

この添付文書をよく読んでから使用して下さい。

**** 平成 28 年 11 月改訂（第 6 版）**

*** 平成 27 年 9 月改訂（第 5 版）**

体外診断用医薬品

日本標準商品分類番号：87746

製造販売承認番号：22000AMX02113000

組織検査用腫瘍マーカーキット

EGFR pharmDx「ダコ」

重要な基本的注意事項

- （1）本添付文書に記載された使用方法及び使用目的以外の使用については、染色結果の信頼性を保証できないので、記載内容に従って使用すること。各施設独自の検体組織作製法や操作方法により本品を使用すると、EGFR 発現患者の選別・判定が正確に行うことができないおそれがある。
- （2）正確な検出結果を得るために、キットに含まれるタンパク分解酵素試薬による抗原賦活処理を必ず行うこと。他の種類のタンパク分解酵素試薬や他の方法による抗原賦活処理は、検出結果の再現性を損なう恐れがあるので、本添付文書に示した操作法を必ず守ること。
- （3）病理組織化学染色は、染色前の病理組織切片の取扱いや作製法が、染色結果に大きく影響する。病理組織切片の不適切な作製過程（固定が不十分である、或いは過度の固定等）、凍結、融解、洗浄、乾燥、加熱、薄切、また、他の病理組織や試薬とのコンタミネーションは非特異反応や偽陽性・偽陰性結果の原因となるおそれがあるので、十分注意すること。そのため最適試薬の選択、検体組織の選別・固定・作製、検体組織スライドの作製から染色結果の判定に至るまで、熟練した者が行うこと。
- （4）標本作製の情報が無い検体や、やむをえず固定が適切でない検体を検査に使用する場合、その染色結果の解釈には十分注意し実施する必要がある。
- （5）染色結果の判定に際しては、適切な判定を行える十分な経験を持った判定者が実施すること。

全般的な注意

- （1）本製品は、体外診断用医薬品でありそれ以外の目的に使用しないこと。
- （2）検出結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果、最新の所見等と併せて、担当医師が総合的に判断すること。
- （3）使用する医療機器の添付文書や取扱説明書を良く読んでから使用すること。

形状・構造等（キットの構成）

構成試薬名	成分	容量	
		K1492	K1494
タンパク分解酵素試薬	プロテイナーゼ K	8mL×1	11mL×2
ブロッキング試薬	過酸化水素水	8mL×1	11mL×2
一次抗体	抗ヒト EGFR (2-18C9)・マウスモノクローナル抗体	4mL×1	12mL×1
一次抗体陰性コントロール	IgG1・マウスモノクローナル抗体	4mL×1	11mL×1
ポリマー試薬	パーオキシダーゼ標識デキストラン 70 結合抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体	8mL×1	11mL×2
	パーオキシダーゼ標識デキストラン 500 結合抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体		
基質緩衝液	過酸化水素水 (30%)	10mL×1	11mL×10
	イミダゾール緩衝液		
発色基質	3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド	1mL×1	3mL×2
濃縮洗浄液	トリス塩酸緩衝液	1L×1	1L×2
コントロールスライド	ホルマリン固定パラフィン包埋された次の細胞株 2 種類を貼付したスライド <p>CAMA-1 (EGFR タンパク発現量レベル：0)</p> <p>HT - 2 9 (EGFR タンパク発現量レベル：2+)</p>	5 枚×1	5 枚×2

使用目的

組織・細胞中の EGFR（上皮増殖因子受容体）タンパクの検出（悪性腫瘍診断の補助等）

検出原理

- （1）検出方法の概要

本品は、通常の病理検査室において通常診断に供与されているホルマリン固定パラフィン包埋した病理組織標本を用いて、対象病理組織の腫瘍細胞に EGFR タンパク発現が認められるか否かを判定する際に用いられる。その際の検出方法として、免疫組織化学的手法を用いている。

- （2）検出原理

検体中の EGFR タンパクに対し、特異的な一次抗体（抗ヒト EGFR (2-18C9)・マウスモノクローナル抗体）を反応させる。次にポリマー試薬を反応させることにより、ポリマー試薬中の抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体が一次抗体と反応する。更にデキストランの分子を介して、ポリマー試薬中のパーオキシダーゼが結びつき、＜抗原―一次抗体―抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体―パーオキシダーゼ＞複合体が形成される。これに基質溶液を反応させると、ポリマー試薬中のパーオキシダーゼの酵素反応によって、基質溶液中の 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド（DAB）が過酸化水素により酸化されて酸化 DAB を生じ、最終的には酸化的環形成を行って、オスマウム好性可視産物が生成され、抗原部位が褐色に染色される。染色により可視化された抗原部位を光学顕微鏡にて観察する。

- （3）特徴

- ①発色系の酵素として、最も一般的なパーオキシダーゼを使用している。
- ②酵素抗体反応を利用した 3 ステップの簡便な病理組織化学染色法である。

操作上の注意

- （1）病理組織は出来るだけ新鮮なものを使用すること。
- （2）検体組織は、「用法・用量（操作方法） 2. 検体の取り扱い」で指示された条件下、非緩衝ホルマリンなど、一般的に使用されているホルマリン固定液で固定したパラフィン包埋病理組織を使用すること。
- （3）3 日を超えるような長時間の固定、更にパラフィン包埋までの一連の操作により、ポリマー試薬の浸透力が低下し、反応性が低下する場合がある。免疫染色に適した病理組織標本の作製法に留意すること。
- （4）一般的に薄切前のパラフィン包埋病理組織は 15～25℃で長期間（2 年間程度）保存可能である。
- （5）検体組織を貼付するスライドは、抗原賦活処理により組織切片がスライドガラスから剥がれやすくなる恐れがあるので、シランコートされたスライドガラスを使用すること。アルブミンスライドの使用は避けること。
- （6）検体組織スライドは 20～25℃で保存し、作製後 4～6 週間以内に染色操作を行うこと。一般的にこの期間を越えた検体組織をスライドとして用いると、切片中の EGFR タンパクが変性し抗原性が劣化して、偽陰性染色を起こす場合があるので使用しないこと。^{①)}
- （7）パラフィンの残留はバックグラウンド染色の原因となるので、完全に除去した後に染色操作を行うこと。そのため、脱パラフィンに用いるキシレン及びエタノールは、新しいものを使用すること。
- （8）検体組織スライドを脱パラフィンした後、すぐに染色操作に移れない場合は、洗浄液に浸し、2～8℃で保存し、少なくとも 16 時間以内には染色操作にはいらないこと。一般的にこれ以上の長期にわたる保存は抗原性の劣化を引き起こすことがあると考えられているので使用しないこと。
- （9）染色操作は常温で行うこと。
- （10）反応の際には、検体組織が乾かないよう、例えば湿潤箱等を用いて、常に湿潤状態を保つこと。
- （11）染色中に沈殿を生じることがあっても、染色には影響を及ぼすことはないので、取り除く必要はない。
- （12）必ず陽性及び陰性対象のスライドを検体組織スライドと並行して染色操作を進行させること。
- （13）キットに含まれるコントロールスライドを検体組織スライドと並行して染色操作を行い、染色操作が適切に行われていることを確認すること。
- （14）万一、染色操作を中断しなければならない場合は、一次抗体を反応させた後、検体組織スライドを緩衝液中に浸して保管すること。一般的には常温で 1 時間以内なら染色結果に影響はない。
- （15）人為的に生じる染色性の低下及び偏った染色を防ぐために、余分な水分を除去し、試薬を均一に広げるように注意すること。
- （16）検体組織に含まれる多量の内因性パーオキシダーゼにより、そのブロッキングが不十分な場合、非特異的な発色をおこなうことがある。また、キット中の基質溶液調製時に余分なアジ化ナトリウムを添加する事により、発色基質（3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド）の発色反応が阻害される。^{②)③)}
- （17）水溶性封入剤で封入した場合、カバーガラスをかけた検体組織スライドを強い光に 1 週間以上さらすと、曇りが生じることがある。染色後のスライドは常温で遮光保存すること。

用法・用量（操作方法）

- 1. 必要な器具及び試薬

《器具》

- ・洗浄ビン
- ・ろ紙
- ・タイマー
- ・染色ドーズ
- ・湿潤箱
- ・噴射ビン
- ・カバーガラス
- ・スライドガラス（シランコーティングスライド Code No.S3003 または S4103)
- ・乾燥器
- ・光学顕微鏡

《試薬》

■脱パラフィン用

- （1）キシレン（JIS K8271)
- （2）100%、95%、80%、70%、50%、各エタノール

■その他

- （1）トリス塩酸緩衝液 0.05mol/L pH7.6

6.1g のトリス・（ヒドロキシメチル）-アミノメタンを約 50mL の精製水で溶かし、それに 1mol/L 塩酸 37mL を加えて精製水で最終的に 1L にする。（pH7.6 ±0.2;25℃）
- （2）精製水
- （3）対比染色液

ヘマトキシリン（Code No. S2020)
- （4）封入剤

非水溶性の永久標本用封入剤（例：エンテランニユーノマリノール）が望ましい。
- （5）pH8.0 のアルカリ溶液

アンモニア水等

《検体組織スライド》

次の目的に最低 5 枚の検体組織スライドを作製することが望ましい。

- ① H&E 染色用（腫瘍細胞の確認）：1 枚
- ② EGFR タンパク検出用：1 枚
- ③ 一次抗体陰性コントロール用：1 枚
- ④ 予備：2 枚

《コントロールスライド》

染色操作の適切性の確認目的のために、キットの付属品のコントロールスライドを染色操作較正用標準スライドとする。

■陽性対照のコントロールスライド

陽性対照のコントロールスライドとして、検体組織スライドと同じ方法で作製され、あらかじめ EGFR タンパク陽性であることが確認されている病理組織標本の切片スライドを用意する。

■陰性対照のコントロールスライド

陰性対照のコントロールスライドとして、検体組織スライドと同じ方法で作製され、あらかじめ EGFR タンパク陰性であることが確認されている病理組織標本の切片スライドを用意する。

- 2. 検体の取扱い

《パラフィン包埋切片の作製法》

病理組織片は 2×2.5×0.5cm 程度以内の大きさとし、採取後ただちに、組織切片の 5～50 倍量のホルマリン固定液に浸す。この際、ホルマリン固定液に浸漬する時間は 24～48 時間以内が望ましい。特に 3 日以上固定した症例に関しては、染色結果に影響がある場合が考えられる。

病理組織ブロックは上記方法にて固定後、水洗いし、70vol%エタノールに浸す。それを順次高濃度となる系列のエタノールに浸して脱水し、更にキシレンに浸して脱アルコールした後パラフィン包埋する。包埋の際には温度が 60℃を超えないよう注意する。適切な方法で固定及び包埋した薄切前の病理組織ブロックは、常温での長期間保存が可能であり、EGFR タンパクの抗原性は良好に保持される。

《標本の作製》

検体組織スライド、陽性対照のコントロールスライド、陰性対照のコントロールスライドは同時に作製すること。パラフィン包埋ブロックはミクロトームで 4 μm に薄切し、スライドガラスに貼り付け、40±3℃の恒温槽内で十分に乾燥させる。組織切片作製後は抗原性保持のため 20～25℃で保管し、遅くとも 4～6 週間以内に染色を実施すること。

《脱パラフィン》

染色操作の直前に脱パラフィンを行う。検体組織スライドを以下の様に順に各液に浸す。

キシレン（100vol%）5 分→キシレン（100vol%）5 分→キシレン（100vol%）5 分→エタノール（100vol%）3 分→エタノール（100vol%）3 分→エタノール（95vol%）3 分→エタノール（80vol%）3 分→エタノール（70vol%）3 分→エタノール（50vol%）3 分→精製水 3 分→精製水 3 分

- 3. 試薬の調製法、安定性

試薬は使用前に常温にもどすこと。

試薬は最適結果が得られるように至適濃度に調製されているので、使用の際は以下（1）～（2）以外の希釈をしないこと。

- （1）基質溶液の調製法

基質緩衝液 1mL に対して、発色基質 1 滴（25～30 μL）を加えて混合する。調製後の基質溶液は、なるべく早く使用する。

- （2）洗浄液の調製法

濃縮洗浄液を精製水で 10 倍希釈し、洗浄液とする。調製後の洗浄液は 2～8℃及び常温で 8 日間安定である。保存中、洗浄液が混濁した場合は使用せず廃棄する。

- （3）その他の試薬

その他の試薬はそのまま用いる。

- 4. 染色操作

《染色方法》

必ず本キットの較正標準であるコントロールスライド、陽性及び陰性対照のスライドを検体組織スライドと並行して染色操作を進行させること。

■用法

- （1）検体組織スライドの過剰水分を払い落とし、検体組織の周囲の水分をキムワイブ等で十分注意しながら拭き取る。
- （2）タンパク分解酵素試薬 3 滴（約 100 μL）で検体組織を覆い、常温で 5 分間反応させる。次に、流水にて約 3 分間静かにすすいだ後、過剰水分を払い落とし、検体組織スライドを精製水中に 5 分間浸漬する。
- （3）検体組織スライドの過剰水分を払い落とし、検体組織の周囲の水分をキムワイブ等で十分注意しながら拭き取る。
- （4）ブロッキング試薬 3 滴（約 100 μL）で検体組織を覆い、常温で 5 分間反応させる。次に、流水にて約 3 分間静かにすすいだ後、過剰水分を払い落とし、検体組織スライドを洗浄液中に 5 分間浸漬する。
- （5）検体組織スライドの過剰水分を払い落とし、検体組織の周囲の水分をキムワイブ等で十分注意しながら拭き取る。
- （6）一次抗体 3 滴（約 100 μL）で検体組織を覆い、常温で 30 分間反応させた後、噴射ビンに入れた洗浄液で静かにすすいで、洗浄液中に 5 分間浸漬する。この洗浄液を新しいものに交換し、更に 5 分間浸漬する。一次抗体陰性コントロール用検体組織スライドには、一次抗体の代わりに一次抗体陰性コントロール 3 滴（約 100 μL）で検体組織を覆い、以下同様に操作を行う。
- （7）検体組織スライドの過剰水分を払い落とし、検体組織の周囲の水分をキムワイブ等で十分注意しながら拭き取る。
- （8）ポリマー試薬 3 滴（約 100 μL）で検体組織を覆い、常温で 30 分間反応させた後、噴射ビンに入れた洗浄液で静かにすすいで、洗浄液中に 5 分間浸漬する。この洗浄液を新しいものに交換し、更に 5 分間浸漬する。
- （9）検体組織スライドの過剰水分を払い落とし、検体組織の周囲の水分をキムワイブ等で十分注意しながら拭き取る。
- （10）基質溶液 100 μL で検体組織を覆い、常温で 10 分間反応させた後、噴射ビンに入れた精製水或いは洗浄液で静かにすすぎ、洗浄液中に 5 分間浸漬する。
- （11）対比染色液に 1～5 分間浸漬し、5 分間流水で洗浄して対比染色する。
- （12）必要に応じてアンモニア水などの pH8.0 のアルカリ溶液に浸漬し、色出し操作をする。

