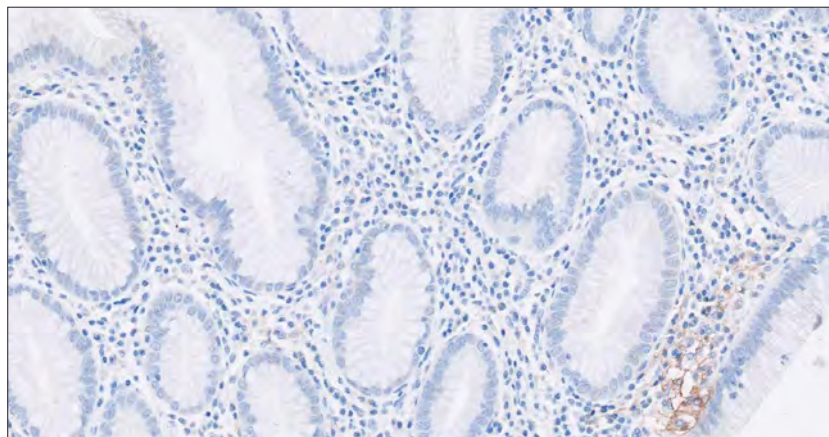


図 34. 対物レンズ 20 倍

非浸潤性異形成と関連する MIC

一次抗体で染色した胃食道接合部癌検体。腺異形成と関連する MIC の染色が認められます。

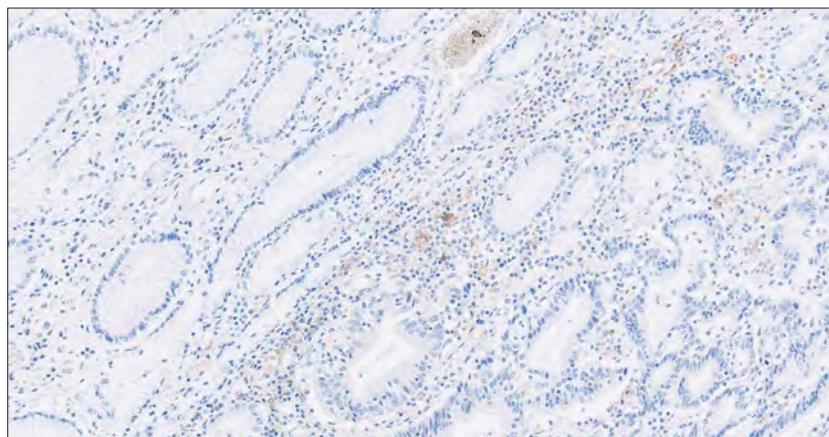


図 35. 対物レンズ 10 倍

重要事項

腫瘍に対する反応に関連していない PD-L1 陽性 MIC は分子から除外します。

良性の胃腺の染色

一次抗体で染色した胃癌検体。良性の胃腺の染色が認められます。良性の胃腺の染色は CPS から除外します。

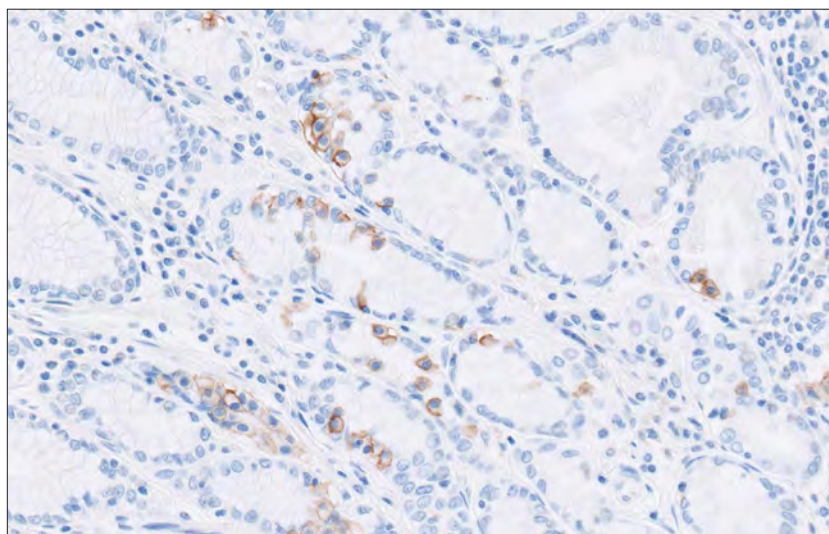


図 36. 対物レンズ 20 倍

良性の腺細胞の染色

一次抗体で染色した胃癌検体。浸潤性腫瘍細胞（黒色矢印）、良性腺細胞（赤色矢印）および内分泌細胞（青色矢印）の染色が認められます。良性の腺細胞および内分泌細胞の染色は CPS から除外します。

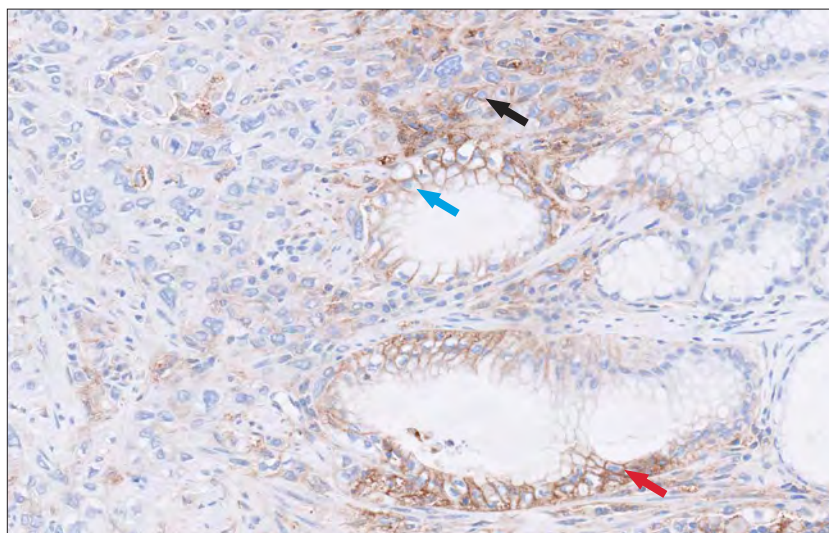


図 37. 対物レンズ 20 倍

重要事項

PD-L1 陽性の細胞は、分子から除外します。

線維芽細胞の染色

一次抗体で染色した胃癌検体。線維芽細胞（黒色矢印）の染色が認められますが、これは CPS から除外します。

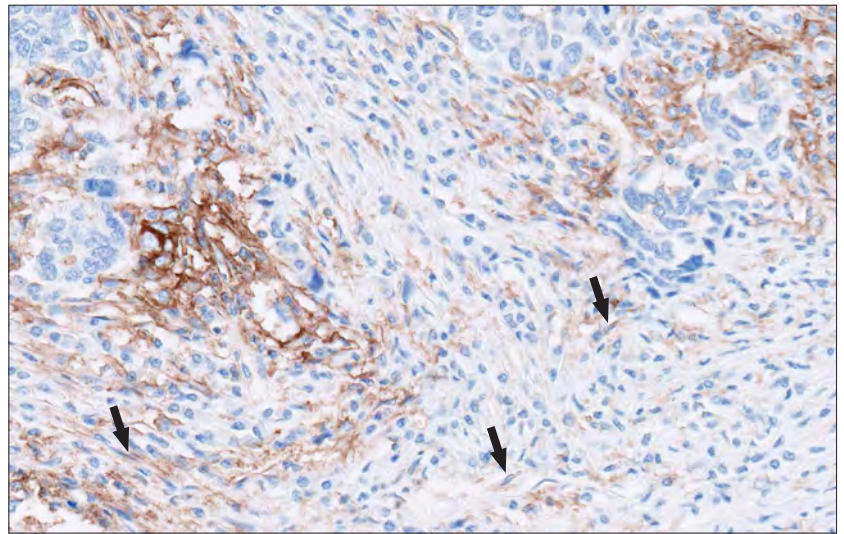


図 38. 対物レンズ 20 倍

神経節細胞の染色

一次抗体で染色した胃食道接合部癌検体。神経節細胞（黒色矢印）の染色が認められますが、CPS から除外します。

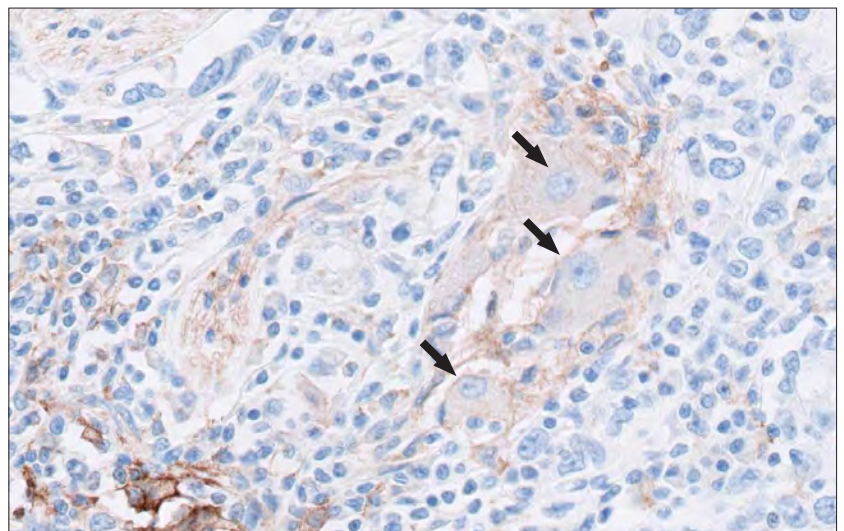


図 39. 対物レンズ 20 倍

正常な上皮の染色

一次抗体で染色した胃食道接合部癌検体。良性上皮細胞（赤色矢印）および関連する MIC（黒色矢印）の染色が認められますが、両方ともスコアリングから除外します。

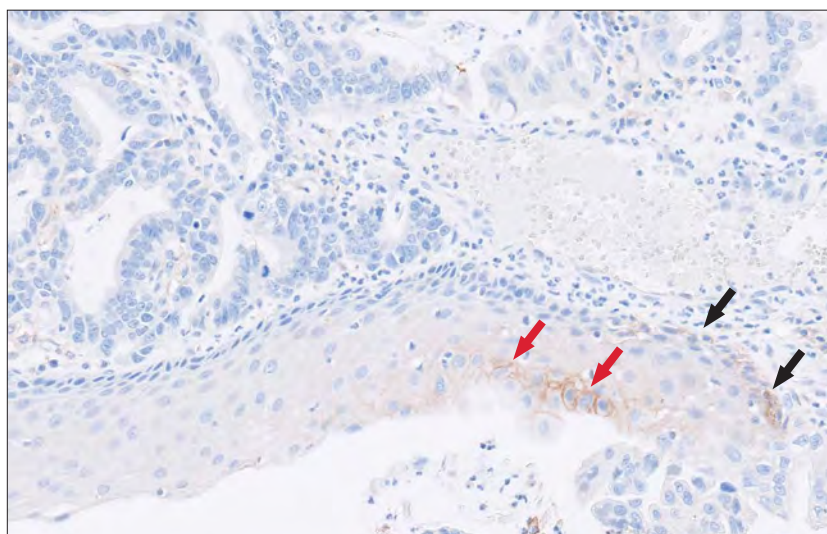


図 40. 対物レンズ 20 倍

潰瘍のある上皮の染色

一次抗体で染色した胃食道接合部癌・扁平上皮癌検体。良性潰瘍のある上皮細胞（赤色矢印）および関連する MIC（黒色矢印）の染色が認められますが、両方ともスコアリングから除外します。

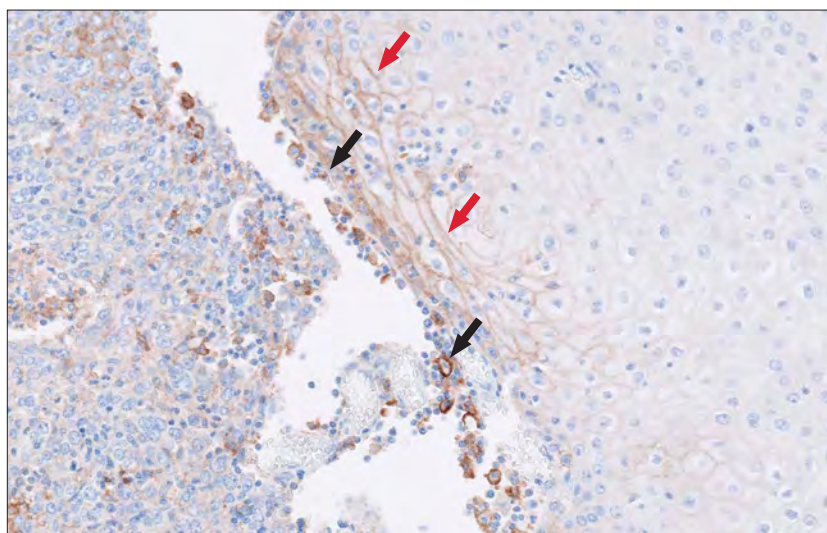


図 41. 対物レンズ 20 倍

重要事項

- ー PD-L1 陽性の正常細胞は、分子および分母から除外します。
- ー 腫瘍に対する反応に直接関連していない PD-L1 陽性の MIC は分子から除外します。

CPS から除外される免疫細胞

形質細胞

一次抗体で染色した胃癌検体。形質細胞（黒色矢印）の染色が認められますが、スコアリングから除外します。

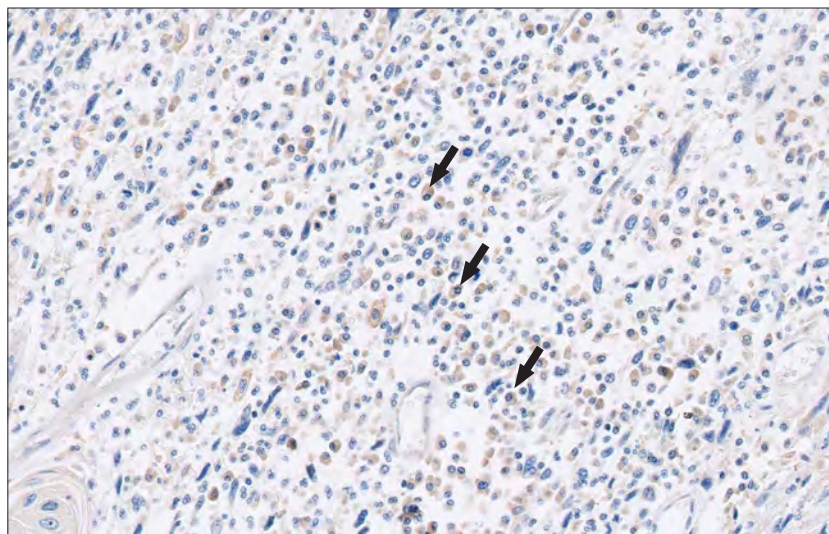


図 42. 対物レンズ 20 倍

好中球

一次抗体で染色した食道癌・扁平上皮癌検体。好中球（黒色矢印）の染色が認められますが、スコアリングから除外します。

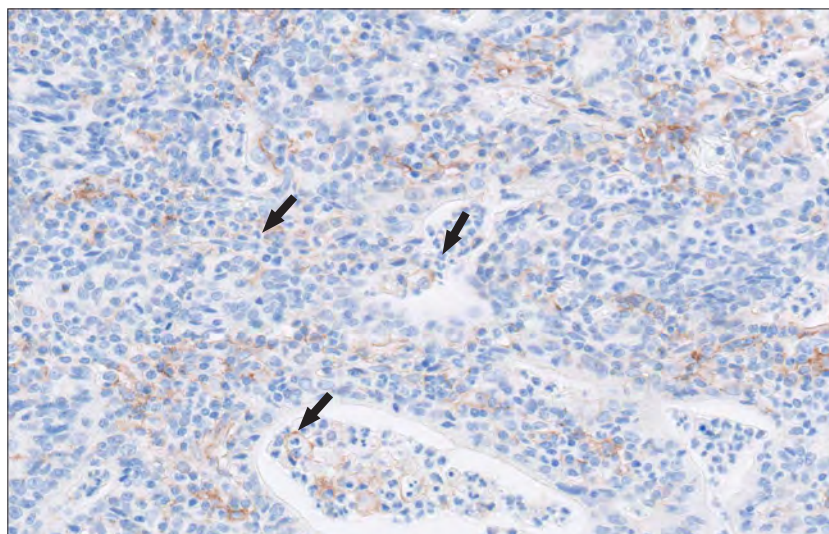


図 43. 対物レンズ 20 倍

重要事項

- 細胞質染色または細胞膜染色を示すリンパ球およびマクロファージのみを分子に含めます。
- 形質細胞、好中球および好酸球は CPS の分子から除外します。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の胃癌症例

CPS 0 の症例

一次抗体で染色した CPS 0 を示す
胃癌検体。

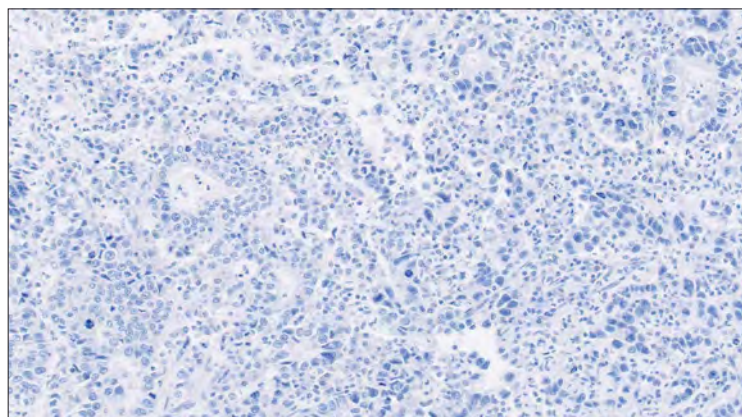


図 44. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 0 を示す
胃食道接合部癌検体。

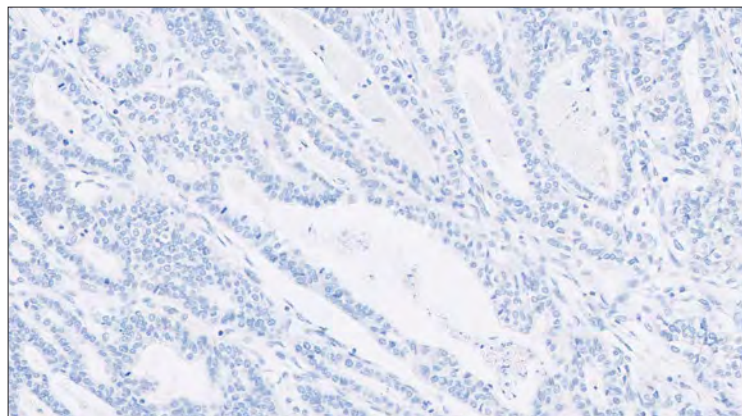


図 45. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 0 を示す
食道癌・扁平上皮癌検体。

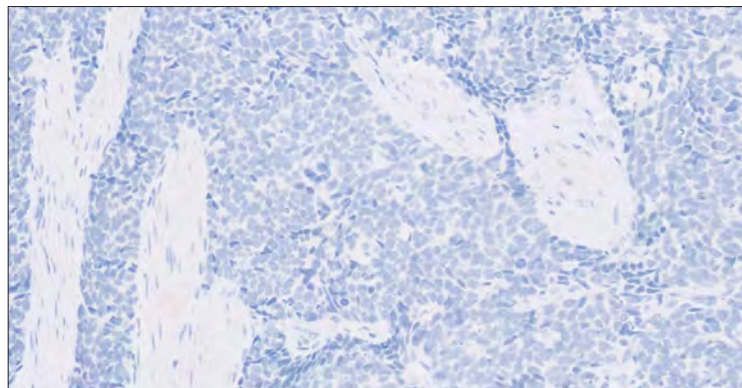


図 46. 対物レンズ 20 倍

判定が困難な症例：CPS < 1

一次抗体で染色した CPS 1 未満を示す胃癌検体。

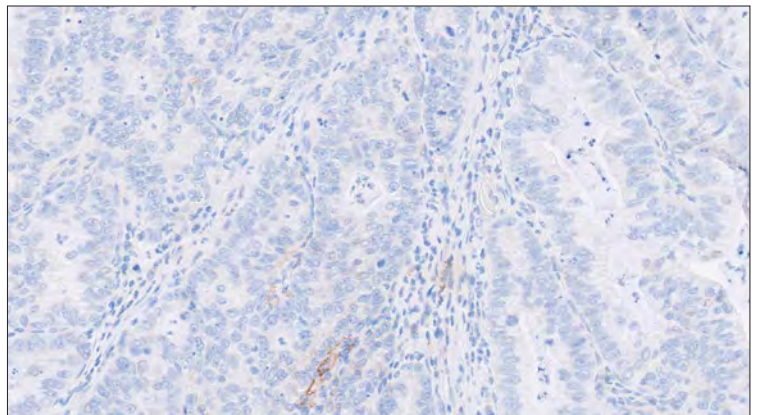


図 47. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 1 未満を示す胃食道接合部癌検体。

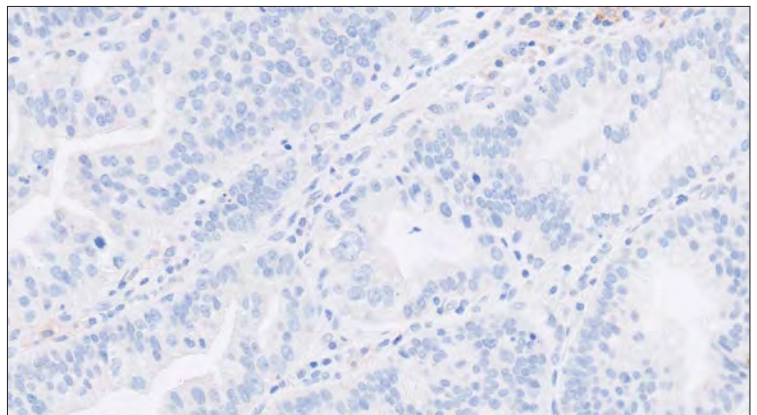


図 48. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 1 未満を示す食道腺癌検体。

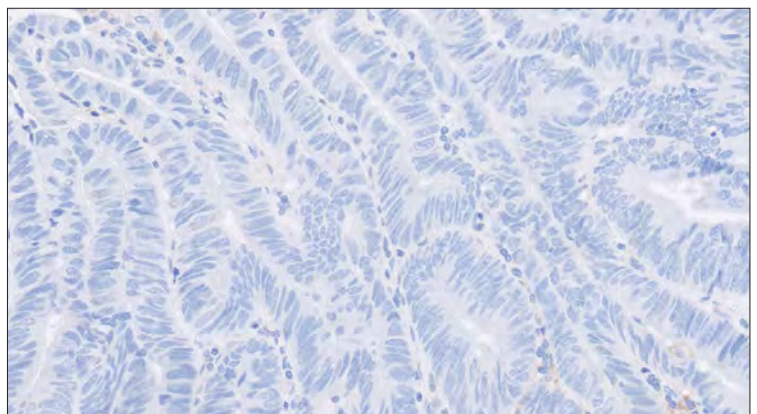


図 49. 対物レンズ 20 倍

判定が困難な症例：CPS 1 ～ 4

一次抗体で染色した CPS 1 を示す
胃癌検体。

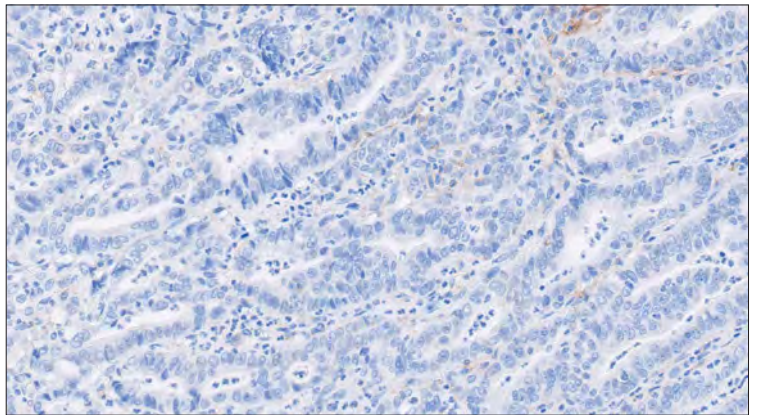


図 50. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 3 を示す
胃食道接合部癌・扁平上皮癌検体。

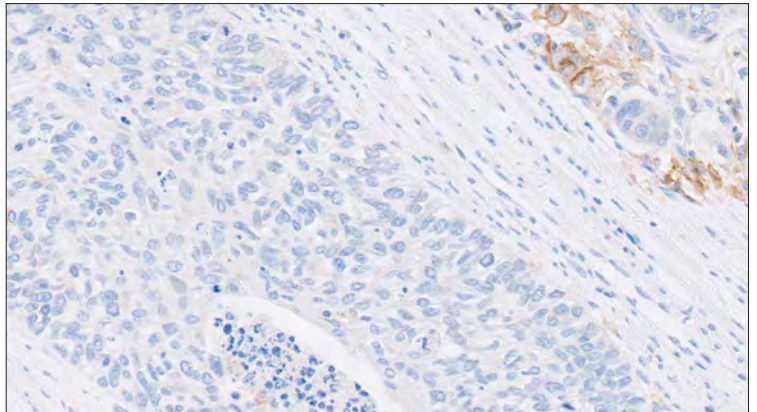


図 51. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 2 を示す
食道腺癌検体。

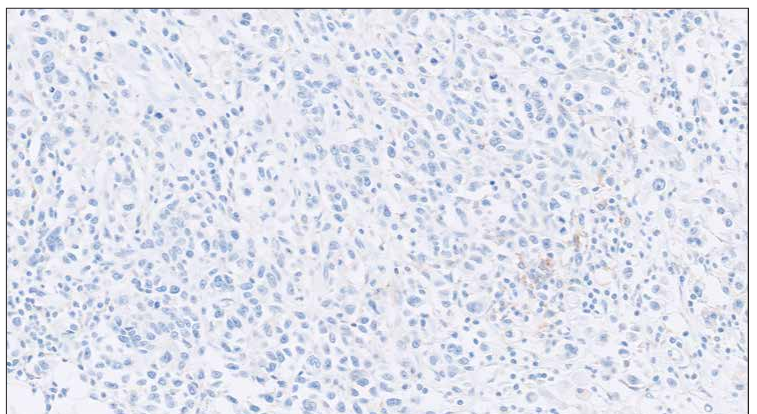


図 52. 対物レンズ 20 倍

判定が困難な症例：CPS 1 ～ 4

一次抗体で染色した CPS 1 を示す
胃癌検体。

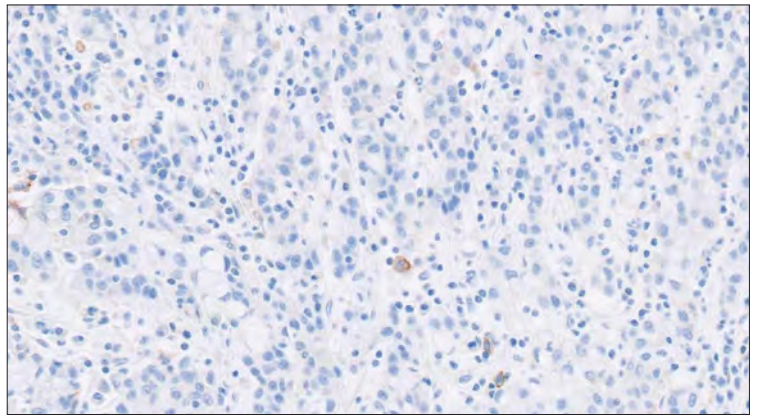


図 53. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 2 を示す
胃食道接合部癌検体。

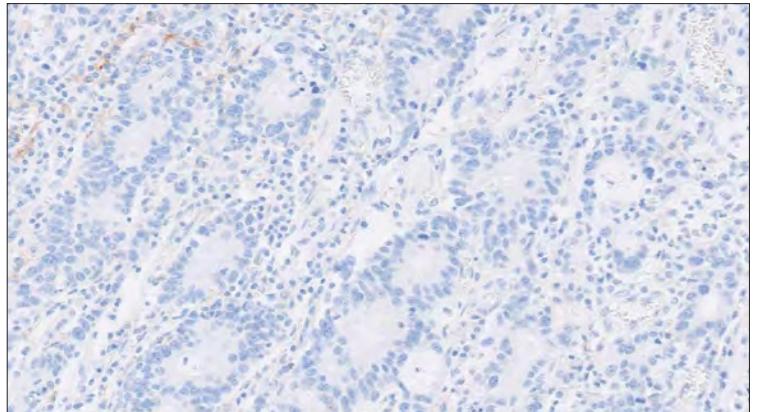


図 54. 対物レンズ 20 倍

判定が困難な症例：CPS 5 ～ 10

一次抗体で染色した CPS 7 を示す
胃癌検体。

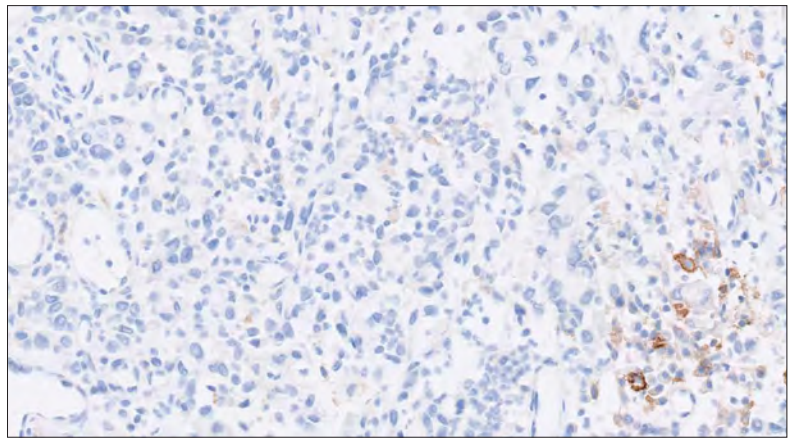


図 55. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 6 を示す
胃食道接合部癌検体。

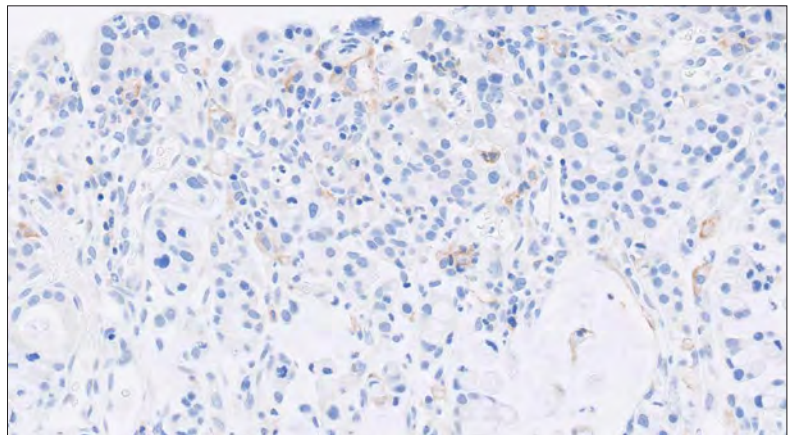


図 56. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 5 を示す
食道腺癌検体。

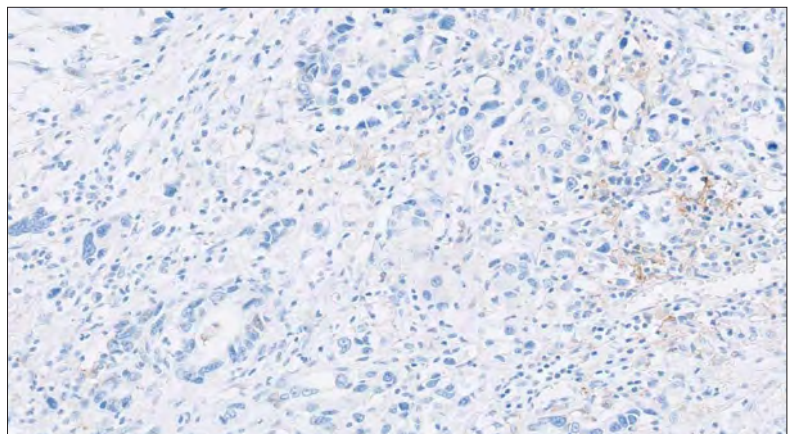


図 57. 対物レンズ 20 倍

判定が困難な症例：CPS 5 ～ 10

一次抗体で染色した CPS 8 を示す
胃癌検体。

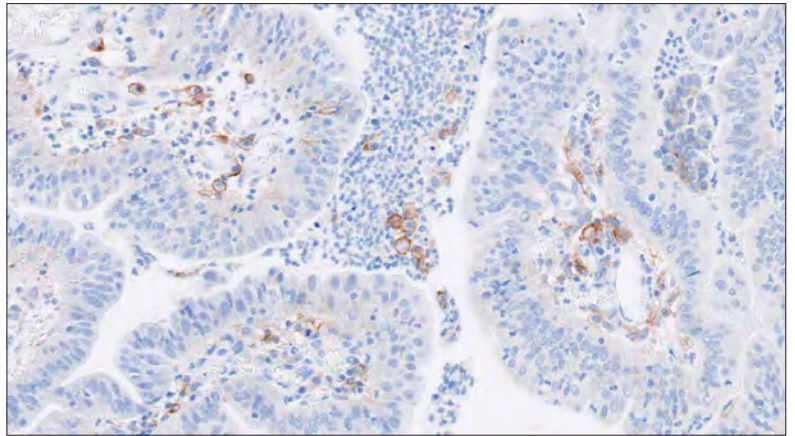


図 58. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 10 を示す
胃食道接合部癌検体。

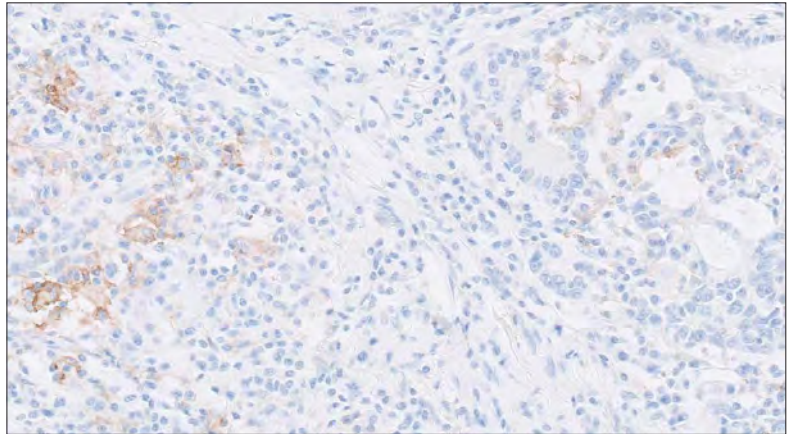


図 59. 対物レンズ 20 倍

症例：CPS >10（陽性高値）

一次抗体で染色した CPS 10 超を示す胃癌検体。この検体の CPS スコアは、CPS 50 ～ 60 となります。

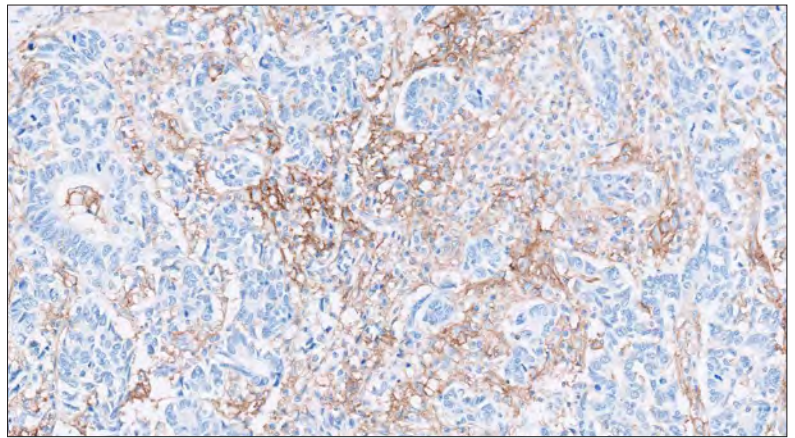


図 60. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 10 超を示す胃食道接合部癌検体。この検体の CPS スコアは、CPS20 ～ 30 となります。

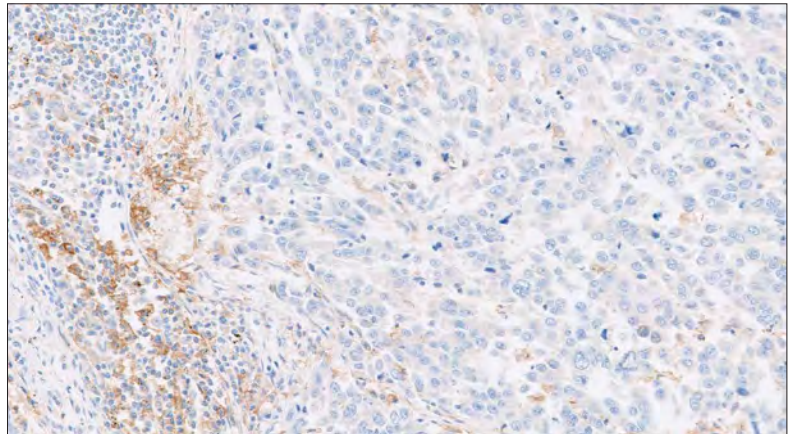


図 61. 対物レンズ 20 倍

一次抗体で染色した CPS 30 を示す食道腺癌検体。

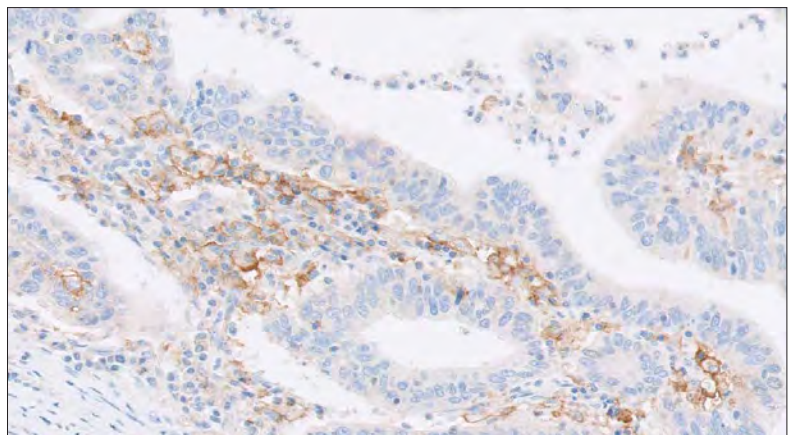


図 62. 対物レンズ 20 倍

アーチファクト

非特異的染色

非特異的染色は、バックグラウンドとして定義され、広範囲なパターンを示すことがよくあります。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非特異的染色の原因となることがあります。

非特異的染色の考えられる原因

- － スライドの染色前の乾燥。ダコ Autostainer Link 48 ヘスライドを載せる際、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
- － 洗浄液の混合不良

陰性対照のコントロール組織の非特異的染色により、同じ患者組織の PD-L1 陽性試験検体の非特異的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染色が 1+ 以下である必要があります。

一次抗体で染色された、非特異的染色を示す胃食道接合部癌検体。非特異的染色を示す細胞はスコアリングから除外します。

ここでは腫瘍細胞の細胞質および組織の間質に非特異的染色が認められます（赤色矢印）。

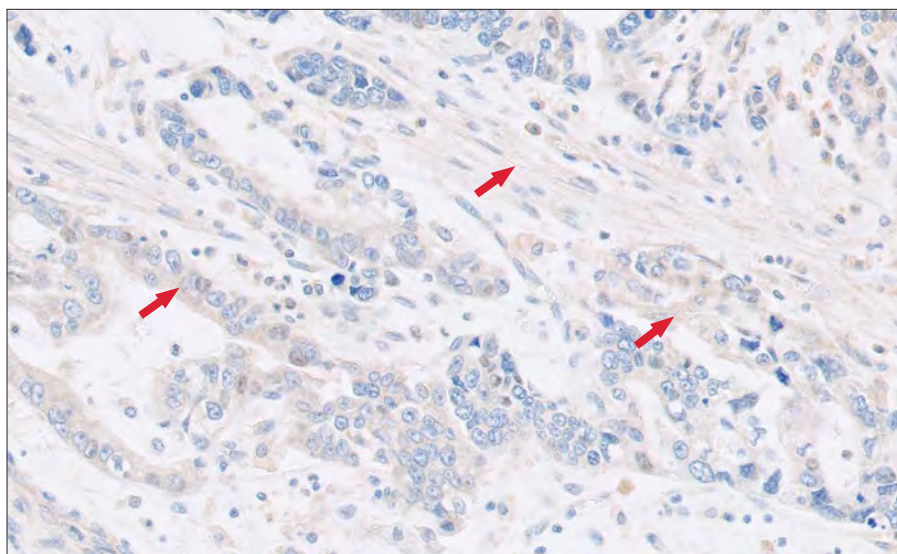


図 63. 対物レンズ 20 倍

DAB 染色

一次抗体で染色された、非特異的 DAB 染色を示す食道癌・扁平上皮癌検体。非特異的 DAB 染色を示す細胞はスコアリングから除外します。

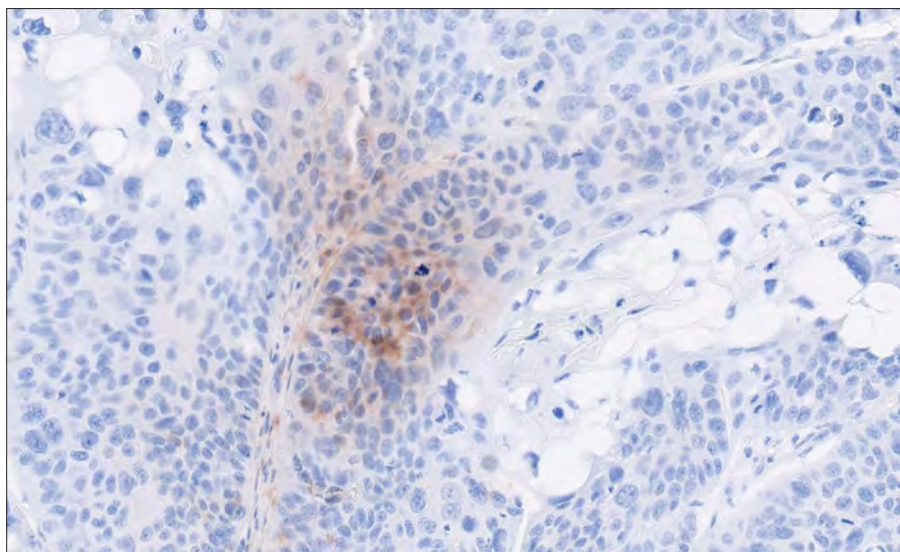


図 64. 対物レンズ 20 倍

固定不良

一次抗体で染色した組織固定が不十分な食道腺癌検体。胃癌、胃食道接合部癌および食道腺癌でよく見られる大きな切除検体は、固定不良の問題が生じる場合があります。これらの問題により組織完全性不良、形態不良および抗原の損失を引き起こすことがあり、PD-L1 発現の不正確な診断につながります。

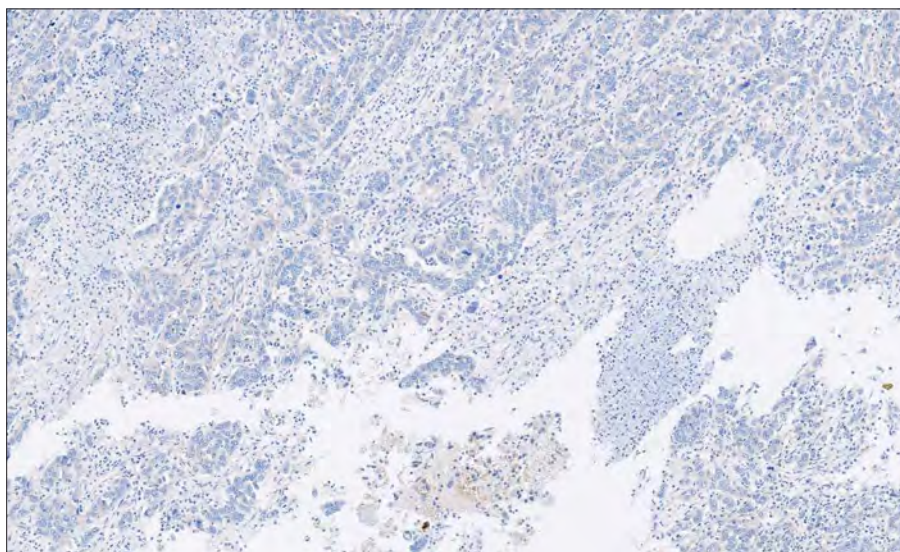


図 65. 対物レンズ 10 倍

エッジアーチファクト

一次抗体で染色した、エッジアーチファクトが見られる胃食道接合部癌検体。辺縁部の染色はスコアリングから除外します。エッジアーチファクトは、腫瘍巣中央部が完全に染色陰性または低い染色強度を示す場合はより明確に判断できます。

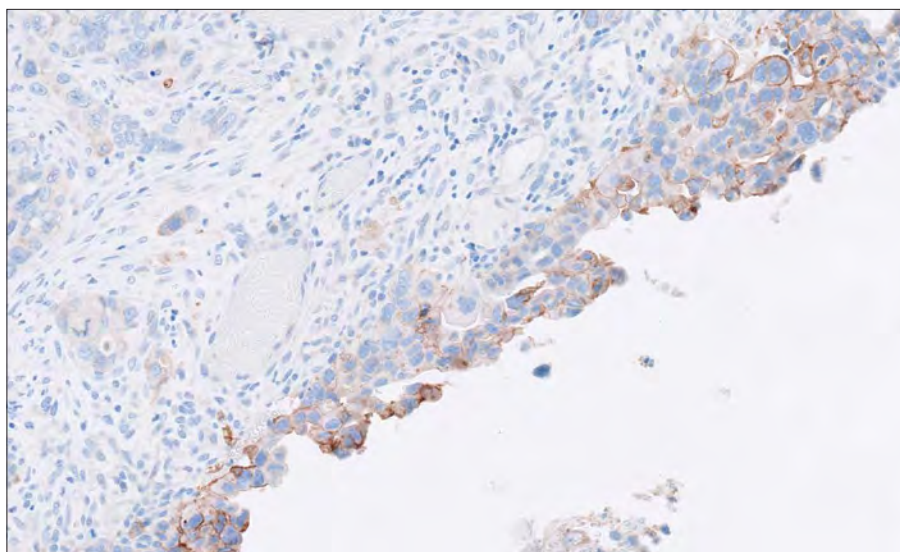


図 66. 対物レンズ 20 倍

クラッシュアーチファクト

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食道腺癌検体。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。

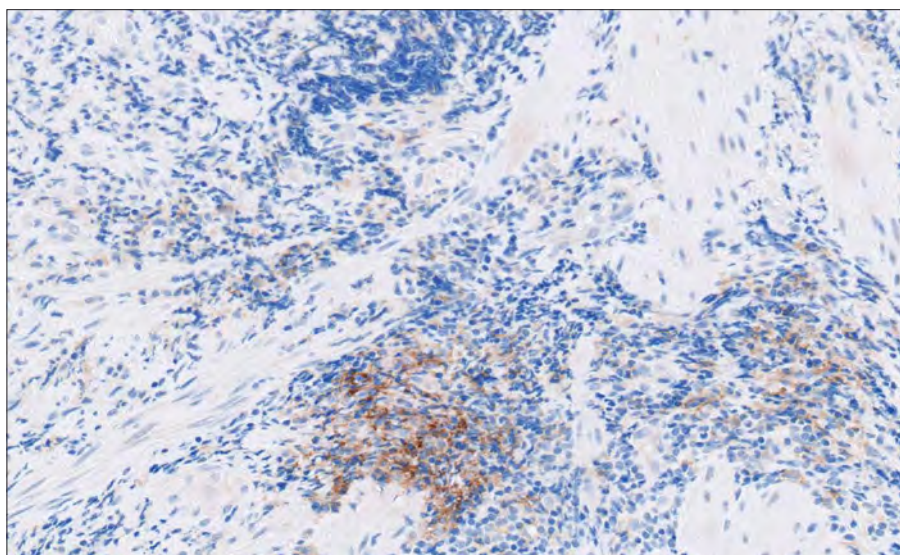


図 67. 対物レンズ 20 倍

壊死

壊死組織は非特異的染色を示す場合があるため、CPS 評価から除外します。壊死領域ではなく、判定対象となる生存腫瘍細胞のみをスコアリングの対象としてください。

一次抗体で染色した、壊死領域に反応が見られる胃癌検体。壊死部の反応はスコアリングから除外します。

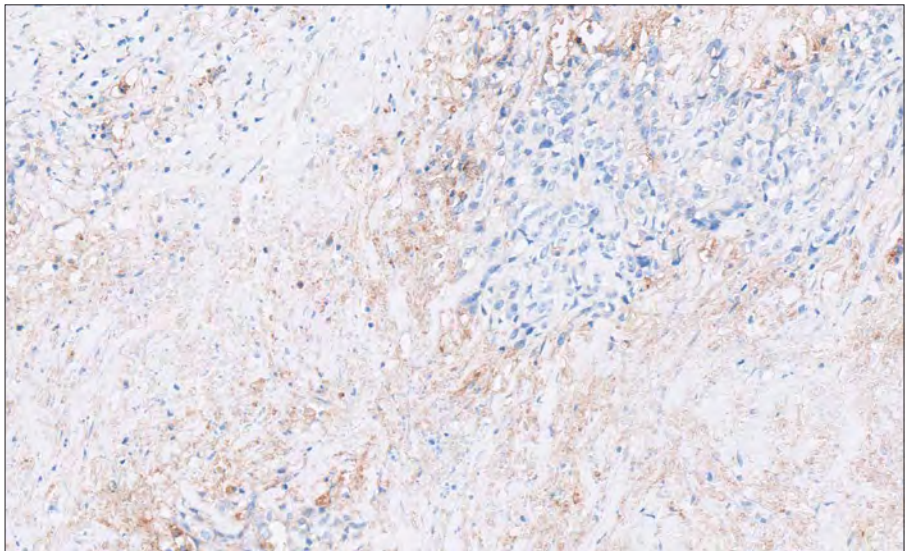


図 68. 対物レンズ 20 倍

その他：下位組織構造

一次抗体で染色した胃癌検体。高分化腺癌を示しています。

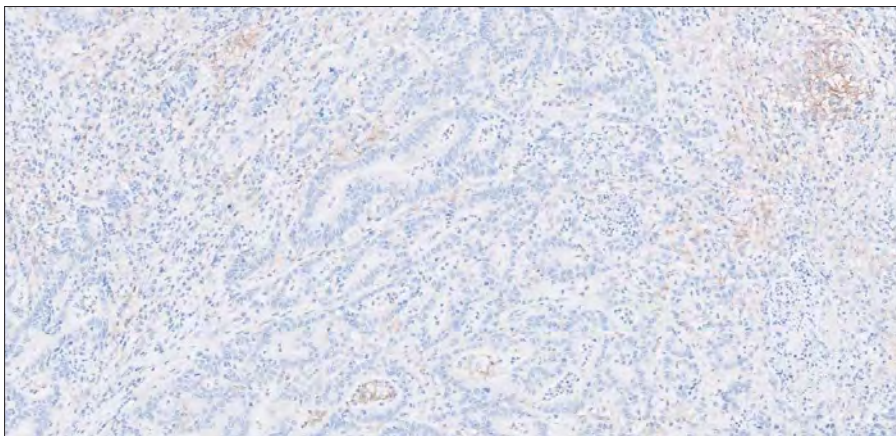


図 69a. 対物レンズ 10 倍

一次抗体で染色した胃食道接合部癌検体。中分化から低分化の腺癌および扁平上皮癌が示されています。

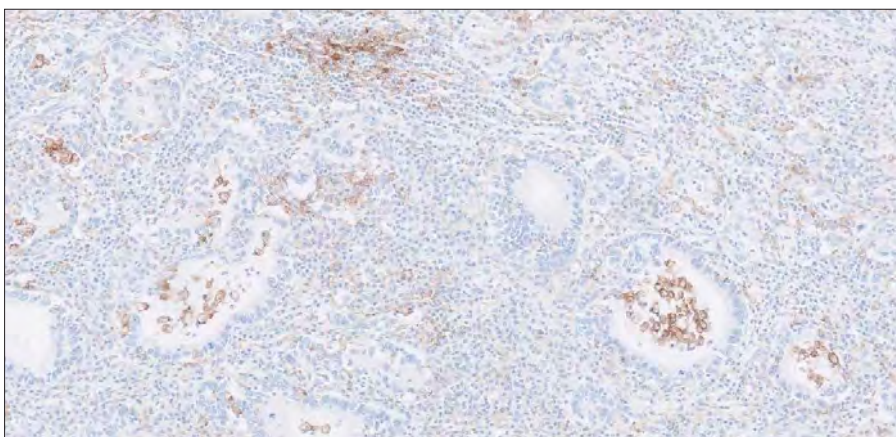


図 69b. 対物レンズ 10 倍

一次抗体で染色した食道腺癌検体。扁平上皮癌構成が示されています。

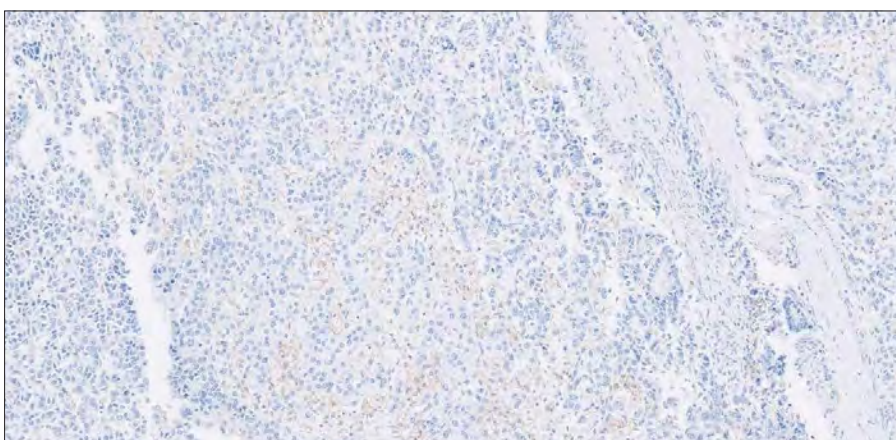


図 69c. 対物レンズ 10 倍

免責事項：食道癌（EC）検体例は、胃食道接合部に近接する下部の食道腫瘍を表すものとして含まれます。食道癌検体は本検査の使用適応の一部ではありません。

一次抗体で染色した胃癌検体。
細胞外ムチンの多数のプールで特徴
づけられる粘液性癌が示されています。

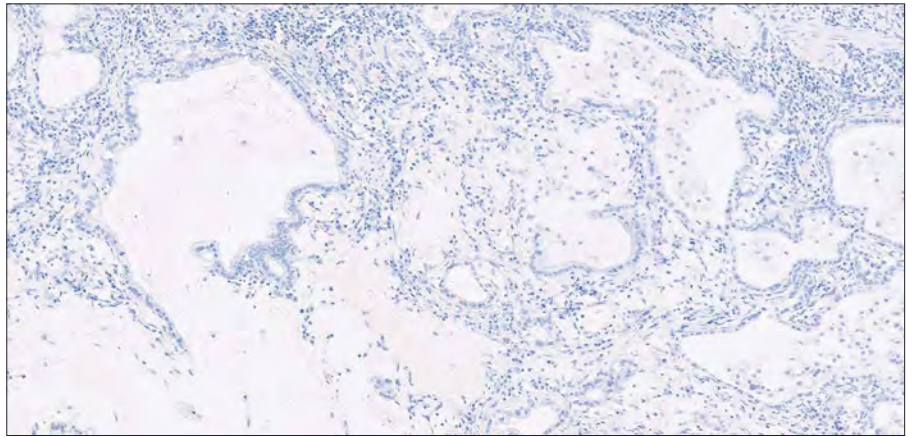


図 70a. 対物レンズ 10 倍

一次抗体で染色した胃食道接合部
癌検体と印環細胞の形態を示します。

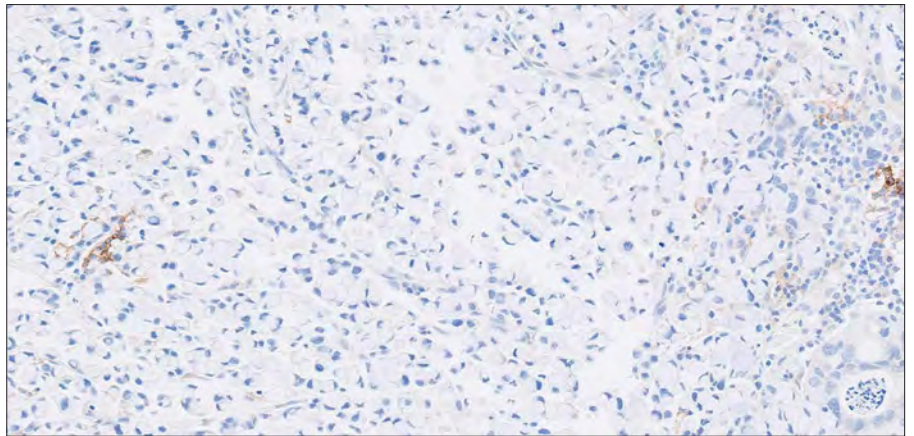


図 70b. 対物レンズ 20 倍

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. 基質溶液の反応不足	1b. 基質溶液が正しく調製されていることを確認する
	1c. 洗浄液中のアジ化ナトリウム	1c. ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20x) (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. 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 (20x) (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 (20x) (型番: K800721-2) を使用しているか確認する
4. スライドの非特異的染色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. 検体が適切に固定されていることや、壊死の有無を確認
	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. 適切なコーティング済みスライドを使用
	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. 不適切な洗浄液を使用	6b. ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20x) (型番: K800721-2) を使用しているか確認する
7. 加熱時、抗原賦活液が濁る	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
8. 抗原賦活液 (1x) が pH 仕様を満たしていない	8a. pH メータが正しく校正されていない	8a. 製造業者の推奨手順に従って pH メータを校正する。再校正後、抗原賦活液 (1x) で pH を再検証する。抗原賦活液 (1x) の pH を変更しない。pH が許容範囲 (6.1 ± 0.2) 外である場合、抗原賦活液 (1x) を廃棄してください。新しい抗原賦活液 (1x) を調製します。新しい抗原賦活液 (1x) の pH をチェックします
	8b. 低品質の水を使用して濃縮抗原賦活液を希釈している	8a. 蒸留水または脱イオン水を使用して抗原賦活液 (1x) を調製します。
	8c. 間違った抗原賦活液を使用している	8a. 添付文書の「提供される材料」および「試薬調製」の項に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します

参考文献

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4 (ISBN 1-56238-962-9). CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA; Vol.34 No.8; 2014.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quality assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved guideline – Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN1-56238-745-6). CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA; Vol.31 No.4; 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. 1976.
- Hellmann M. D., Paz-Ares L., et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2019, 381, 2021-2031.
- Janjigian Y. Y., Shitara K., et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2021, 398, 27-40.
- Omata M. D., C-T Liew., et al. Nonimmunologic Binding of Horseradish Peroxidase to Hepatitis B Surface Antigen: A Possible Source of Error in Immunohistochemistry. *Am. J. Clin. Pathol.* 1980, 73(5), 626-632.
- 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
- Phelps R. M., Johnson B. E., et al. NCI-navy medical oncology branch cell line database. *J. Cell. Biochem.* 1996, 63(S24), 32-91.
- Therese Phillips M. A., Pauline Simmons B. S., et al. Development of an automated PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assay for Non-Small Cell Lung Cancer. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2015, 23(8), 541-549.
- Taylor C. R. and Rudbeck L. Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods – Sixth Edition. Dako, Carpinteria, California; 2013.
- Topalian S. L., Hodi F. S., et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012, 366, 2455-2465.
- Wang C., Kent B. T., et al. *In Vitro* Characterization of the Anti-PD-1 Antibody Nivolumab, BMS-936558, and *In Vivo* Toxicology in Non-Human Primates. *Cancer Immunol. Res.* 2014, 2(9), 846-856.

本製品の最新の添付文書は www.pmda.go.jp/PmdaSearch/ivdSearch/ にて
ご確認ください。

承認済みの適応症および治療の指針となるカットオフ値については、ニボルマブの添付文書をご参照ください。

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/>

D63087/P210307

© 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, Nov. 2021

29441JA 2023 Dec