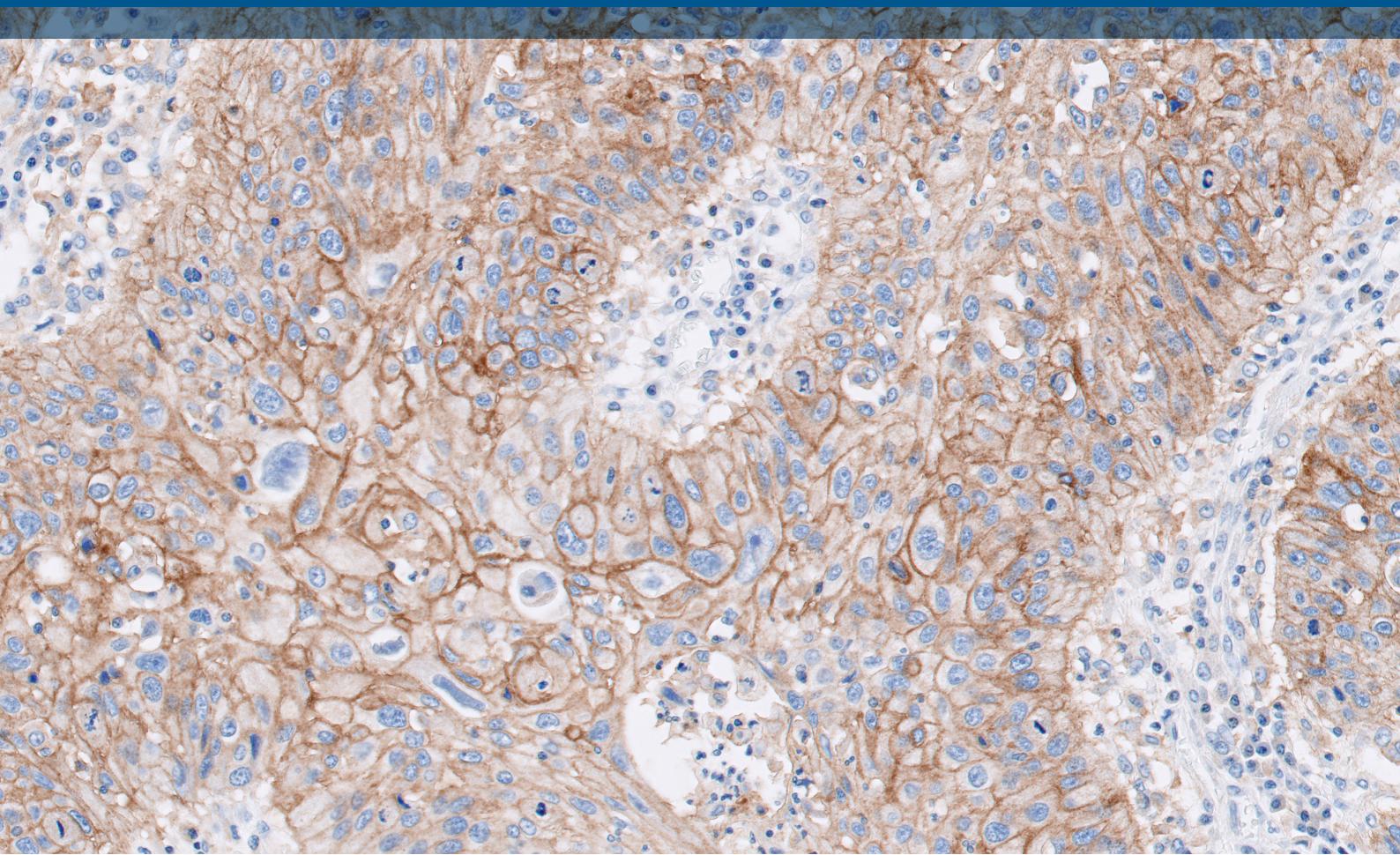


PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」 染色結果判定マニュアル： 食道癌

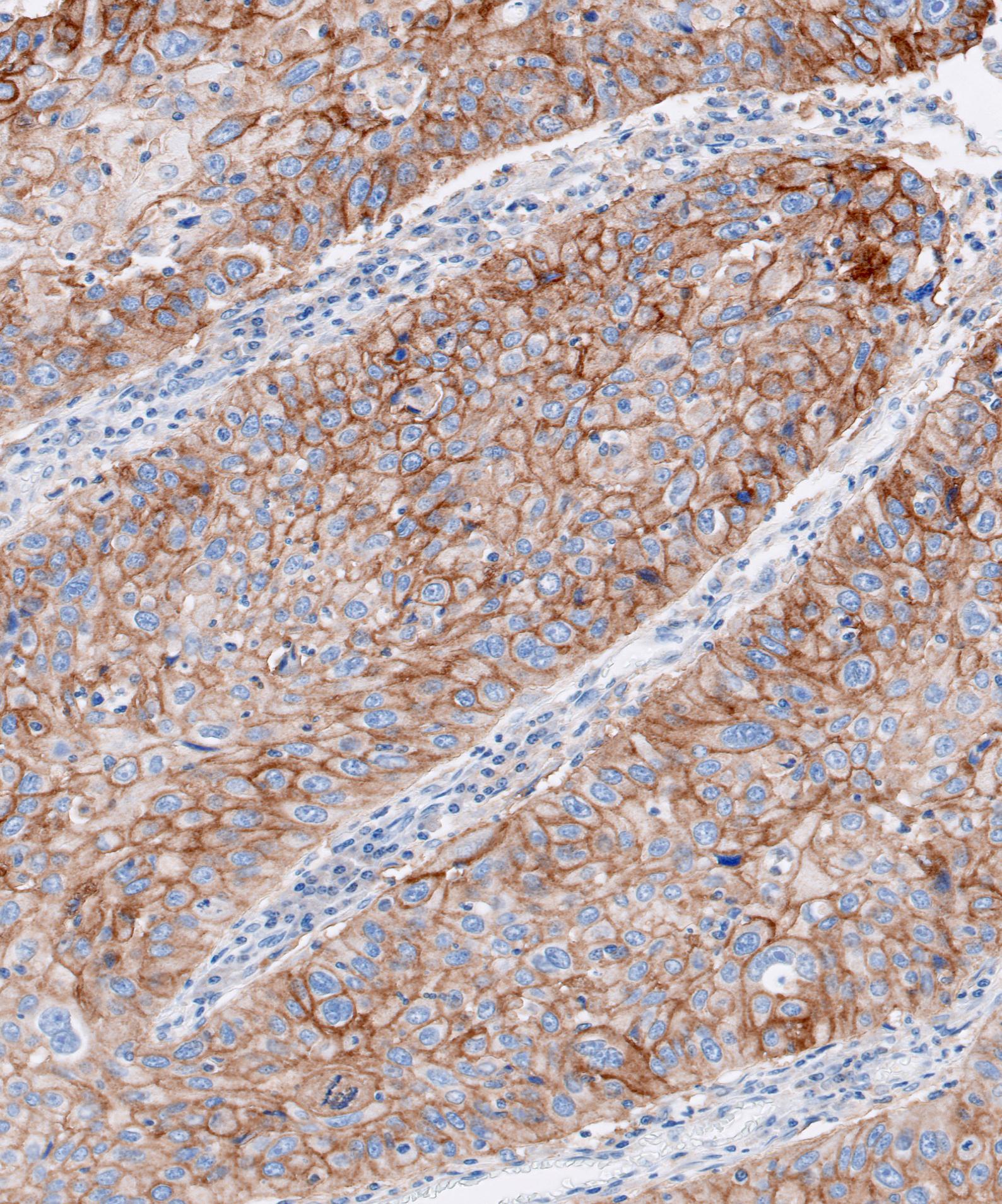
体外診断用

体外診断用医薬品 承認番号：22800EZX00077000



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-1/PD-L1 パスウェイの役割	7
食道癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床試験データ	8
食道癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床的価値	9
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の概要	10
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」を適切に使用するために～技術的な留意点～	12
検体採取と作製	12
組織の前処理	12
陽性対照および陰性対照のコントロール組織	13
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色手順	13
試薬の保管	13
試薬の調製	13
コントロールスライド	14
染色プロトコール	14
脱パラフィン、親水化、抗原賦活化	14
染色と対比染色	15
封入	15
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」テクニカルチェックリスト	16
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」スコアリングガイドライン	17
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の推奨スライド判定順序	18
食道癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の結果判定に関する推奨事項	20
HE 染色した組織検体	20
本品中のコントロールスライド	20
陽性対照のコントロール組織スライド	22
陰性対照のコントロール組織スライド	22
一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体	22
一次抗体で染色した組織検体	23
ヒントおよび考慮事項	23
判定不可検体	23
腫瘍細胞の PD-L1 発現率の算出に関して推奨されるスコアリング方法	24
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」結果報告	27
食道癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の免疫染色例	28
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の食道癌症例	31
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」では判定が困難な食道癌の例	39
アーチファクト	43
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」トラブルシューティングガイド	45
参考文献	47



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

はじめに

使用目的（食道癌のみ抜粋）

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）の食道癌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

本品で 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。

- 化学療法未治療の食道癌患者におけるニボルマブ（遺伝子組換え）を含む併用療法

ただし、本品を用いて 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（遺伝子組換え）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 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」により食道癌患者の PD-L1 発現率を測定した試験では、ニボルマブと化学療法の併用療法による統計学的に有意かつ臨床的に意義のある全生存期間（OS）および無増悪生存期間（PFS）の改善が示されています。また、ニボルマブとイピリムマブの併用療法では統計学的に有意かつ臨床的に意義のある OS の改善も示されています。

注意事項： その他の承認された適応症については、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」添付文書をご参照ください。

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

本書は、病理医や検査担当者の方が、食道癌検体を評価する際に、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 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」を用いた食道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、症例の顕微鏡写真を参考として紹介しています。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の添付文書には、高品質の染色を確実に行うためのガイドラインと技術的なヒントが記載されています。

本書の内容を確認いただくことで、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」で染色した食道癌検体の結果判定に関する基礎知識を確実に身に付けることができます。詳細については、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の最新の添付文書または www.agilent.com をご覧ください。

掲載されている顕微鏡写真は、特に記載のないかぎり食道扁平上皮癌（ESCC）のものです。

ご確認事項

顕微鏡写真

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。

注意事項：この染色判定マニュアルに掲載されている顕微鏡写真は、以下のサプライヤーから提供された検体が含まれています。

- 組織検体は BiolVT (米国ニューヨーク州ヒックスヴィル) より提供されました。
- このプロジェクトで使用されたデータとESCC検体は、National BioService LLC (ロシア サンクトペテルブルク) から適切な倫理的承認を得て、Trans-Hit Biomarkers Inc. を通じて提供されました。
- このプロジェクトで使用されたデータとESCC検体は、Nottingham University Hospitals NHS Trust (英国ノッティンガム) 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。

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 27 ページの「結果の報告」の章を参照してください。

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。

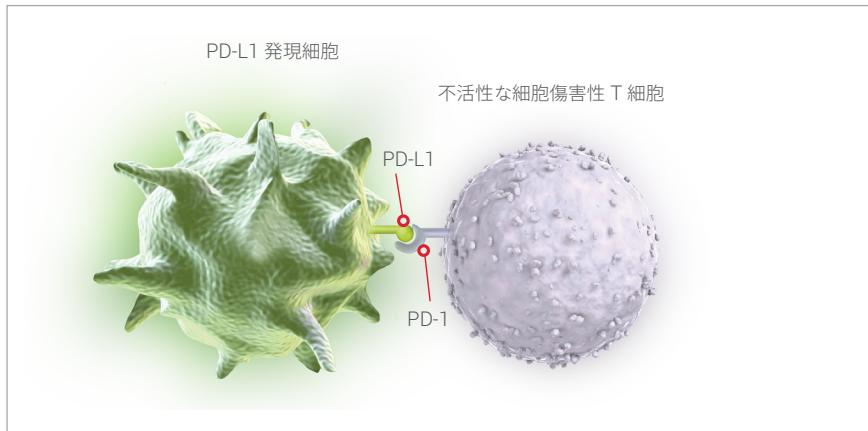


図 a.

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。

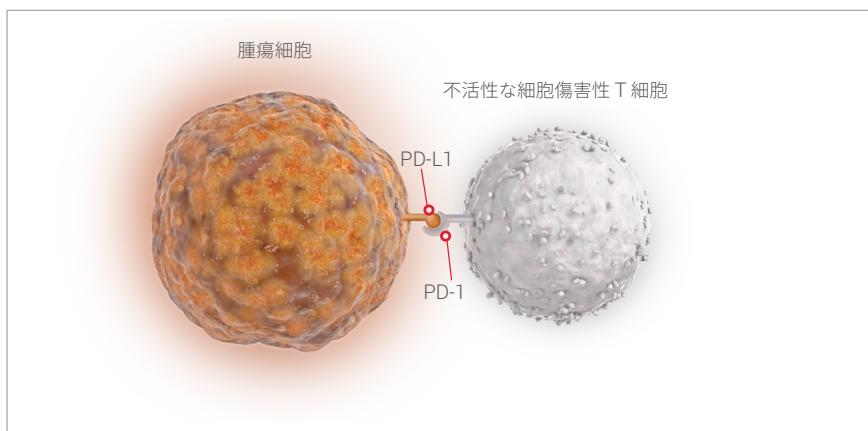


図 b.

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-1/PD-L1 相互作用を阻害することで、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。

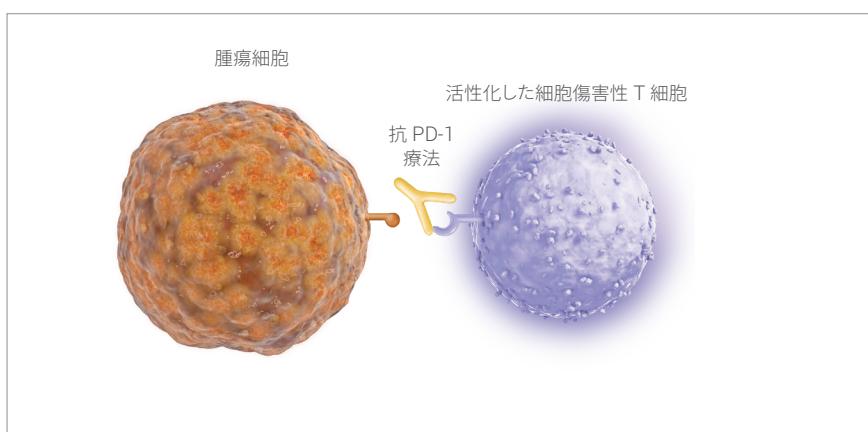


図 c.

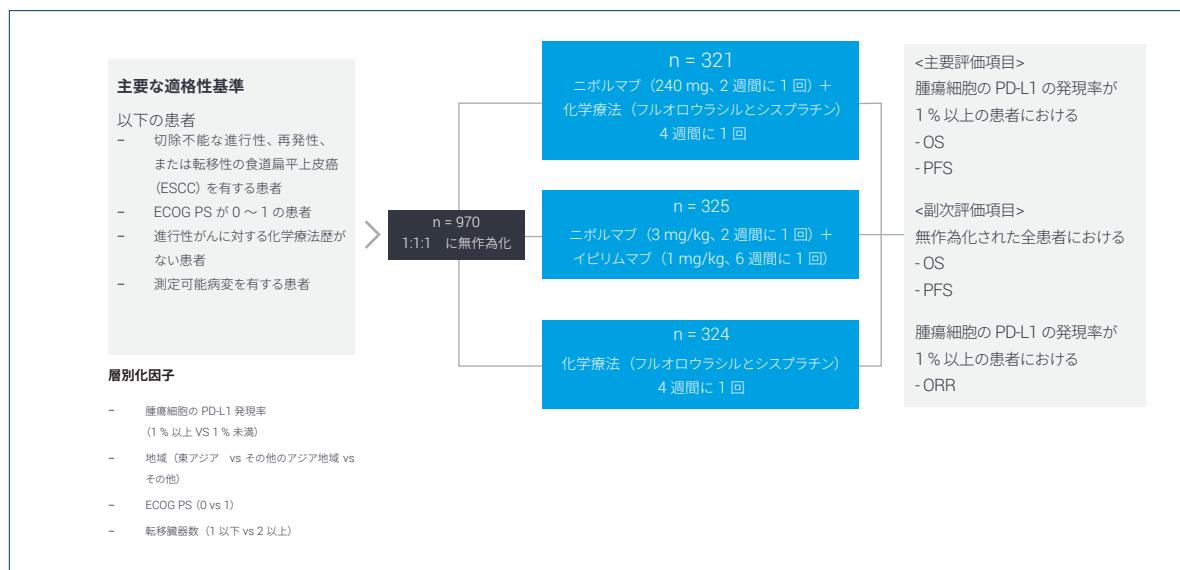
食道癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床試験データ

腫瘍細胞の PD-L1 発現率が 1 %以上の食道癌患者において、ニボルマブと化学療法の併用療法では全生存期間 (OS) および無増悪生存期間 (PFS) の改善、ニボルマブとイピリムマブの併用療法では OS の改善が示されています。また無作為化された全患者では、ニボルマブと化学療法の併用療法、ニボルマブとイピリムマブの併用療法ともに OS の改善が示されています。

- CheckMate-648 試験では、化学療法未治療の切除不能な進行または再発した食道癌患者を対象に、ニボルマブと化学療法の併用療法またはニボルマブとイピリムマブの併用療法に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床的有用性が評価されました。
- CheckMate-648 試験は、ニボルマブと化学療法の併用療法またはニボルマブとイピリムマブの併用療法を化学療法単剤投与と比較する無作為化非盲検第 III 相臨床試験です。

主要な第 III 相試験では、食道癌患者を対象に、ニボルマブと化学療法の併用療法またはニボルマブとイピリムマブの併用療法が化学療法単剤投与と比較して評価されました。

CheckMate-648 試験* 試験デザイン



OS = 全生存期間、PFS = 無増悪生存期間

*Doki, Y.; Ajani, J.A.; Kato, K.; et al. Nivolumab Combination Therapy in Advanced Esophageal Squamous-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2022**, 386(5), 449–462.

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

CheckMate-648 試験（追跡期間が 12.9 か月以上の患者）の結果によると、腫瘍細胞の PD-L1 発現率が 1 % 以上で、

- 全生存期間（OS）の中央値は、ニボルマブ+化学療法の併用療法で 15.4 か月、ニボルマブ+イピリムマブの併用療法で 13.7 か月、化学療法単剤投与で 9.1 か月です。
- 無増悪生存期間（PFS）の中央値は、ニボルマブ+化学療法の併用療法で 6.9 か月、ニボルマブ+イピリムマブの併用療法で 4.0 か月、化学療法単剤投与で 4.4 か月です。

無作為化された全患者では、

- OS 中央値は、ニボルマブ+化学療法の併用療法で 13.2 カ月、ニボルマブ+イピリムマブの併用療法で 12.75 カ月、化学療法単剤投与で 10.7 カ月です。
- PFS の中央値は、ニボルマブ+化学療法の併用療法で 5.8 カ月、ニボルマブ+イピリムマブの併用療法で 2.9 カ月、化学療法単剤投与で 5.6 カ月です。

表 1. 有効性の結果 - CheckMate-648 試験

	ニボルマブ+化学療法群		ニボルマブ+イピリムマブ群		化学療法群	
	PD-L1 ≥ 1 %	無作為化された全症例	PD-L1 ≥ 1 %	無作為化された全症例	PD-L1 ≥ 1 %	無作為化された全症例
全生存期間（OS） PD-L1 ≥ 1 % の症例における OS：[主要評価項目] 検証的な解析結果、無作為化された全症例における OS：[副次的評価項目]						
OS 中央値 [95 % CI] ^{c)}	15.44 カ月 [11.93, 19.52]	13.21 カ月 [11.14, 15.70]	13.70 カ月 [11.24, 17.02]	12.75 カ月 [11.27, 15.47]	9.07 カ月 [7.69, 9.95]	10.71 カ月 [9.40, 11.93]
HR ^{a)} [CI] ^{d)}	0.54 [0.37, 0.80]	0.74 [0.58, 0.96]	0.64 [0.46, 0.90]	0.78 [0.62, 0.98]	—	—
p 値 ^{b)} (有意水準)	<0.0001 (0.005)	0.0021 (0.009)	0.0010 (0.014)	0.0110 (0.018)	—	—
無増悪生存期間（PFS） PD-L1 ≥ 1 % の症例における PFS (BICR)：[主要評価項目] 検証的な解析結果、無作為化された全症例における PFS (BICR)：[副次的評価項目]						
PFS 中央値 [95 % CI] ^{c)}	6.93 カ月 [5.68, 8.34]	5.82 カ月 [5.55, 7.00]	4.04 カ月 [2.40, 4.93]	2.92 カ月	4.44 カ月 [2.89, 5.82]	5.59 カ月 [4.27, 5.88]
HR ^{a)} [98.5 % CI]	0.65 [0.46, 0.92]	0.81 [0.64, 1.04]	1.02 [0.73, 1.43]	1.26	—	—
p 値 ^{b)} (有意水準)	0.0023 (0.015)	0.0355 (0.015)	0.8958 (0.015)	—	—	—
奏効率 PD-L1 ≥ 1 % の症例における ORR (BICR)：[副次的評価項目] • [サブグループ解析]、無作為化された全症例における ORR (BICR)：[副次的評価項目]						
奏効率 (BICR)	53.20%	47.40%	35.40%	27.70%	19.70%	26.90%
奏効期間 PD-L1 ≥ 1 % の症例における DOR (BICR)：[探索的評価項目] • [サブグループ解析]、無作為化された全症例における DOR (BICR)：[探索的評価項目]						
奏効期間中央値 [95 % CI] ^{c)}	8.38 カ月 [6.90, 12.35]	8.18 カ月 [6.90, 9.69]	11.83 カ月 [7.10, 27.43]	11.07 カ月 [8.31, 14.00]	5.68 カ月 [4.40, 8.67]	7.13 カ月 [5.65, 8.21]

^{a)} 層別 Cox 比例ハザードモデル。HR は化学療法に対するニボルマブ+イピリムマブの併用療法、または化学療法に対するニボルマブ+化学療法の併用療法。

^{b)} 投与群を共変量とし、ECOG PS、転移臓器数を層別因子とした log-rank 検定 (PD-L1 ≥ 1 % の症例)、投与群を共変量とし、ECOG PS、転移臓器数、PD-L1 発現状況を層別因子とした log-rank 検定 (無作為化された全症例)

^{c)} カプランマイヤー推定法に基づく。

^{d)} 腫瘍細胞の PD-L1 の発現率が 1 % の患者では、ニボルマブ+イピリムマブの併用療法、98.6 % CI、ニボルマブ+化学療法の併用療法、99.5 % CI。

無作為化された全患者では、ニボルマブ+イピリムマブの併用療法、98.2 % CI、ニボルマブ+化学療法の併用療法、99.1 % CI。

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 PT Link 前処理システムを用いて FFPE 検体の IHC 染色手順を完了するために必要な、最適化された試薬とプロトコールが含まれています。

検体を一次抗体または一次抗体陰性コントロールと反応させた後、一次抗体に特異的なリンカー試薬と反応させます。次に、デキストランポリマー骨格に二次抗体分子とペーオキシダーゼ (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

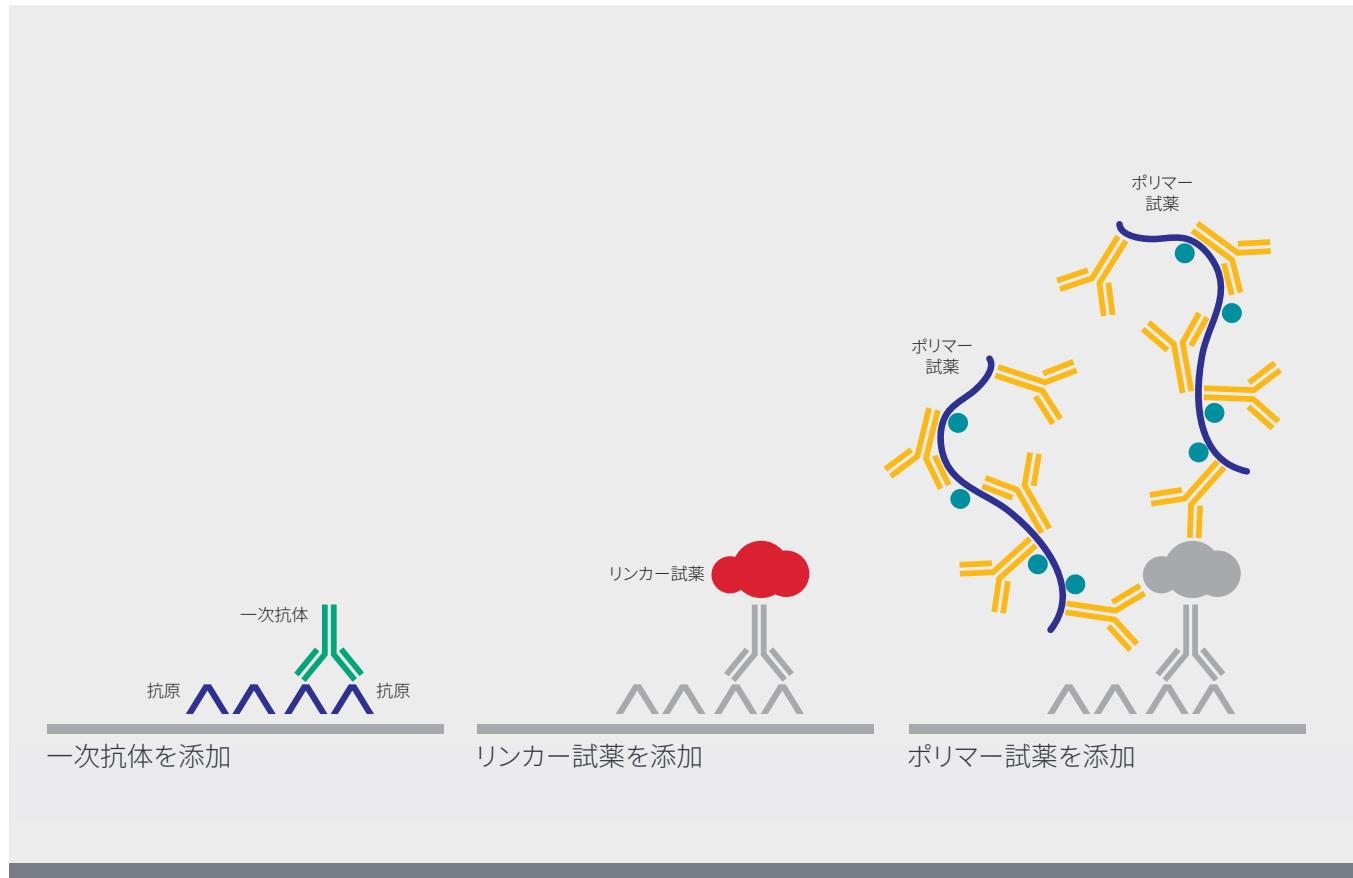


図 1a. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色手順

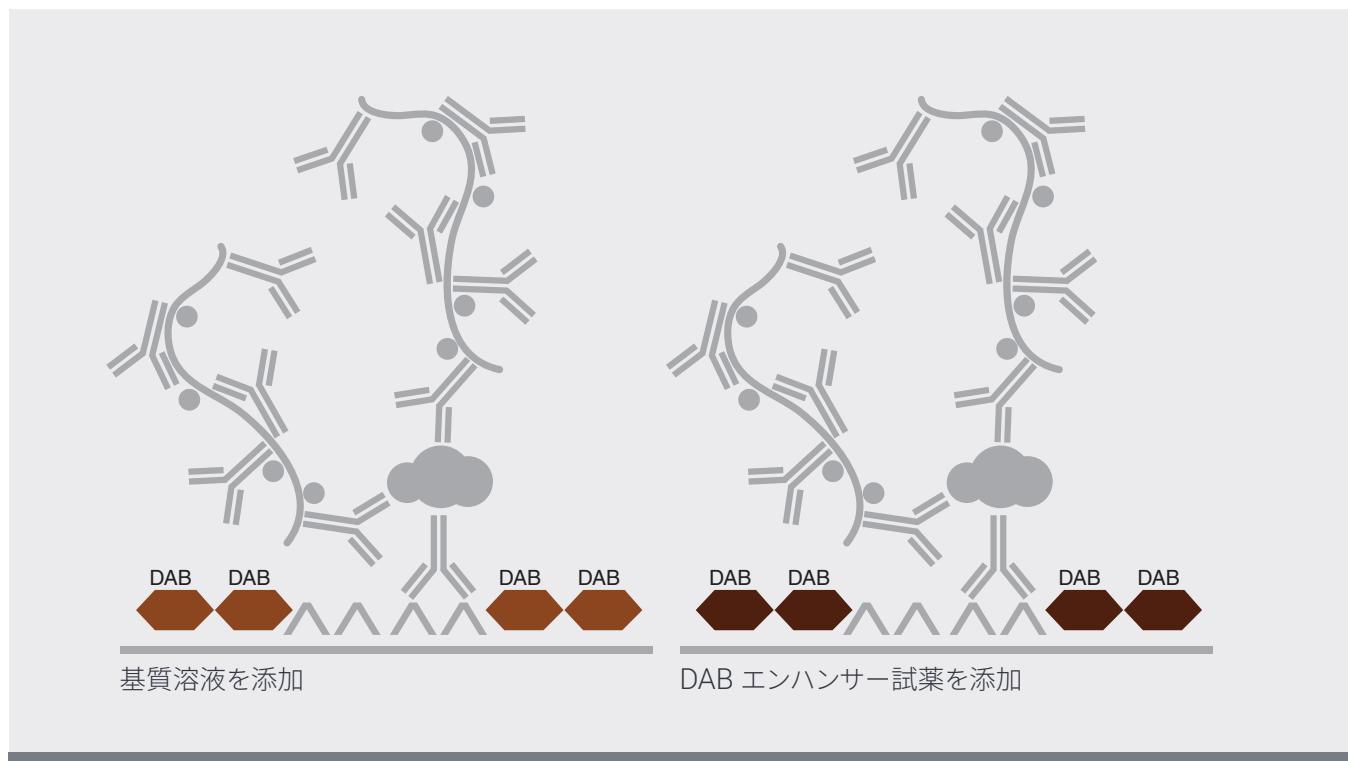


図 1b. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色手順



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

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の試薬はすべて、ダコ Autostainer Link 48 で使用します。染色結果の信頼性を保証するため、添付文書の記載内容に従って使用してください。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」には、コントロールスライド 15 枚と 50 テスト分の試薬が含まれています（図 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
- リンカーリンカー試薬（抗ウサギ抗体）
- 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は ～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。

組織の前処理

FFPE組織の使用が適しています。推奨される取り扱い条件および処理条件は次のとおりです。組織切除後30分以内に固定液に浸漬し、その後10%中性緩衝ホルマリンで24～48時間固定します。その他の固定液については検証されておらず、誤った結果をもたらす可能性があります。検体を厚さ3～4mmに切り出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定します。次に、アルコールとキシレンの一連の処理後、パラフィンを浸透させます。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4～5μm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。抗原性を保つために、一度薄切されたホルマリン固定パラフィン包埋組織検体は、暗所で2～8°C/室温(25°Cまで)にて保存し、薄切から4か月以内に染色してください。スライドの保管および取り扱い条件は、抗原性を保つために、常に25°C以下にしてください。

陽性対照および陰性対照の コントロール組織（検査室供給）

検査室内での組織検体の処理方法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。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の添付文書の使用目的に記載されている承認済みの適応症のいずれかに該当するコントロール組織を選択してください。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、検体処理の適正性を判断するためのものではありません。陽性対照のコントロール組織は、弱から中等度の陽性の染色を示すものが理想的です。また、多くの組織に存在する多様な細胞は、内因性陰性対照のコントロールとして機能しますが、この検証は各自施設内で実施する必要があります。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色手順

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の試薬とプロトコールは、最適な検査結果が得られるようあらかじめ設計されています。正しく検査を実施するためにも、試薬を希釈したり、反応時間や温度または機器を変更しないでください。

試薬の保管

使用時以外は、本品中のコントロールスライドを含む PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」のすべての構成試薬を 2 ~ 8 °C の暗所で保管してください。パッケージ外側に印刷されている使用期限を遵守してください。

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。

ダコ EnVision FLEX 濃縮抗原賦活液 Low pH の調製

ダコ EnVision FLEX 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 つ分にあたる 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。抗原賦活液 (1x) は、5 日以内に使用し、3 回使用した後は廃棄してください。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、よく混合して、十分な量の洗浄液を調製します。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。洗浄液に濁りがみられる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、染色の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 滴添加します。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釀してください。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腺癌由来)。

**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

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、スライドを設定します。DakoLink ソフトウェアにあらかじめプログラムされているプロトコールを使用します。スライドラベルを印刷し、各スライドに貼付します。

脱パラフィン、親水化、抗原賦活化

PT Link (型番 : PT100/PT101/PT200) を使用して、脱パラフィン、親水化、抗原賦活の 3 つを 3-in-1 处理で行います。

- 「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 (1x) 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事がないように、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 へマトキシリン（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 に薄切り、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 以下で保管していましたですか？	<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潤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、アジレントテクニカルサポート担当者にご相談ください。

特記事項：

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」スコアリングガイドライン

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」のスコアリングは、添付文書に記載されているガイドラインに従い、最適な方法で、病理医の経験を考慮した上で実施してください。

染色強度は問わず、完全または部分的な細胞膜染色を呈する生存腫瘍細胞の割合から、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色結果を判定します。図3に、スコアリングガイドラインと推奨される報告例を示します。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の病理報告例については、27ページをご参照ください。

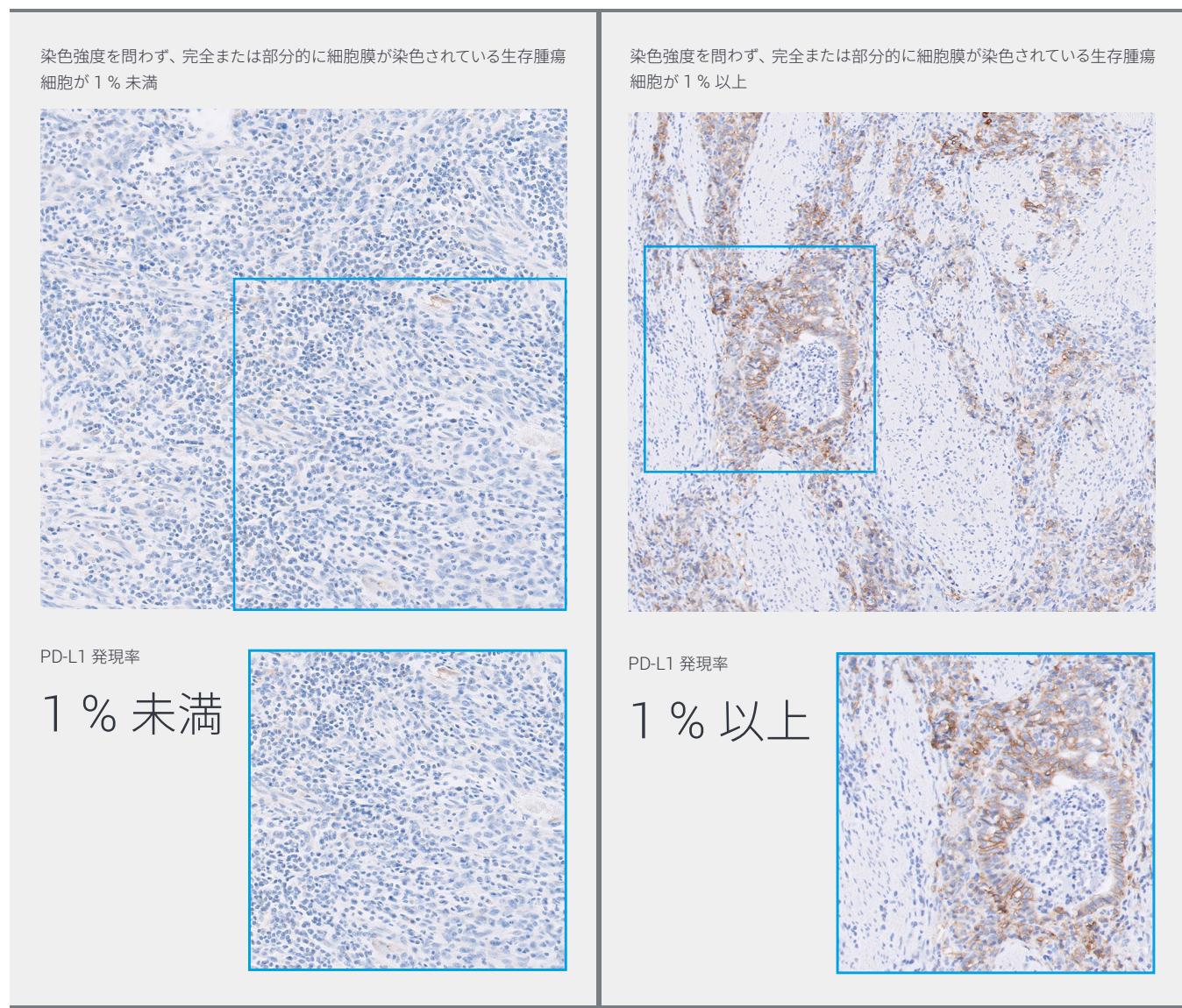
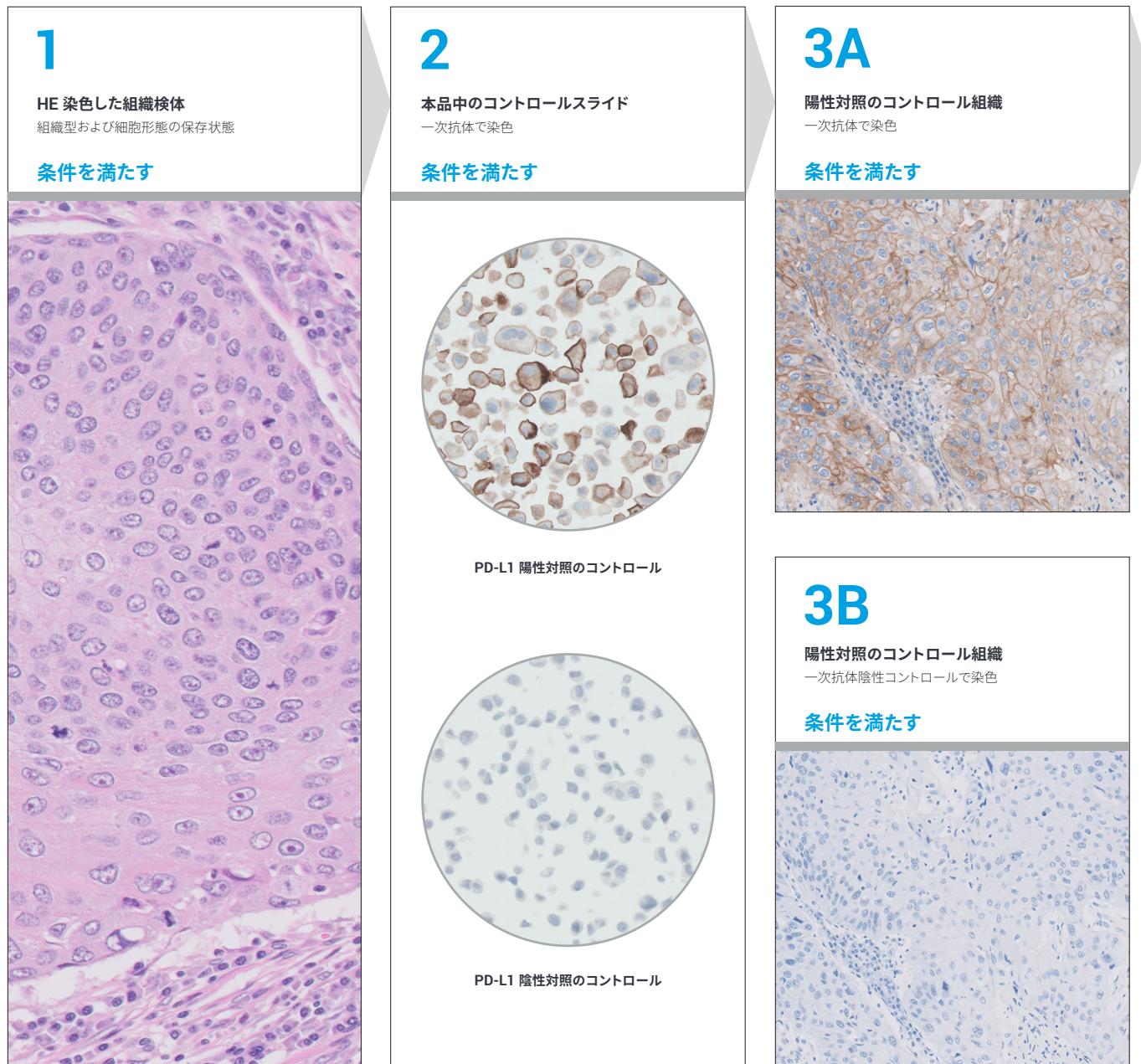


図3. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色結果のスコアリングおよび報告に関するガイドライン

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の推奨スライド判定順序

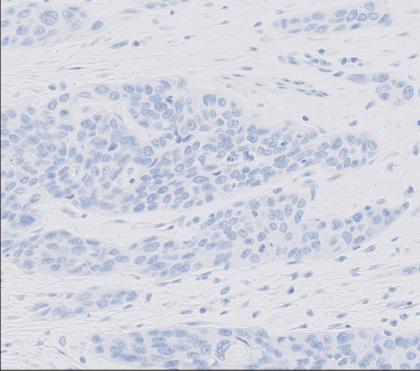
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の結果判定には、次の順序でのスライド評価を推奨します。
詳しくは、20～23 ページをご参照ください。



4A

陰性対照のコントロール組織
一次抗体で染色

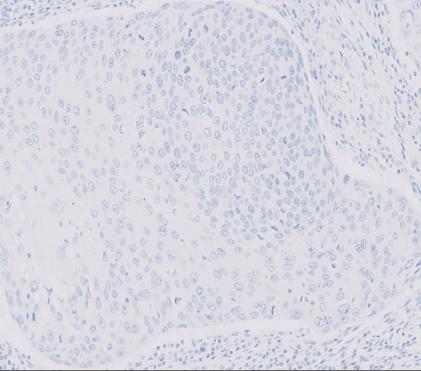
条件を満たす



5

組織検体
一次抗体陰性コントロールで染色

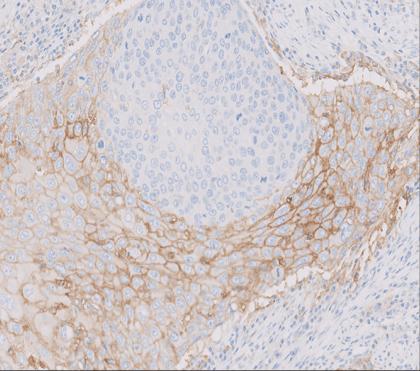
条件を満たす



6

組織検体
一次抗体で染色

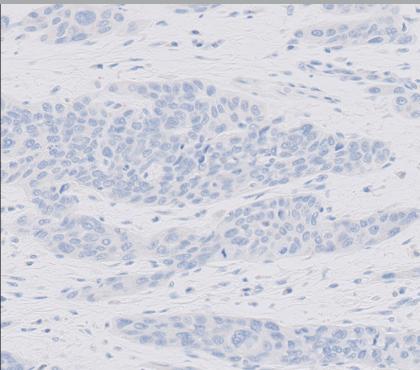
条件を満たす



4B

陰性対照のコントロール組織
一次抗体陰性コントロールで染色

条件を満たす



スコアリングには 100 個以上の生存腫瘍細胞が必要。

スコアリング対象：

- 染色強度を問わず細胞膜が完全または部分的に染色されている適切な生存腫瘍細胞を陽性としてスコアリングする。
- 検体全体に対する陽性生存腫瘍細胞の割合(発現率)を算出。

スコアリング対象外：

- 細胞質染色
- 免疫細胞
- 正常細胞
- 壊死細胞
- 細胞残屑
- 異形成
- 上皮内癌

食道癌に対する 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必ず検証してください。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、本品中のコントロールスライド、陽性対照および陰性対照のコントロールスライド、一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体のスライドを観察します。最後に、一次抗体で染色した組織検体を調べ、生存腫瘍細胞の染色を評価します。

PD-L1 の染色では、染色強度を問わず完全または部分的な細胞膜染色が確認される生存腫瘍細胞を陽性と判定します。細胞質染色を認める場合はスコアリングから除外します。非腫瘍細胞および免疫細胞（浸潤リンパ球やマクロファージなど）が PD-L1 で染色されることがあります、その場合にもスコアリングからは除外します。

陽性対照および陰性対照のコントロール組織スライドは、施設ごとに用意します。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」に含まれるのは、コントロールスライドのみです。

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 4）。コントロールスライドで良好な染色が得られない場合は、該当するすべての組織検体の結果を無効とみなします。コントロール組織を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。

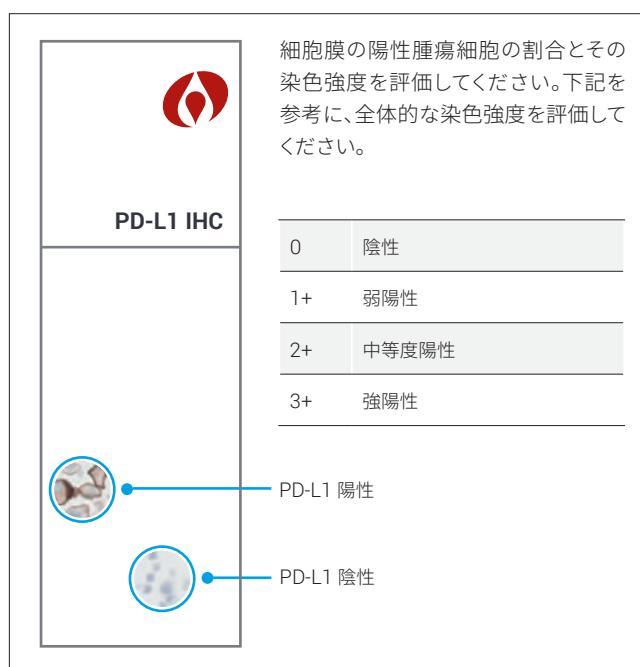


図 4. 本品中に含まれる各コントロールスライドには、PD-L1 発現が陽性および陰性の細胞の切片が含まれています。

PD-L1 陽性の細胞では、次の所見を確認する（図 5）。

- 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

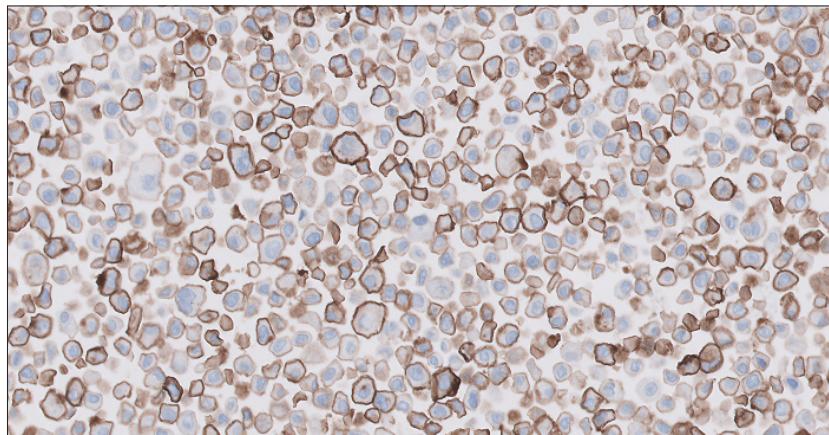


図 5. 条件を満たす染色性を示す PD-L1 陽性コントロール

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 6）。

- 特異的な染色なし
- 1+ 未満の染色強度の非特異的な染色

陰性コントロール細胞内に染色された細胞が数個、観察される場合があります。その場合でも、10 個以下の場合は、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。

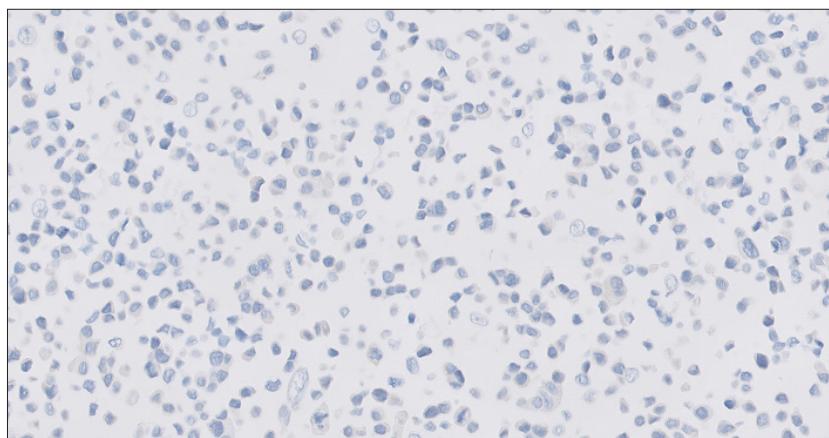


図 6. 条件を満たす染色性を示す PD-L1 陰性コントロール

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。非特異的染色は、染色強度が 1+ 以下でなければなりません。評価の際は、壊死または非生存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。コントロール組織を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。非特異的染色は、染色強度が 1+ 以下でなければなりません。陰性対照のコントロール組織で、腫瘍細胞の細胞膜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。コントロール組織を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。生存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す。一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体は、細胞膜染色は陽性を示さず、非特異的染色は染色強度が 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非特異的な染色を把握し、一次抗体で染色した検体と照らし合わせることにより、より正確な判定が可能です。

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 個の生存腫瘍細胞が存在しなければなりません。

1 4 倍の倍率で検体全体の腫瘍領域を注意深く観察してください。検体の生存腫瘍細胞の全領域を評価してください。非腫瘍細胞、壊死細胞、細胞残屑を除外します。非特異的な細胞質染色がもしあれば除外します。

2 対物レンズの 10 ~ 20 倍の倍率を用いて、細胞膜が PD-L1 で染色された陽性生存腫瘍細胞の割合を判断します。必要に応じて、確認用に 40 倍の倍率を使用することができます。腫瘍細胞は、染色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。非腫瘍細胞および浸潤したリンパ球やマクロファージなどの免疫細胞の PD-L1 も染色されることがありますが、除外します。

3 検体の腫瘍細胞 PD-L1 発現率が 1 % 未満か 1 % 以上かを記録します。PD-L1 発現率を算出するには、分子は染色された生存腫瘍細胞の数とし、分母は検体中の生存腫瘍細胞の総数とします。

$$\text{PD-L1 陽性腫瘍細胞数} \\ \text{PD-L1 発現率 (\%)} = \frac{\text{生存腫瘍細胞の総数}}{\text{X 100}}$$

ヒントおよび注意事項

- PD-L1 発現評価には標本全体を対象とします
- 細胞の鑑別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
- 非特異的な細胞質の染色を除外します
- 壊死組織が染色されることがありますが、除外します
- 非腫瘍細胞および免疫細胞は除外します
- 顆粒状染色は、知覚可能で確証的な膜パターンを示さなければなりません

判定不可検体

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

腫瘍細胞 PD-L1 発現率の算出に関して推奨されるスコアリング方法

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

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

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

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

高倍率で、PD-L1 陽性の腫瘍領域を注意深く観察します（図 7、青丸）。PD-L1 の陽性染色では、染色強度を問わず完全または部分的な細胞膜染色が確認されている腫瘍細胞を陽性と判定します。

- 100 個の生存腫瘍細胞のうち 50 個が、腫瘍領域の単一領域で PD-L1 陽性となっています（方法 1）。これは腫瘍領域の 10 % に相当する単一領域で 50 % PD-L1 陽性（方法 2）とも説明することができます。

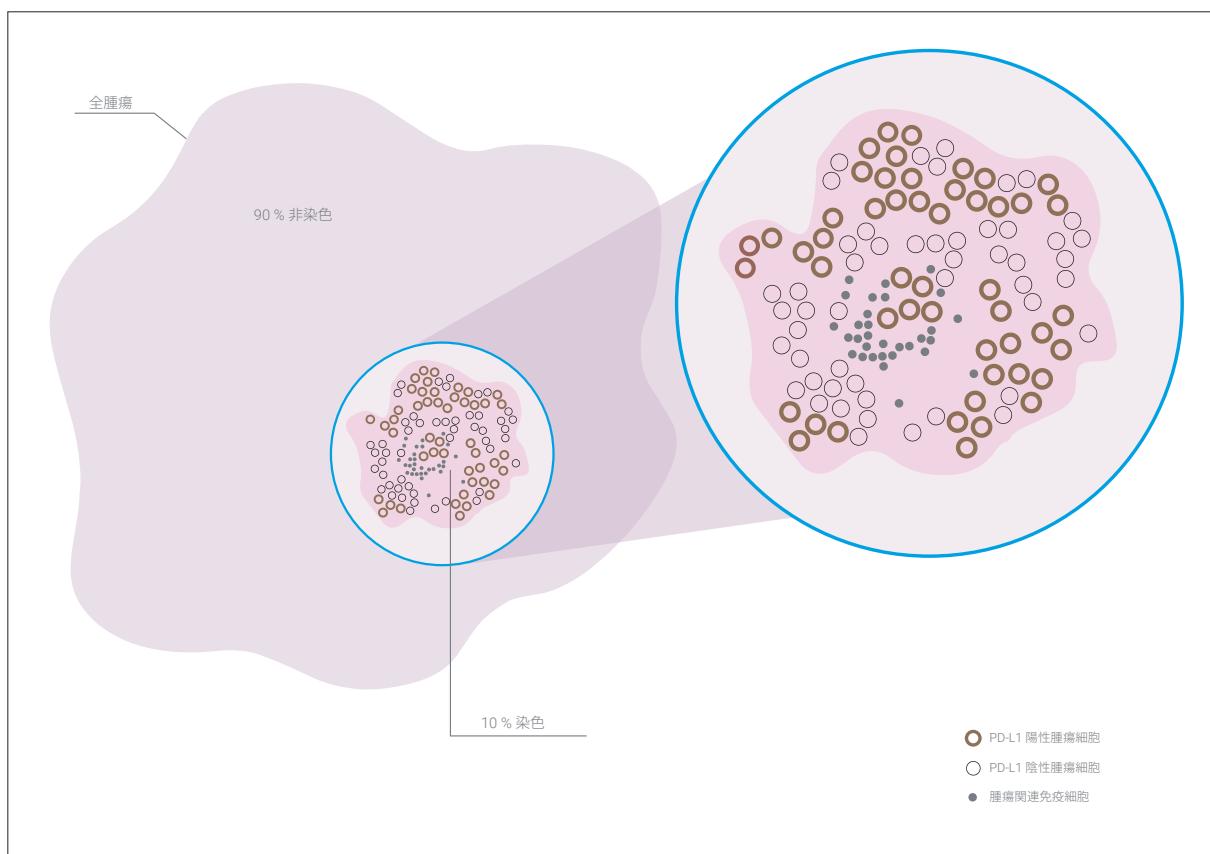


図 7. PD-L1 の染色領域が小さい腫瘍の例

検体全体に対する PD-L1 陽性腫瘍細胞の全体的な割合を以下の方法で決定します。

方法 1

$$\frac{\text{PD-L1 陽性腫瘍細胞 50 個}}{\text{生存腫瘍細胞 1,000 個}} \times 100 = \text{腫瘍細胞の PD-L1 発現率 5 \%}$$

方法 2

$$50 \% \times 10 \% = \text{腫瘍細胞の PD-L1 発現率 5 \%}$$

例 2：PD-L1 染色が不均一な検体における PD-L1 発現率（%）の算出

低倍率で、生存腫瘍細胞における PD-L1 染色の有無について染色強度を問わず検体全体を評価します。腫瘍領域を目視で分割します。

PD-L1 陽性の非腫瘍細胞および免疫細胞は除外しなければなりません。

- 図 8 では、腫瘍領域の面積を等しく 4 セクションに分割しています。

高倍率で、各セクションの PD-L1 染色腫瘍細胞の割合を評価、算出します。

PD-L1 の陽性染色では、染色強度を問わず完全または部分的な細胞膜染色が確認される腫瘍細胞を PD-L1 陽性と判定します。

- 各 4 セクションの PD-L1 陽性腫瘍細胞の割合は、80 %、30 %、50 %、100 % です。

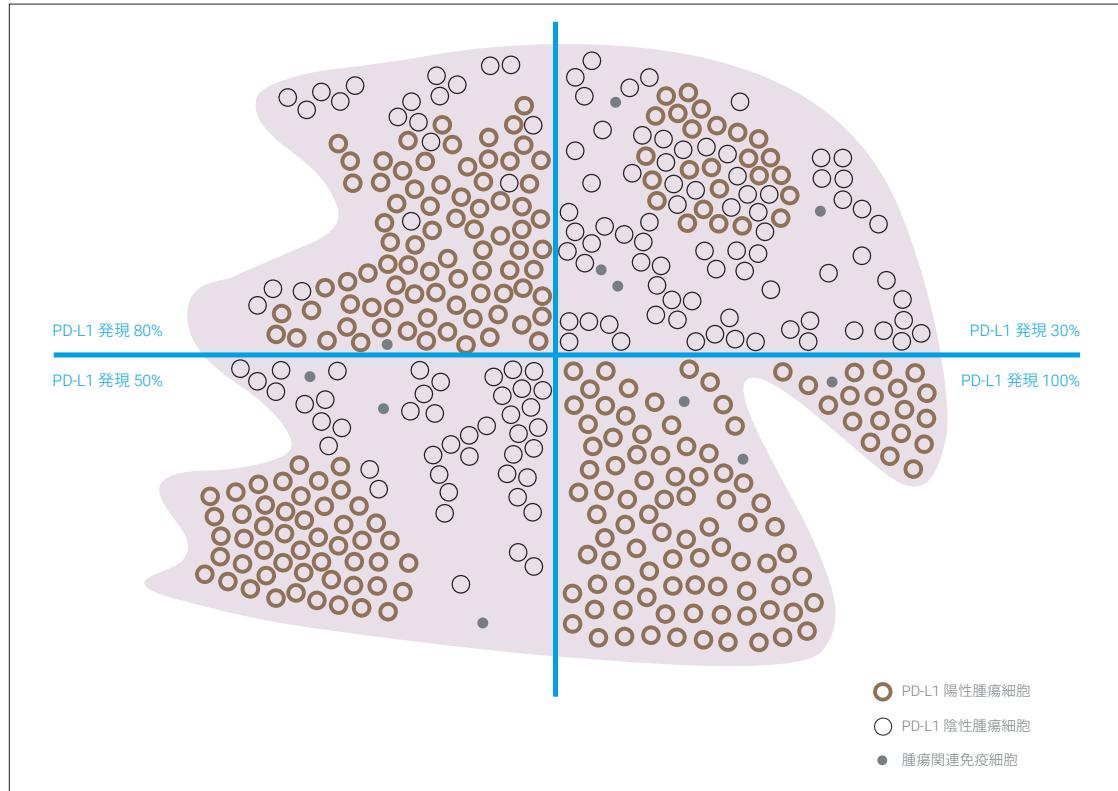


図 8. 不均一な PD-L1 染色領域の例

検体全体の PD-L1 陽性腫瘍細胞の全体的な割合を以下の方針で決定します。

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

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」 結果の報告：食道癌

食道癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色結果報告時の推奨記載事項

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

検査内容など：

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

染色 Log ID：_____ 検体 ID：_____

患者番号：_____

検査タイプ：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：

本品中のコントロールスライド：	合格 <input type="checkbox"/>	不合格 <input type="checkbox"/>
陽性対照のコントロール組織スライド	合格 <input type="checkbox"/>	不合格 <input type="checkbox"/>
陰性対照のコントロール組織スライド	合格 <input type="checkbox"/>	不合格 <input type="checkbox"/>
一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体	合格 <input type="checkbox"/>	不合格 <input type="checkbox"/>

PD-L1 染色結果：PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」は、ニボルマブと化学療法の併用療法またはニボルマブとイピリムマブの併用療法を行う食道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 個以上 不適正

PD-L1 発現率が 1 % 以上 PD-L1 発現率が 1 % 未満

病理医のコメント：_____

食道癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の免疫染色例

陽性対照のコントロール検体

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」による ESCC 検体の染色例ここではさまざまな PD-L1 染色パターンと染色強度を示しています。この検体は陽性対照のコントロール検体として、分析感度の微妙な変化の検出に使用することができます。ここに示されているのは、部分的（赤矢印）または完全な（黒矢印）細胞膜染色です。

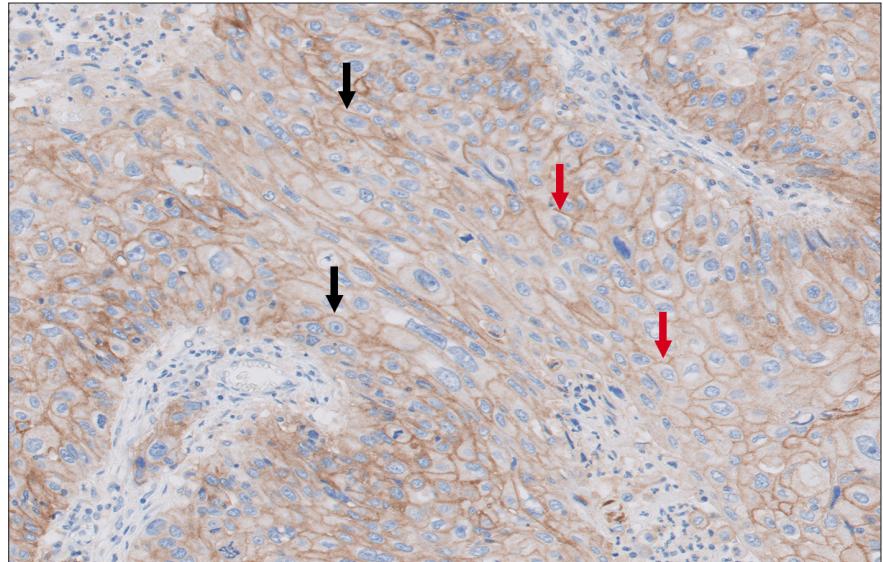


図 9. 対物レンズ 20 倍

腫瘍細胞と免疫細胞の区別

腫瘍関連リンパ球に（赤矢印）強い染色が認められる ESCC 検体。ただし、腫瘍細胞は PD-L1 陰性（黒矢印）。陽性染色を示す免疫細胞は、PD-L1 発現率判定の対象外です。

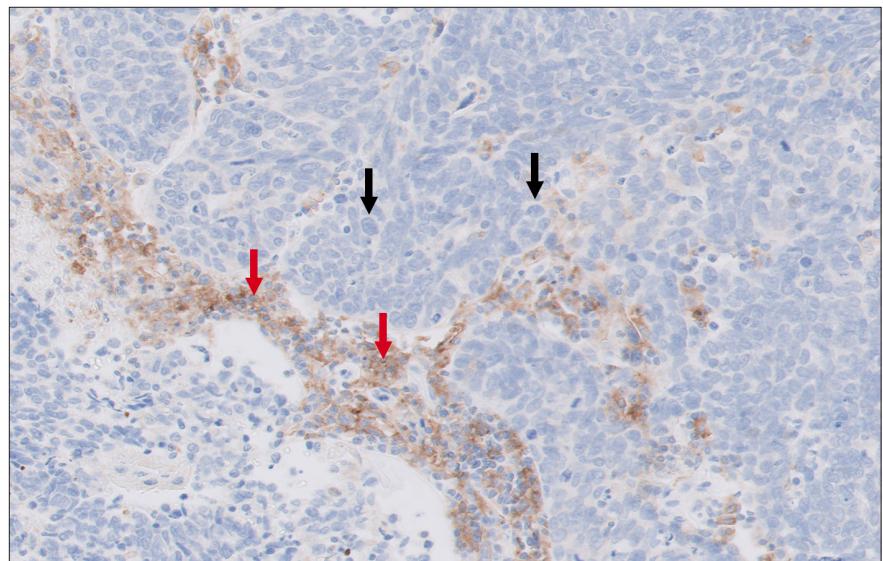


図 10. 対物レンズ 20 倍

腫瘍細胞と免疫細胞の区別

腫瘍関連マクロファージに（赤矢印）強い染色が認められる検体。ただし、腫瘍細胞はPD-L1陰性（黒矢印）。陽性染色を示す免疫細胞は、PD-L1発現率判定の対象外です。

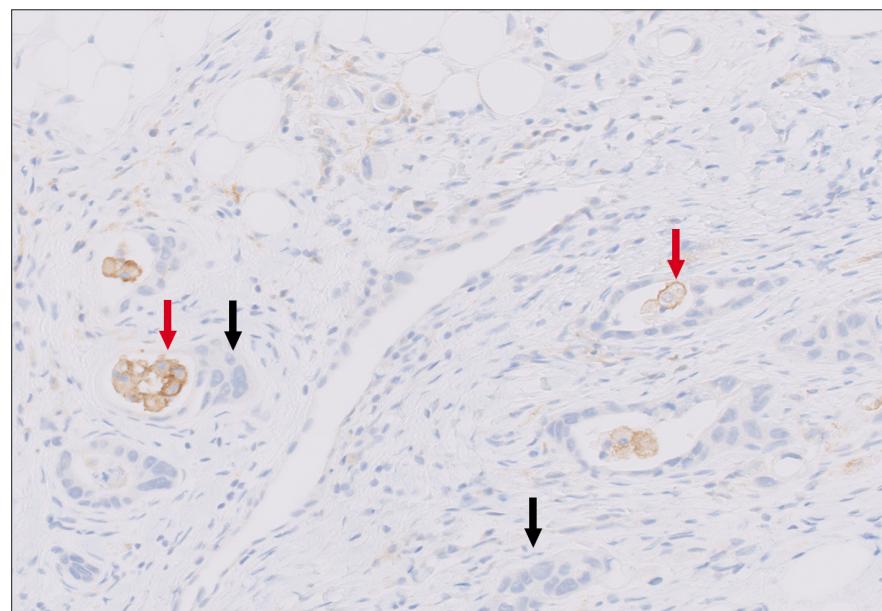


図 11. 対物レンズ 20 倍。食道腺癌検体。

腫瘍細胞と免疫細胞の区別

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

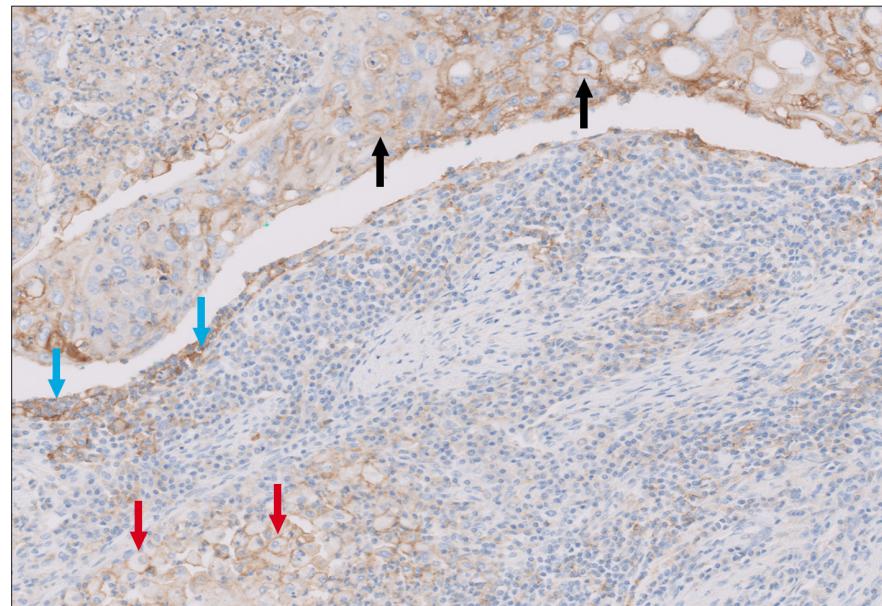


図 12. 対物レンズ 20 倍

細胞質染色

腫瘍細胞の細胞膜染色（黒矢印）が認められ、細胞質染色（赤矢印）から区別することができます。

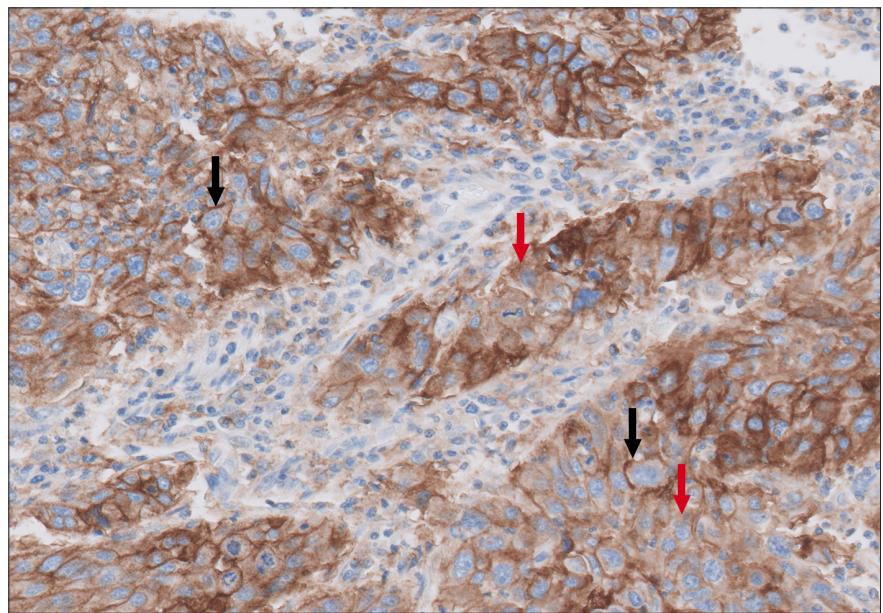


図 13. 対物レンズ 20 倍

顆粒状染色

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

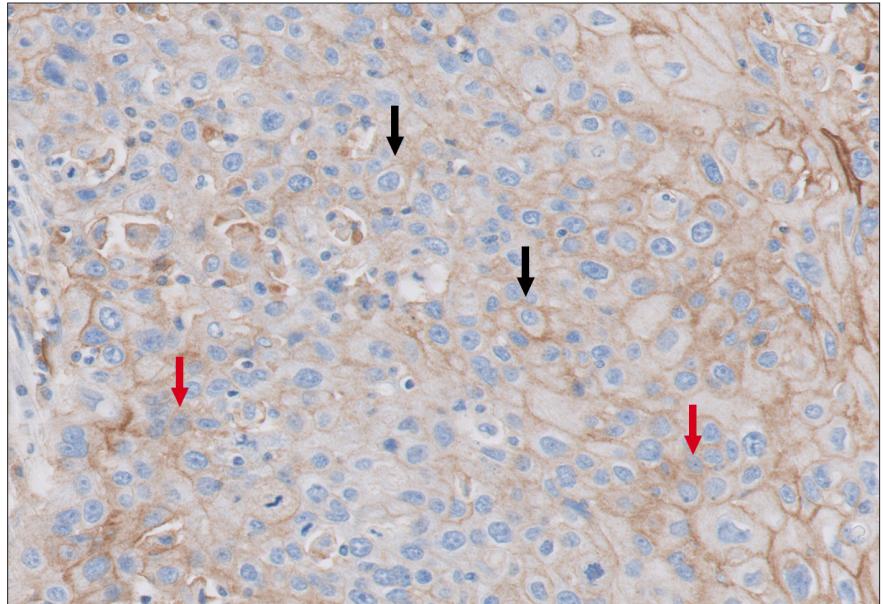


図 14. 対物レンズ 20 倍

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の食道癌症例

症例 1：PD-L1 発現率 1 % 未満

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

図 15a. 対物レンズ 10 倍

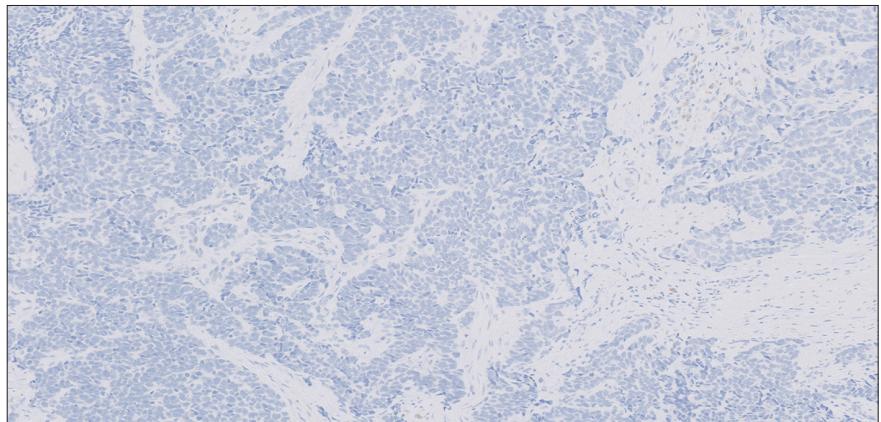


図 15b. 対物レンズ 20 倍

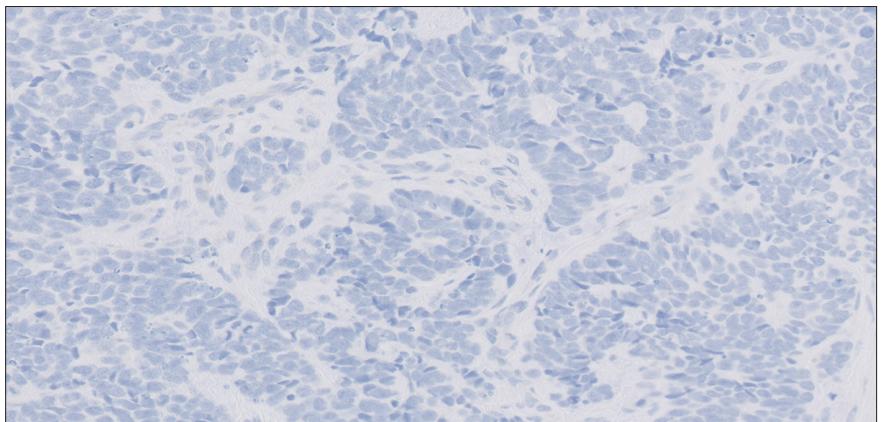
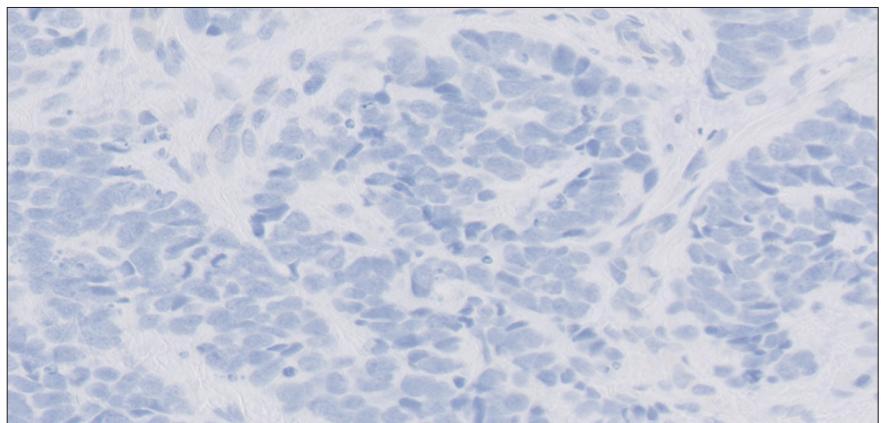


図 15c. 対物レンズ 40 倍



症例 2：PD-L1 発現率 1 % 未満

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

図 16a. 対物レンズ 10 倍

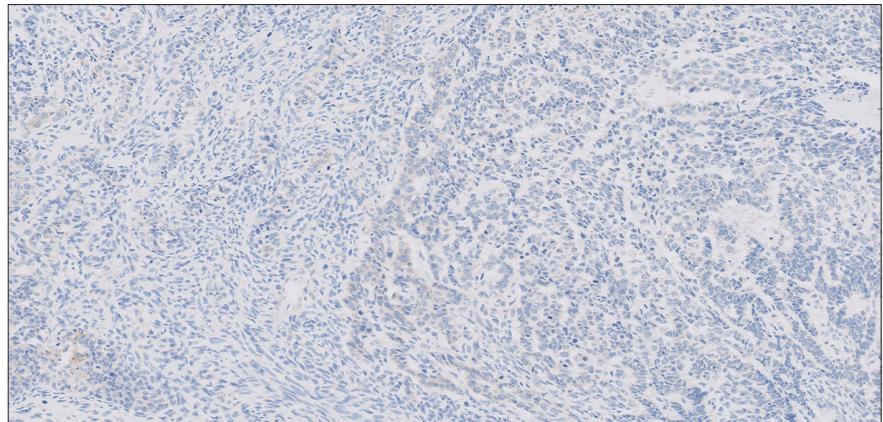


図 16b. 対物レンズ 20 倍

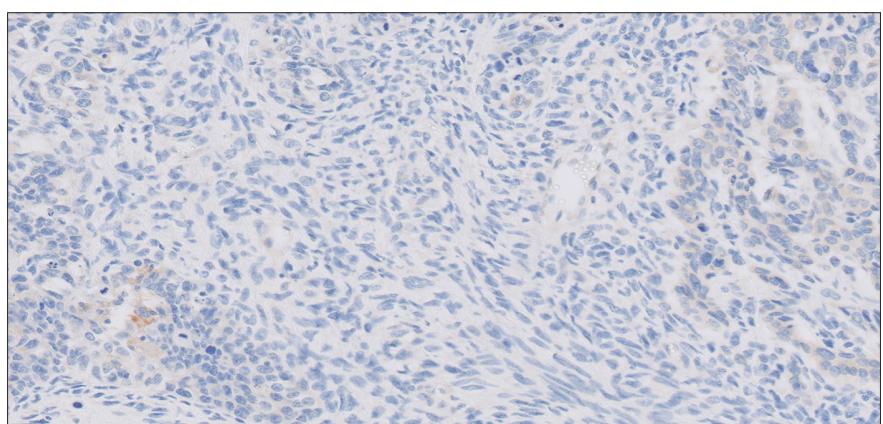
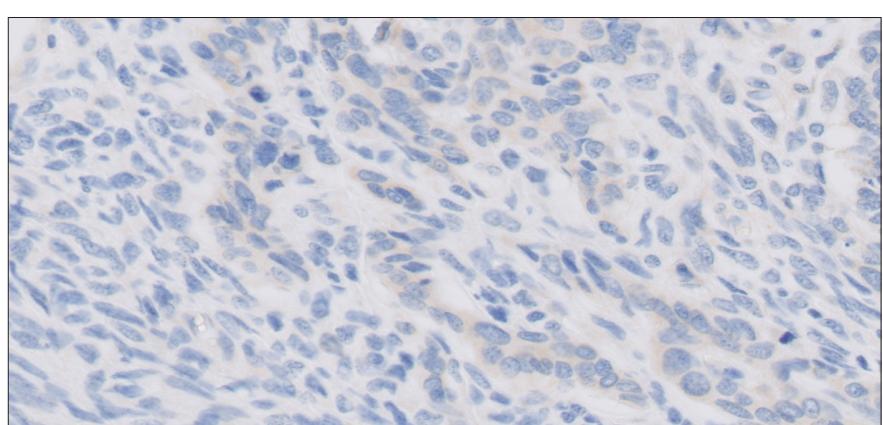


図 16c. 対物レンズ 40 倍



症例 3：PD-L1 発現率 1 % 未満

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

図 17a. 対物レンズ 10 倍

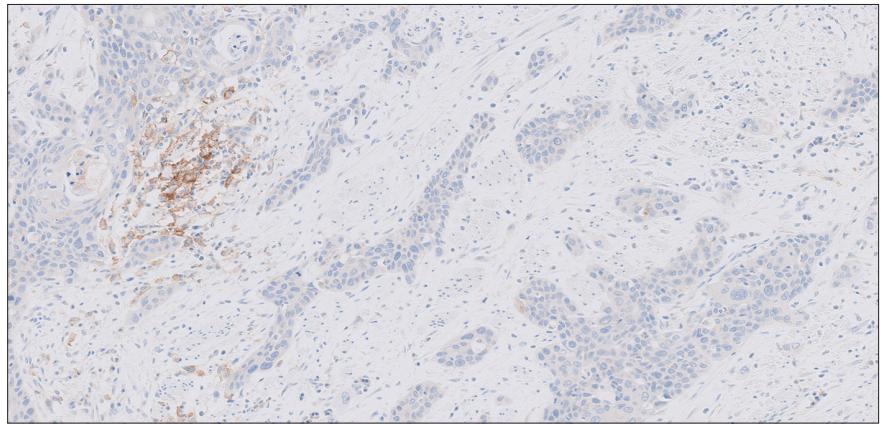


図 17b. 対物レンズ 20 倍

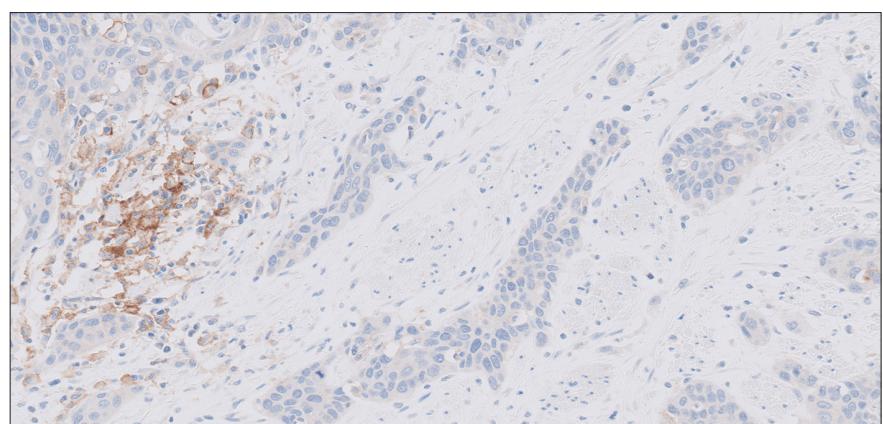
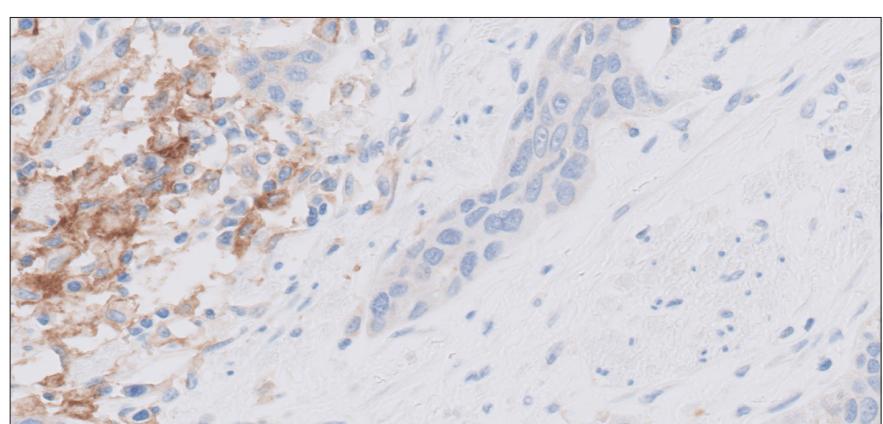


図 17c. 対物レンズ 40 倍



症例 4：PD-L1 発現率 1 % 以上

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

図 18a. 対物レンズ 10 倍

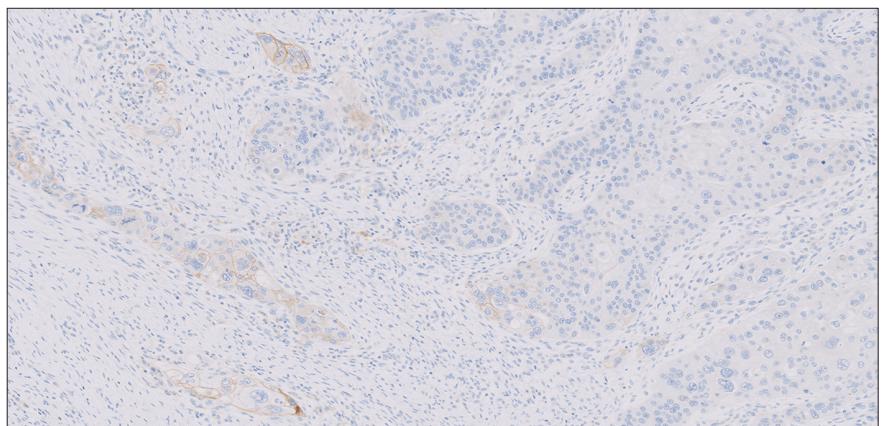


図 18b. 対物レンズ 20 倍

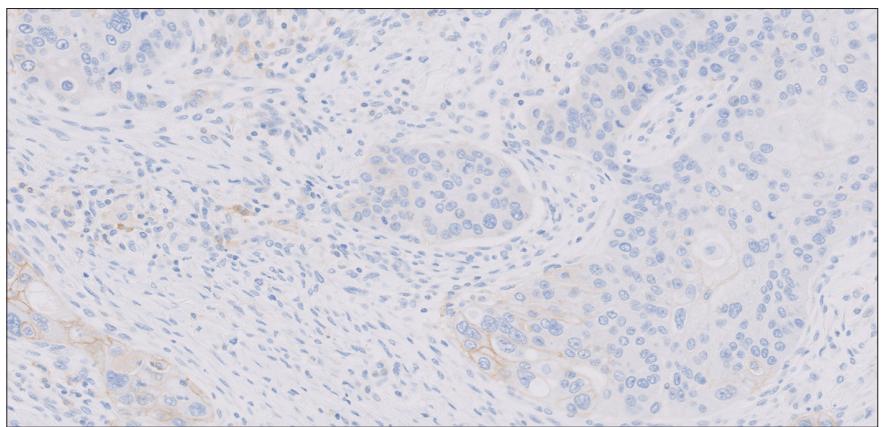
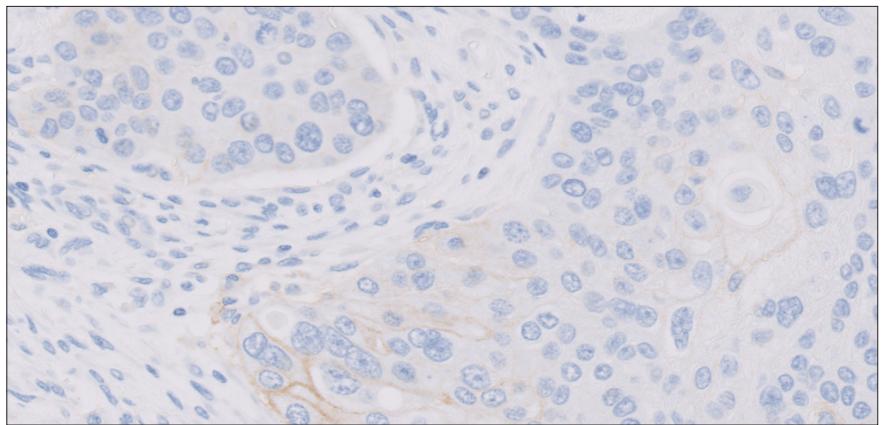


図 18c. 対物レンズ 40 倍



症例 5：PD-L1 発現率 1 % 以上

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

図 19a. 対物レンズ 10 倍

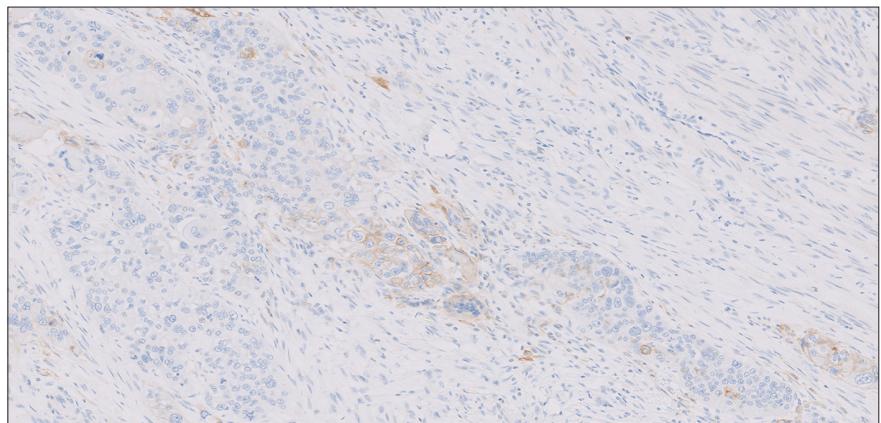


図 19b. 対物レンズ 20 倍

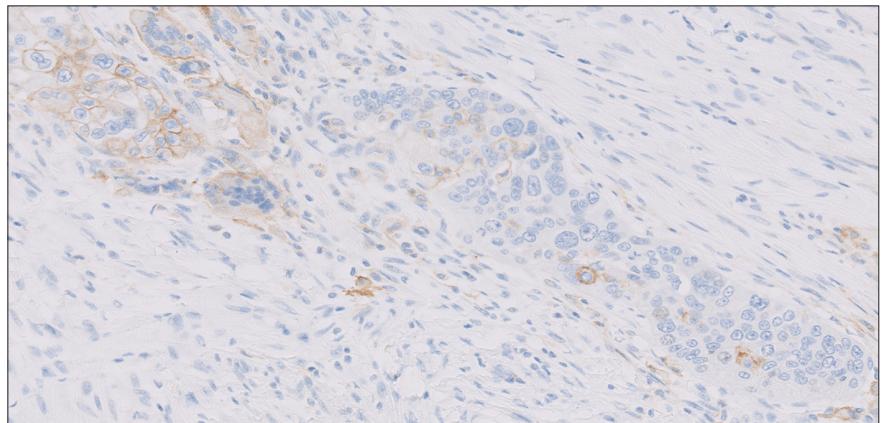
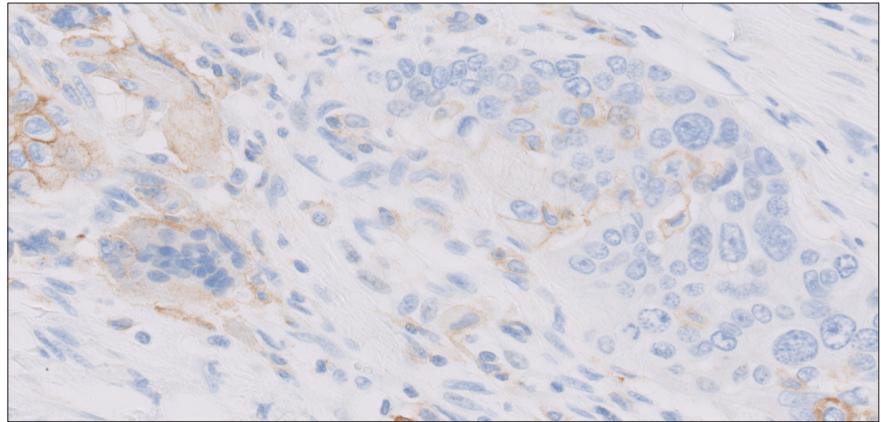


図 19c. 対物レンズ 40 倍



症例 6：PD-L1 発現率 1 % 以上

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

図 20a. 対物レンズ 10 倍

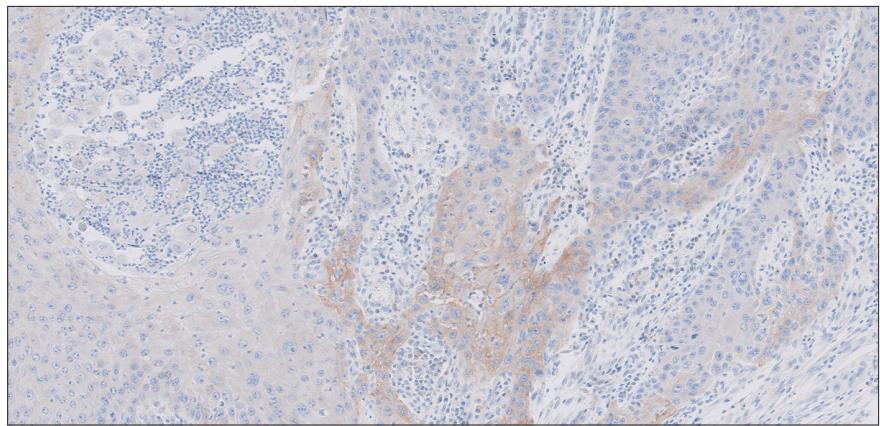


図 20b. 対物レンズ 20 倍

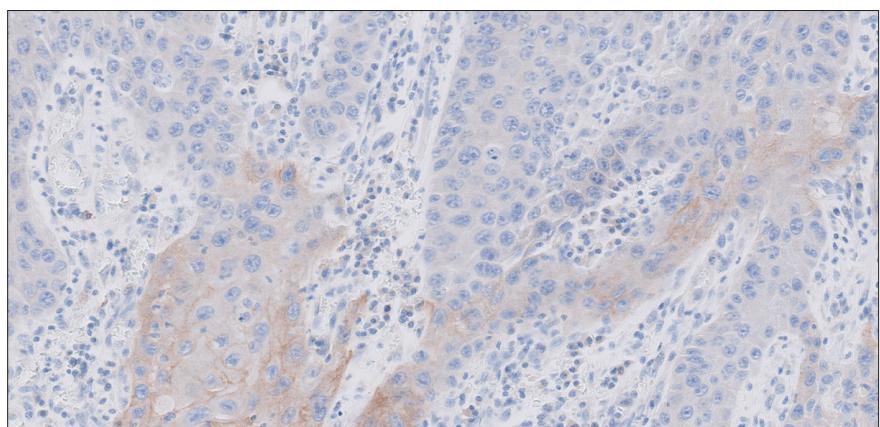
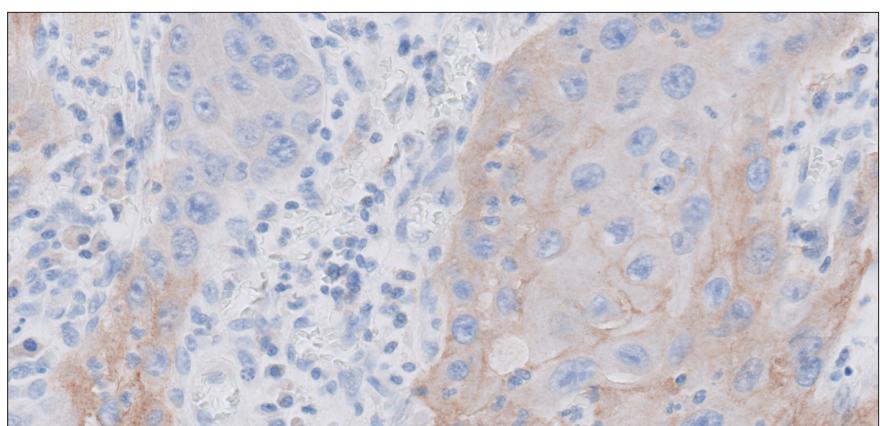


図 20c. 対物レンズ 40 倍



症例 7：PD-L1 発現率 1 % 以上

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

図 21a. 対物レンズ 10 倍

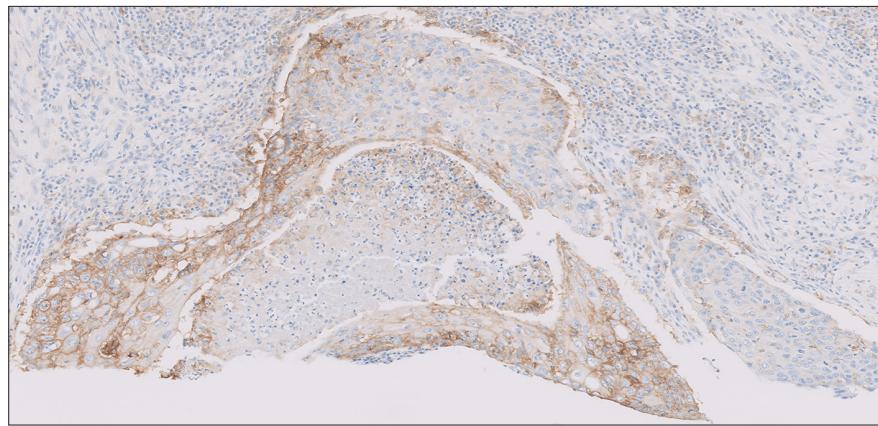


図 21b. 対物レンズ 20 倍

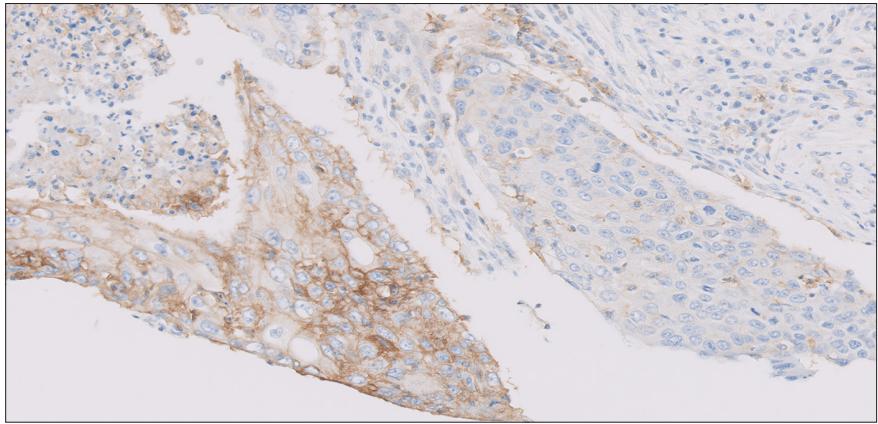
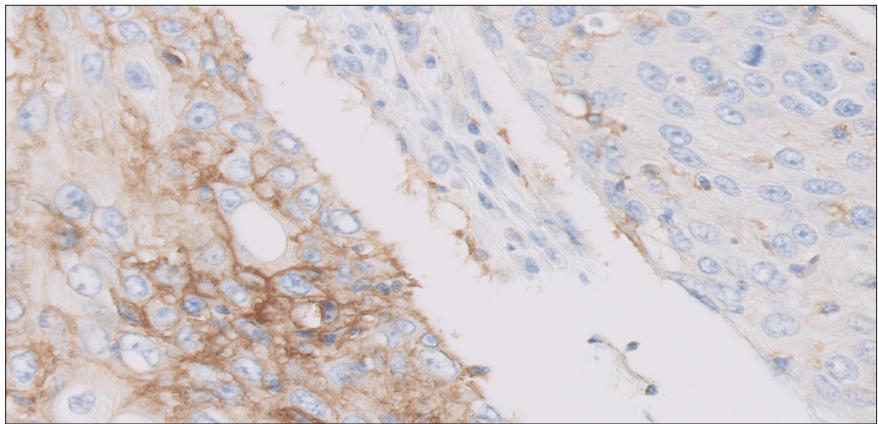


図 21c. 対物レンズ 40 倍



症例 8：PD-L1 発現率 1 % 以上

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

図 22a. 対物レンズ 10 倍

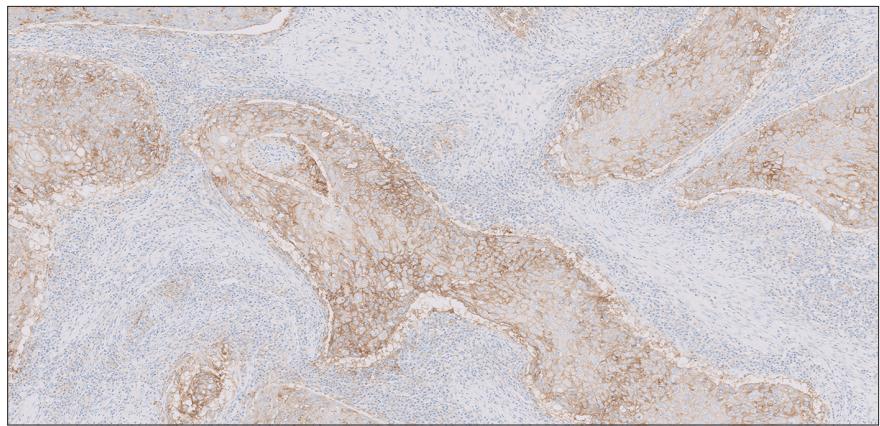


図 22b. 対物レンズ 20 倍

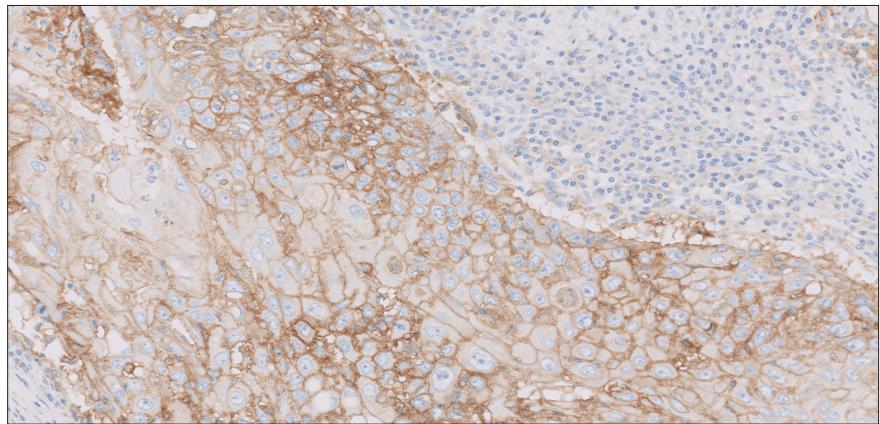
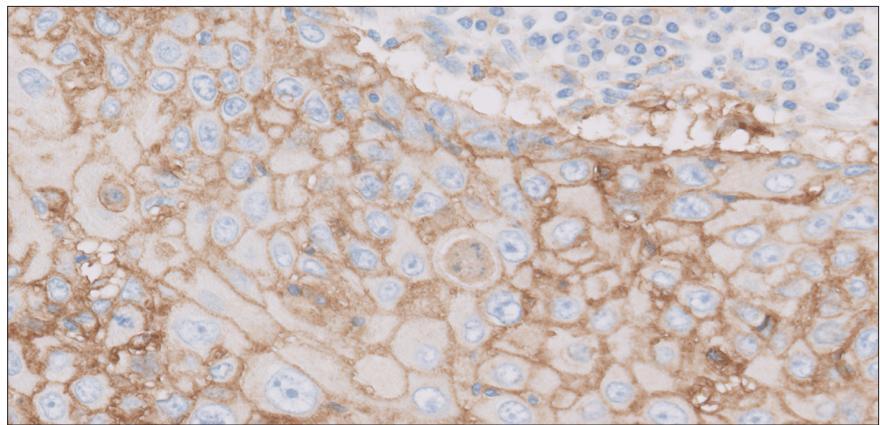


図 22c. 対物レンズ 40 倍



PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」では評価が困難な食道癌の例

症例 1：PD-L1 発現率 1 % 未満

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

図 23a. 対物レンズ 10 倍

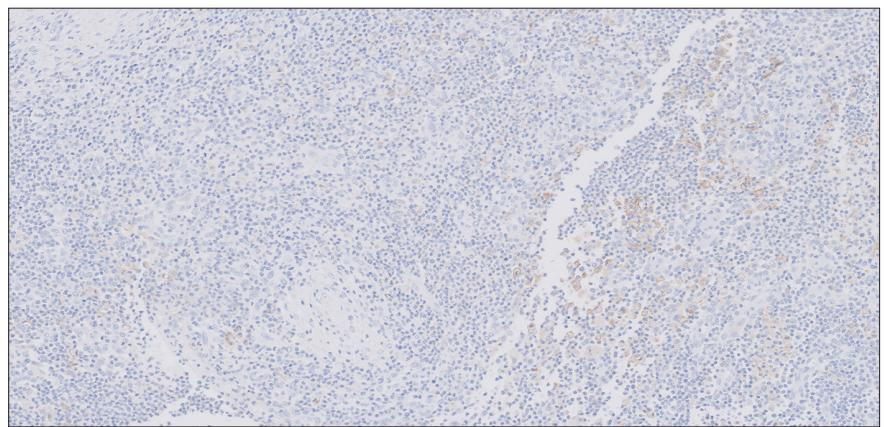


図 23b. 対物レンズ 20 倍

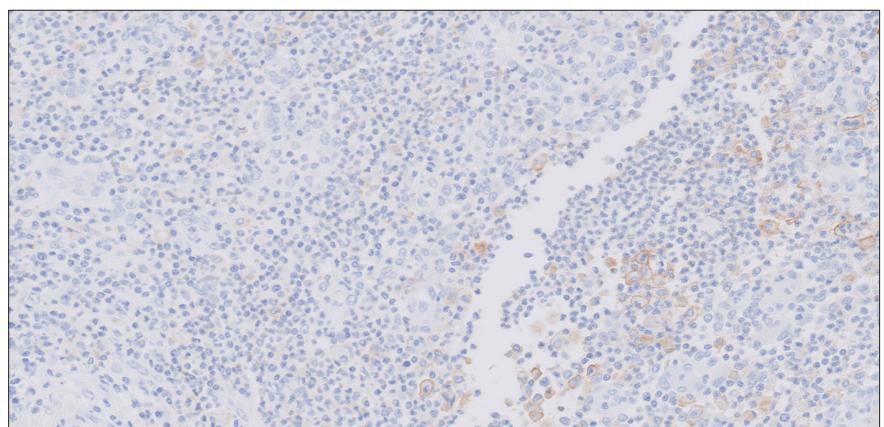
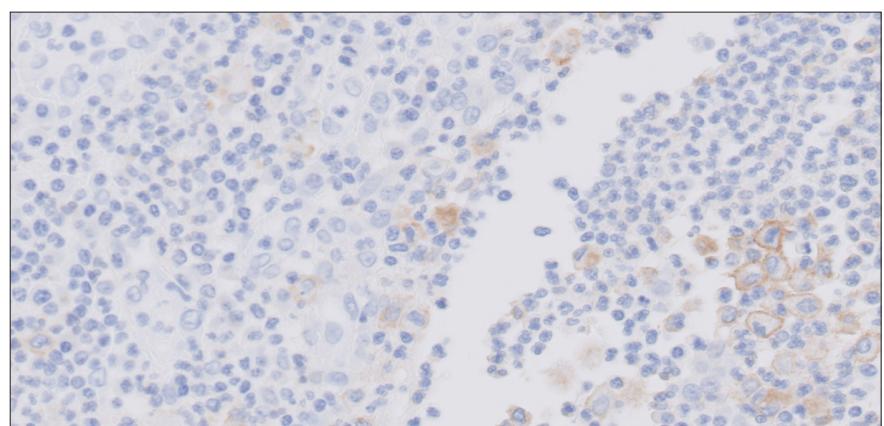


図 23c. 対物レンズ 40 倍



症例 2：PD-L1 発現率 1 % 未満

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

図 24a. 対物レンズ 10 倍

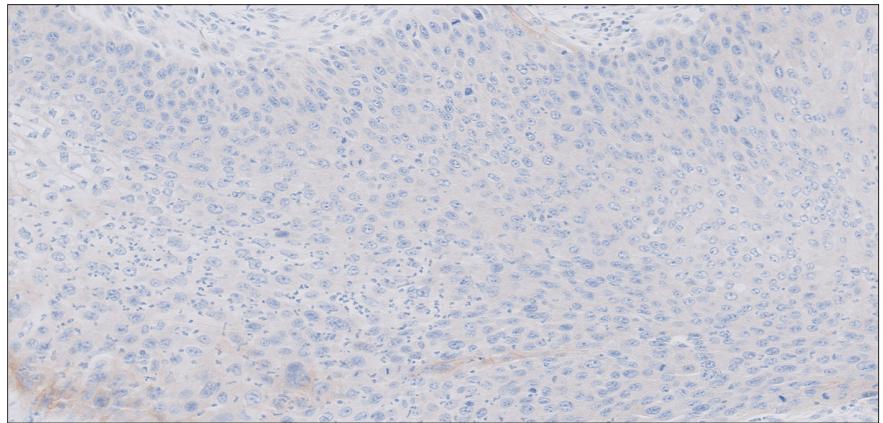


図 24b. 対物レンズ 20 倍

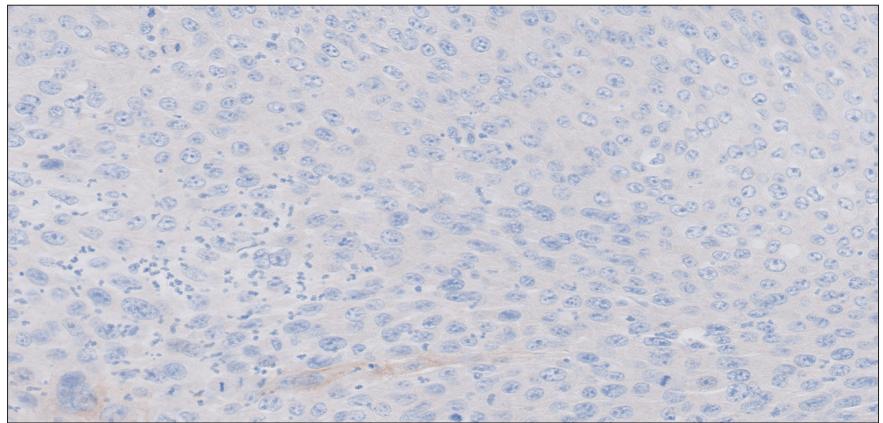
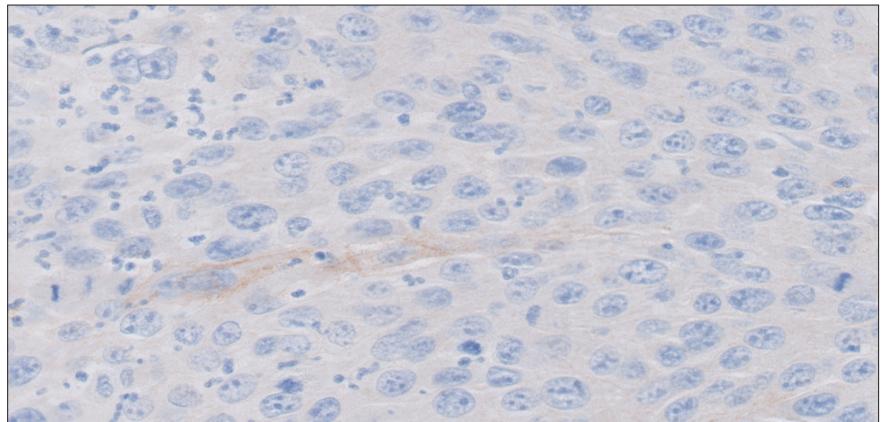


図 24c. 対物レンズ 40 倍



症例 3：PD-L1 発現率 1 % 以上

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

図 25a. 対物レンズ 10 倍

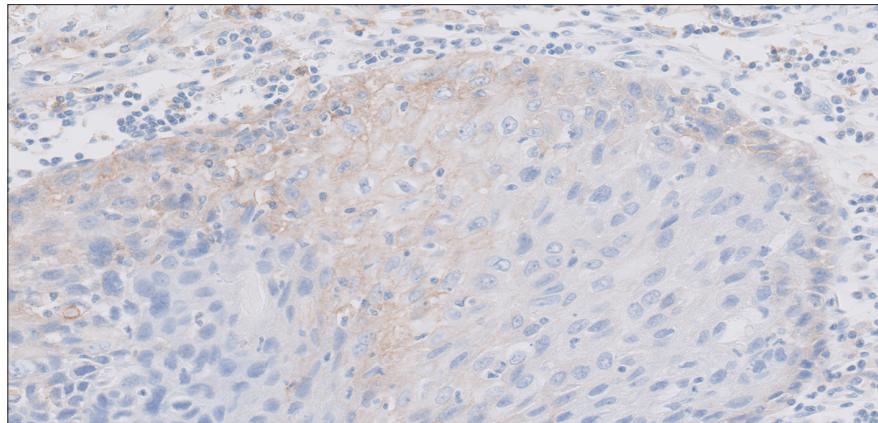


図 25b. 対物レンズ 20 倍

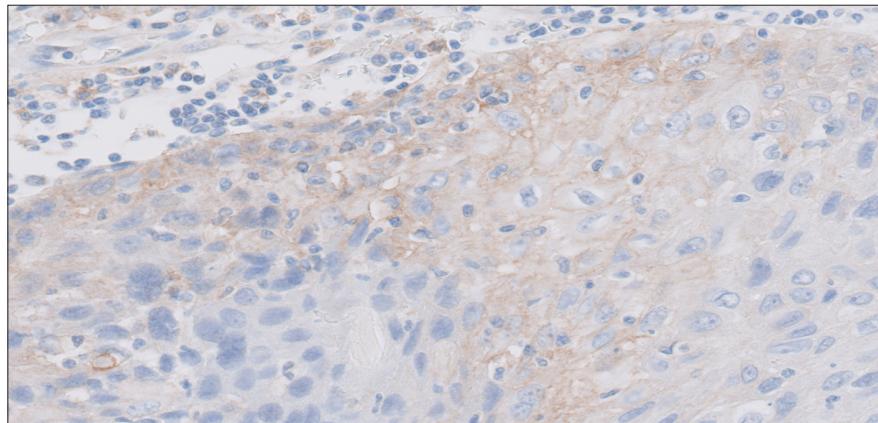
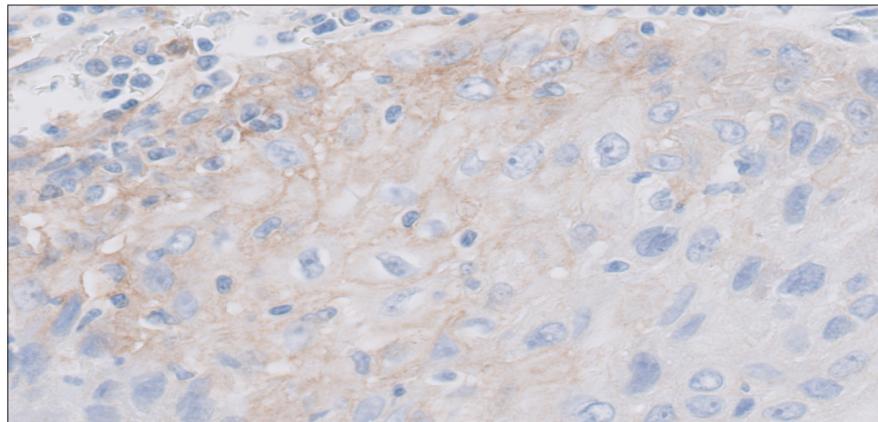


図 25c. 対物レンズ 40 倍



症例 4：PD-L1 発現率 1 % 以上

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

図 26a. 対物レンズ 10 倍

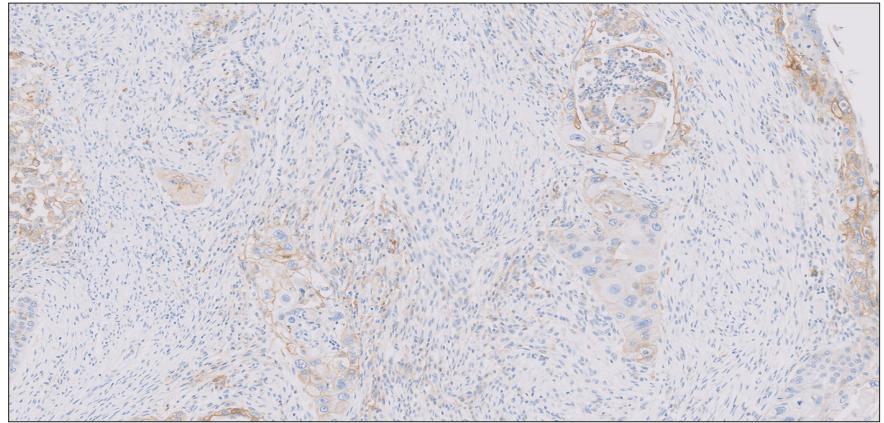


図 26b. 対物レンズ 20 倍

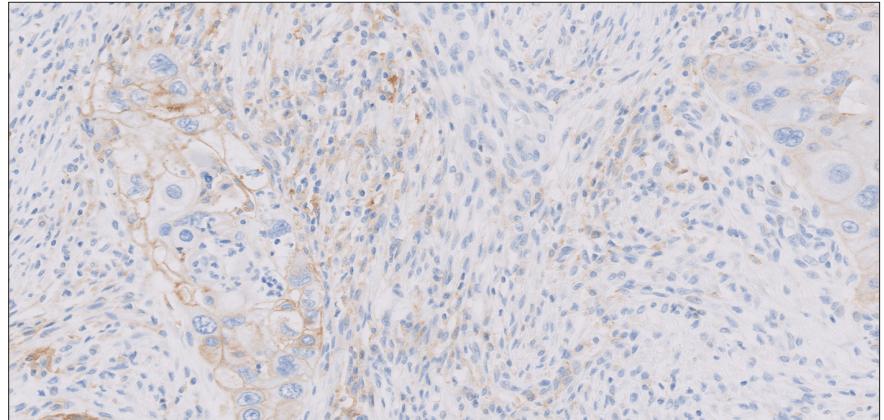
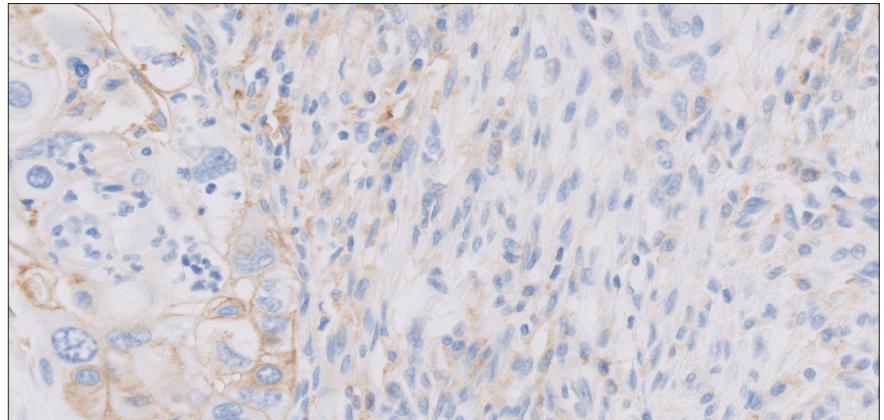


図 26c. 対物レンズ 40 倍



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、検体の固定やプロセシングなどの前処理、脱パラフィン不良やスライドの洗浄不良などから引き起こされますが原因はこれらに限定されるものではありません。

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

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。

過剰な細胞質染色がスコアリングを妨害する場合には、その ESCC 検体の測定は判定不可とみなされることがあります。腫瘍の細胞膜染色が認められますが（黒矢印）、検体の一部分で細胞質が過剰に染色されています（赤矢印）。

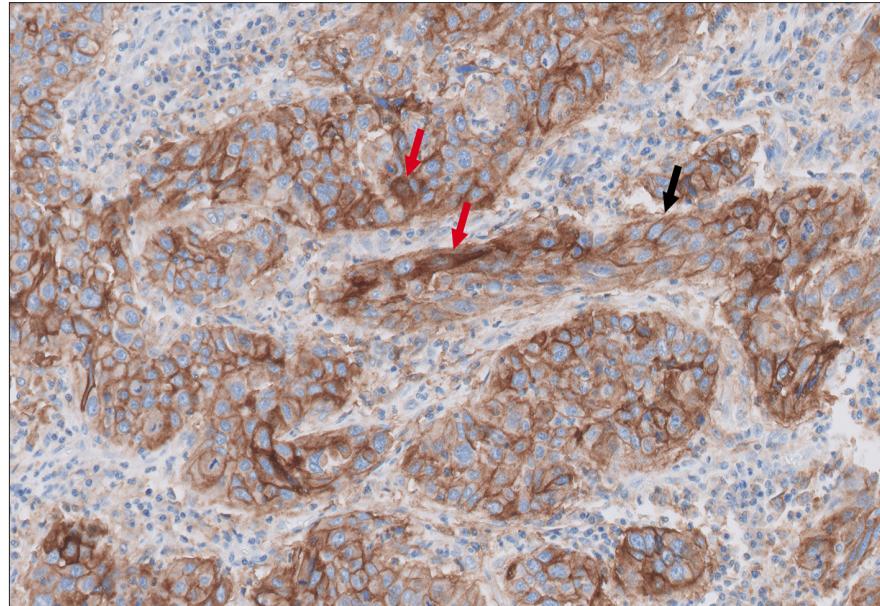


図 27. 対物レンズ 20 倍

壊死

壊死組織は非特異的染色を示す場合があるため、スコアリング対象から外します。

注意事項：検体が過度に壊死しており、含まれる生存腫瘍細胞が 100 個未満の場合、その検体は評価不適正検体とみなします。

壊死組織は非特異的染色を示す場合があるため、腫瘍陽性割合のスコアリング対象から外します。壊死領域ではなく、判定対象となる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。

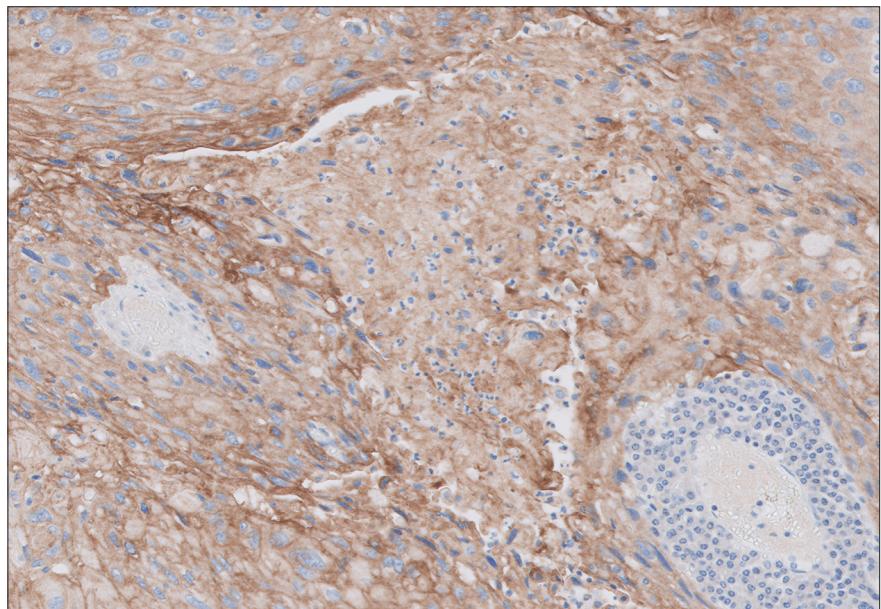


図 28. 対物レンズ 20 倍

ヘモジデリン、対物レンズ 20 倍

PD-L1陰性の腫瘍細胞とヘモジデリンアーチファクトを示す検体（黒矢印）。ヘモジデリンは、PD-L1 発現のスコアリング対象から外します。PD-L1 陽性の免疫細胞は、PD-L1 発現率判定の対象外です。

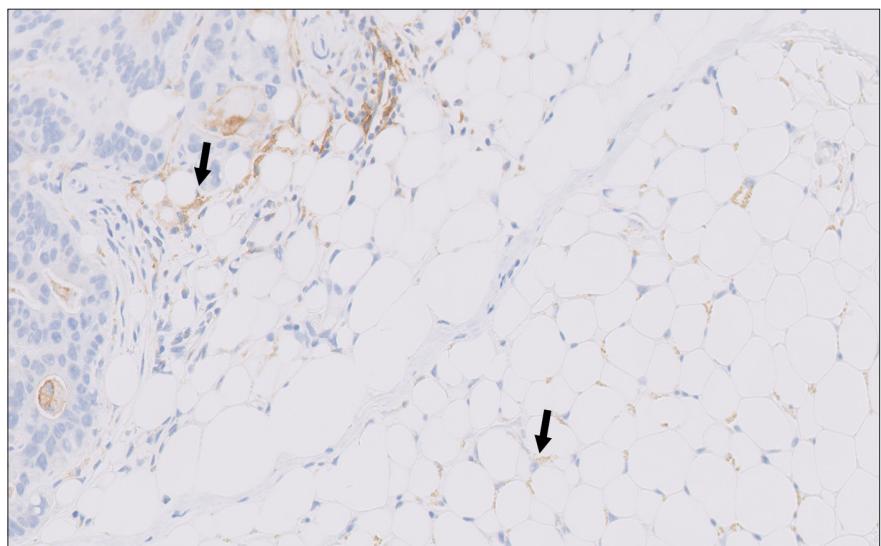


図 29. 対物レンズ 20 倍。食道腺癌検体。

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. ダコ Autostainer Link 48 のプログラミングエラー 1b. 基質溶液の反応不足 1c. 洗浄液中のアジ化ナトリウム 1d. 本品中のコントロールスライド自体の劣化	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. 基質溶液が正しく調製されていることを確認する 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. 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 2b. 滴下した試薬の量が不十分 2c. 不適切な洗浄液を使用	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. 組織切片のサイズと試薬滴下量を確認する 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 3b. 不適切な洗浄液を使用	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. 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. 過度の非特異的染色を認める	4a. 脱/パラフィン不良 4b. ダコ Autostainer Link 48 へ装填時にスライドが乾燥した 4c. 組織切片への試薬の非特異吸着 (反応) 4d. 不適切な固定方法 4e. 洗浄液の混合不良	4a. 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. 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. 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. 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 4e. 洗浄液が適切に混合され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 5b. 不適切な検体処理	5a. 適切なコーティング済みスライドを使用 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 6b. 不適切な洗浄液を使用	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. 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 (1x) が漏る	7. 加熱時に抗原賦活液 (1x) が漏って見える	7. これは正常であり、染色には影響しない

問題	考えられる原因	推奨される処置
8. 抗原賦活液 (1x) が pH 仕様を満たしていない	8a. pH メータが正しく較正されていない 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 8c. 間違った抗原賦活液を使用している	8a. 製造業者の推奨手順に従って pH メータを較正する。再較正後、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) を廃棄する。新しい抗原賦活液 (1x) を調製する。新しい抗原賦活液 (1x) の pH をチェックする。 8b. 蒸留水または脱イオン水を使用して抗原賦活液 (1x) を調製する 8c. 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する

参考文献

- Doki, Y.; Ajani, J.A.; Kato, K.; et al. Nivolumab Combination Therapy in Advanced Esophageal Squamous-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2022**, 386(5), 449–462.
- Finklea, J. Explosive Azide Hazard- Procedures for the Decontamination of Plumbing Systems Containing Copper And/Or Lead Azides. *DHHS* **1976**, 78–127.
- Hewitt, S.; Robinowitz, M.; Bogen, S.; et al. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays, CLSI Document, 2nd Edition. *I/LA28-A2* **2011**, 31(4).
- イピリムマブ添付文書
- ニボレマブ添付文書
- Omata, M.; Liew, C.T.; Ashcavai, M.; Peters, R.L. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *Am. J. Clin. Path.* **1980**, 73(5), 626–632.
- PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」添付文書
- Phelps, R.M.; Johnson, B.E.; Ihde, D.C.; et al. NCL-Navy Medical Oncology Branch cell line data base. *J. Cell.Biochem.Suppl.* **1996**, 24, 32–91.
- Taylor, C.R.; Rudbeck, L. Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods. Sixth Edition. Agilent Carpinteria, California; **2013**.
- Topalian, S.L.; Hodi, F.S.; Brahmer, J.R.; et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New. Eng. J. Med.* **2012**, 366(26), 2455–2465.
- Wang, C.; Thudium, K.B.; Han, M.; et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol. Res.* **2014**; 2(9), 846–856.

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、ニボルマブおよびイピリムマブの添付文書をご参照ください。

掲載内容は予告なく変更する場合がございます。

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/>

P220339

© Agilent Technologies, Inc. 2022

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

Published in Japan, May. 2022

29501JA 2022May