**この電子化された添付文書をよく読んでから使用してください。

体外診断用医薬品

**2025 年 2 月改訂(第 5 版)
*2012 年 6 月改訂(第 4 版)

クラスⅢ免疫組織学検査用シリーズ
販売名 ヒストファイン シンプルステインシリーズ
PgR(MONO)

抗プロゲステロンレセプターモノクローナル抗体(A9621A)

承認番号 : 21800AMX10399000

【全般的な注意】

1.本製品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないこと。
2.診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断すること。
**3.電子化された添付文書の記載から逸脱した使用方法については保証しない。
4.ヒト由来の検体は、感染の危険があるものとして取り扱いに注意すること。
**5.使用する機器の電子化された添付文書および取扱説明書をよ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 成分	製品区分 ユニバーサルキット※1 20 テスト	製品区分 第一抗体 20 テスト
第一抗体 **抗ヒトプロゲステロンレセプター(PgR)モノクローナル抗体(クローン : A9621A)(動物種 : マウス)	2mL×1 本	2mL×1 本※2
陰性コントロール	2mL×1 本	—
酵素・第二抗体標識ポリマー **ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ポリクローナル抗体(Fab')(動物種 : ヤギ)	6mL×1 本	—
発色基質 **3,3'-ジアミノベンジジン・4HCl	1mL×1 本	—
基質緩衝液	1mL×1 本	—
発色試薬 **過酸化水素水	1mL×1 本	—
付属品		
濃縮抗原賦活化液※3	—	—
ブロッキング試薬 I **過酸化水素水	6mL×1 本	—
PBS(粉末)※4	—	—

※1 : PgR(MONO)ユニバーサルキットおよび各構成品は販売していない（第一抗体除く）ので、別売りの体外診断用医薬品「ヒストファイン シンプルステインシリーズ ER/PgR(MONO)ユニバーサルキット Code:427061」を使用すること。
※2 : 単品にて第一抗体 抗プロゲステロンレセプターモノクローナル抗体(A9621A)(動物種 : マウス)を別売りしている。
※3 : 付属品 濃縮抗原賦活化液は付属していないので、別売りの研究用試薬「ヒストファイン 抗原賦活化液 pH9 Code:415211(10 倍濃縮)」を使用すること。
※4 : 付属品 PBS(粉末)は付属していないので、別売りの研究用試薬「PBS Code:415223」を使用すること。

【使用目的】

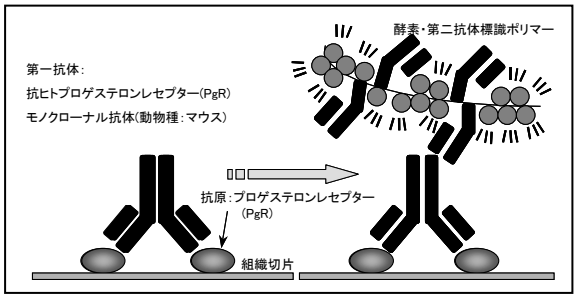
組織、細胞中のプロゲステロンレセプター(PgR)の検出（悪性腫瘍の診断補助）。

【測定原理】

本キットは、免疫組織化学染色法を用いて腫瘍細胞中のプロゲステロンレセプター(PgR)を検出し、そのタンパクの発現の有無を判定する。
最初に、腫瘍細胞中のプロゲステロンレセプター(PgR)に対する特異的な第一抗体注 1)を反応させ、次にアミノ酸ポリマーに酵素と第二抗体を結合させた試薬である酵素・第二抗体標識ポリマー注 2)を反応させる。この結果、抗原・抗体・ポリマー・酵素の複合体を形成させ、この複合体の酵素活性を利用して基質を発色させる。これにより抗原部位を視覚化し、光学顕微鏡により抗原の有無を確認する。

注 1) 第一抗体 :
抗ヒトプロゲステロンレセプター(PgR)モノクローナル抗体(クローン : A9621A) (動物種 : マウス)
注 2) 酵素・第二抗体標識ポリマー :
ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Fab')(動物種 : ヤギ)

第一抗体である抗ヒトプロゲステロンレセプター(PgR)モノクローナル抗体(クローン : A9621A)(動物種 : マウス)は、PgR と特異的に反応する。PgR はエストロゲンによって調節されるタンパク質であり、PgR の発現はエストロゲンレセプター(ER)経路が正常に働いていることを示す指標である。このため、PgR の発現の有無を ER と同時に検出することにより、ホルモン療法の効果の信頼性を更に高めることとなる。



【操作上の注意】

高濃度の固定液にさらしたり、長時間の固定を行ったりすると、組織崩壊や抗原変性を生じさせることがあるので、指定された固定液を使用する。

【用法・用量(操作方法)】

○フローチャート

脱パラフィン
↓
抗原賦活化液による処理
↓
ブロッキング試薬 I による処理
↓
第一抗体または陰性コントロールの添加・反応
↓
酵素・第二抗体標識ポリマーの添加・反応
↓
基質溶液の調製（発色基質+基質緩衝液+発色試薬）・添加・反応
↓
対比染色、封入

○検体の準備

組織形態や抗原活性を維持した最適固定を得るため、できるだけ新鮮で小さな組織切片(約 1cm×1cm×0.5cm)の使用と、下表の固定液の使用を勧める。

固定液	固定時間
10%(緩衝)ホルマリン	24-48 時間

○切片および標本の準備

[パラフィン包埋切片]

切片を 4μm に薄切し、poly-L-lysine またはシランコーティングスライドに付着させる。37℃の乾燥器内で 24 時間乾燥させる。

[検体標本スライドの準備]

検体標本スライドとして1検体あたり、2枚準備する。
1 枚は第一抗体を使用する。1 枚は、試薬対照スライドとして、第一抗体のかわりに陰性コントロールを使用して染色操作を行う。

[検体対照スライドの準備]

*・陽性コントロールスライド
検体標本スライドと同様の方法で作製され、あらかじめプロゲステロンレセプター(PgR)の発現があることを確認している組織切片スライド

*・陰性コントロールスライド
検体標本スライドと同様の方法で作製され、あらかじめプロゲステロンレセプター(PgR)の発現がないことを確認している組織切片スライド

以上の検体対照スライドを用意し、検体標本スライド及び試薬対照スライドと並行して、検体の準備から染色処理、検鏡までの全工程を行う。

○操作方法

*[必要な試薬、器具]
・キシレン　・カバーガラス　・95%エタノール　・100%エタノール
・対比染色試薬(ヘマトキシリン)　・ティッシュペーパー　・光学顕微鏡
・封入剤(非水溶性永久封入剤)　・湿潤箱　・精製水　・タイマー
・乾燥器　・染色ドーゼ　・洗浄用容器または洗浄びん
・温浴槽(95-99℃で加温できるもの)　・温度計　・試験管
・スライドガラス(poly-L-lysine またはシランコーティングスライド)
・耐熱性染色ドーゼ(95-99℃の温浴に耐久性のあるもの)
・スライドスタンド　・使い捨てゴム手袋　・軍手

[構成試薬]
・第一抗体：抗プロゲステロンレセプターモノクローナル抗体(A9621A)
・陰性コントロール　・酵素・第二抗体標識ポリマー
・発色基質　・基質緩衝液　・発色試薬

[付属品]
・濃縮抗原賦活化液　・ブロッキング試薬Ⅰ　・PBS(粉末)

[試薬の調製方法]
*(1)基質溶液の調製方法
発色基質1滴(約20μL)と基質緩衝液1滴(約20μL)を精製水1mLに加え、泡立てないように注意して混合する。次に発色試薬1滴(約40μL)を加え、再び泡立てないように注意して混合する。基質溶液は、遮光して冷蔵(2－8℃)保存し、調製後一週間以内に使用する。

注)混合時、溶液表面が泡立った場合は、使用時に泡を取り除くか、泡を避けて使用すること。

その他の試薬は、そのまま用いる。

[付属品の調製方法]
(1)抗原賦活化液の調製方法
(研究用試薬「抗原賦活化液 pH9　Code:415211(10 倍濃縮)」を使用することを推奨する。調製法は、以下の手順に従うこと。)
濃縮抗原賦活化液を精製水で10倍に希釈して抗原賦活化液とする。
調製後の抗原賦活化液は2－8℃で保存する。
(2)ブロッキング試薬Ⅰの調製方法
そのまま用いる。
(3) PBSの調製方法
(研究用試薬「PBS Code:415223」を使用することを推奨する。)
研究用試薬「PBS Code:415223」を使用する場合は、PBS(粉末)9.55gを精製水に溶解して1Lとする。
調製後のPBSは2－8℃で保存する。保存中、PBSが混濁した場合は使用しないこと。
(1回の洗浄で150mL使用した場合、約2.5LのPBSが必要となる。)

[脱パラフィン]
1．キシレン処理
(1)スライドをキシレンに3分間浸す。
(2)余分な液を振り払い、別のキシレンに3分間浸す。
(3)余分な液を振り払い、さらに別のキシレンに3分間浸す。

2．エタノール処理
(1)100%エタノールに3分間浸す。
(2)余分な液を振り払い、別の100%エタノールに3分間浸す。
(3)余分な液を振り払い、95%エタノールに3分間浸す。
(4)余分な液を振り払い、別の95%エタノールに3分間浸す。

3．洗浄
余分な液を振り払い、PBSでよくすすぐ(3分間ずつ容器を2度かえるか、または洗浄ビンを使用する)。

[抗原賦活化処理]
(1)温浴槽をあらかじめ95－99℃に温めておく。以下の操作を行うにあたり、軍手等用いて高温に気をつける。
(2)抗原賦活化液を調製し、耐熱性の抗原賦活化用染色ドーゼに入れ、温浴槽で95－99℃に温める。過剰な水分蒸発を防ぐためふたをしておく。(完全に密閉すると抗原賦活化用染色ドーゼを破損することがある。)
(3)スライドを抗原賦活化液に浸漬させ、ゆるくふたをする。
(4)抗原賦活化液の温度が95－99℃まで上昇したことを温度計で確認してから、40分間、95－99℃でインキュベートする。
(5)抗原賦活化用染色ドーゼを温浴槽から取り出し、ふたをはずす。スライドを浸したまま常温(15－25℃)で20分間放置しゆっくり熱を冷ます。
(6)スライドを抗原賦活化液から取り出し、PBSでよくすすぐ(3分間ずつ容器を1度かえるか、または洗浄ビンを使用する)。

**[ブロッキング試薬Ⅰ(過酸化水素水)による処理(内因性ペルオキシダーゼの除去)]
(1)余分な水分を取り除くためスライド上の切片周辺を注意深く拭く。
*(2)切片が完全に覆われるようにブロッキング試薬Ⅰ 2滴(100μL)を検体標本スライド、試薬対照スライド、検体対照(陽性コントロール、陰性コントロール)スライドに滴下し、湿潤箱中で常温(15－25℃)、5分間反応させる。
(3) PBSでよくすすぐ(3分間ずつ容器を1度かえるか、または洗浄ビンを使用する)。

[操作方法(染色手順)]
[第一抗体の添加・反応]
①余分な水分を取り除くためスライド上の切片周辺を注意深く拭く。
*②切片が完全に覆われるように第一抗体 2滴(100μL)を検体標本スライド、陽性コントロールスライド、陰性コントロールスライドに滴下し、試薬対照スライドには、第一抗体のかわりに陰性コントロール2滴(100μL)を滴下する。
③湿潤箱中で常温(15－25℃)、30分間反応させる。
④PBSでよくすすぐ(5分間ずつ容器を2度かえるか、または洗浄ビンを使用する)。

[酵素・第二抗体標識ポリマー(ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGポリクローナル抗体(Fab') (動物種：ヤギ))の添加・反応]
①余分な水分を取り除くためスライド上の切片周辺を注意深く拭く。
②切片が完全に覆われるように酵素・第二抗体標識ポリマー 2滴(100μL)を全てのスライドに滴下する。
③湿潤箱中で常温(15－25℃)、30分間反応させる。
④PBSでよくすすぐ(5分間ずつ容器を2度かえるか、または洗浄ビンを使用する)。

[基質溶液の添加・反応]
①余分な水分を取り除くためスライド上の切片周辺を注意深く拭く。
②切片が完全に覆われるように前もって調製した基質溶液2滴(100μL)を全てのスライドに滴下する。
③湿潤箱中で常温(15－25℃)、10分間反応させる。
④流水洗する。

[対比染色]
(1)対比染色試薬にスライドを浸す。
(2)流水洗する。

[封入]
(1)水洗、脱水、キシレンによる透徹後、非水溶性封入剤で封入する。

【測定結果の判定法】

1．判定方法
光学顕微鏡によって陽性反応を観察する。検体組織中にプロゲステロンレセプター(PgR)が存在する場合、腫瘍細胞の核が茶褐色を呈する。染色強度の結果判定は、腫瘍細胞の核における染色のみを対象とし、細胞質は判定の対象外である。
(1)陽性所見を示す検体対照スライドを選択し、プロゲステロンレセプター(PgR)染色像を確認する。
(2)良性腫瘍および正常乳腺上皮は検索対象から除外する。
(3)まず、光学顕微鏡の4倍対物レンズを使用して、検体組織内の癌細胞のプロゲステロンレセプター(PgR)陽性染色像、陽性染色の強度、陽性細胞率を観察する。
(4)次に対物レンズを10倍に切り替え、陽性所見が核か細胞質に局在するかを検索する。細胞質のみに陽性所見が見られるものは陰性と判定する。
(5)ほとんどの検体組織において、対物レンズ10倍で核に局在する陽性像が確認できるが、陽性像が確認できない場合はさらに対物レンズ20倍で検索する。

■検体対照スライド、試薬対照スライドの染色性

＊(1)陽性コントロールスライド

腫瘍細胞にプロゲステロンレセプター(PgR)の発現がある判定結果を認める。

＊(2)陰性コントロールスライド

腫瘍細胞にプロゲステロンレセプター(PgR)の発現がない判定結果を認める。

このスライドが腫瘍細胞にプロゲステロンレセプター(PgR)の発現ありの判定結果を認めた場合、非特異的なタンパク結合による非特異的反応が考えられる。

(3)試薬対照スライド

腫瘍細胞にプロゲステロンレセプター(PgR)の発現がない判定結果を認める。このスライドが腫瘍細胞にプロゲステロンレセプター(PgR)の発現ありの判定結果を認めた場合、非特異的なタンパク結合による非特異的反応が考えられる。

２．判定基準

染色パターン	判定	PgR の発現
検体組織中の腫瘍細胞の中でプロゲステロンレセプター(PgR)陽性を呈している細胞がない、または 10%に満たないもの。	陰性	なし
検体組織中の腫瘍細胞の中でプロゲステロンレセプター(PgR)陽性を呈している細胞が 10%以上あるもの。	陽性	あり

以上の判定基準により、陰性判定はプロゲステロンレセプター(PgR)の発現なし、陽性判定はプロゲステロンレセプター(PgR)の発現があるものとする。

■判定不可

各対照スライドの腫瘍細胞におけるプロゲステロンレセプター(PgR)の発現を調べたとき、以下の結果を得た場合は、検鏡を停止し、判定をしないこと。

現象	原因
*(1)陽性コントロールスライド上に陽性結果を認めない場合	*・陽性コントロールスライドが不適切であった。 ・染色操作に誤りがあった。
*(2)陰性コントロールスライド上に陽性結果を認めた場合	*・陰性コントロールスライドが不適切であった。 ・染色操作に誤りがあった。
(3)試薬対照スライド上に陽性結果を認めた場合	組織に対し、何らかの非特異反応があると考えられるので、本検体については、判定をしないこと。

■再測定

(1)明瞭な染色を得るには、包埋剤を完全に除去することが大切である。パラフィンの残存物は、バックグラウンド染色を強める原因となる。パラフィンを完全に除去して染色すること。

(2)薄切後 6 週間以上経過した組織切片を用いた場合、切片中の抗原が劣化して、偽陰性の染色結果を示す場合がある。薄切後 6 週間以内の組織切片を用いて染色すること。

３．判定上の留意事項

(1)検出結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果等とあわせて、担当医師が総合的に判断すること。

(2)必ず各検体対照スライドの染色結果と比較して、染色結果を判定すること。

1)細胞質

細胞質に陽性染色が確認されることがある。染色強度の判定は腫瘍細胞の核の陽性染色程度により判定すること。

2)その他

一般的にタンパク質や基質反応生成物の非免疫的結合や赤血球による偽ペルオキシダーゼ反応やサイトクローム C による内因性のペルオキシダーゼ反応によっても、偽陽性結果が観察される場合がある。

＊3)検体組織の壊死部分

抗体が非特異的に結合し易く、非特異染色の原因となり易いので、陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。

＊4)筋肉組織

筋肉組織の一部に弱い染色が現れることがあるため、必ず陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。

(3)術前に投与する抗癌剤等の薬物の内、本品との交差反応性が知られているものはないが、本品との相互作用は調べていないので、抗癌剤等の薬物治療を実施している場合は、十分注意して判定すること。

(4)本品は、乳腺における反応特異性は調べられているが、それ以外の組織では、反応性が知られていないので、乳腺以外の組織に使用する場合は、同じスライド上の正常組織及び腫瘍組織と対比して、判定すること。

【性能】

用法・用量の操作方法に基づいて感度試験、正確性試験及び同時再現性試験を行った場合、下記の規格に適合する。

(1)感度試験

第一抗体または、第一抗体を PBS で 2 倍希釈して管理用組織スライドを染色するとき、明らかな特異染色像（茶褐色）が観察される。

(2)正確性試験

第一抗体を用いて管理用組織スライドを染色するとき、明らかな特異染色像(茶褐色)が観察され、第一抗体の代わりに陰性コントロールを用いて同様に染色するときは、特異染色像は観察されない。

(3)同時再現性試験

管理用組織スライド 3 枚を染色するとき、いずれのスライドにおいても明らかな特異染色像(茶褐色)が観察される。

管理用組織スライドは、あらかじめプロゲステロンレセプター(PgR)の発現があることを確認している乳癌組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を貼付したスライドである。

○相関性

プロゲステロンレセプター(PgR)の検出に関して、乳癌患者検体における本品と既承認品の染色性を比較した結果を下記に示す。

プロゲステロンレセプター（PgR）発現の有無による相関性

既承認品目１

		陽性	陰性	Total
本品	陽性	51	1	52
	陰性	0	51	51
	Total	51	52	103

陽性一致率:　100.0%（ 51検体/ 51検体）
陰性一致率:　 98.1%（ 51検体/ 52検体）
全体一致率:　 99.0%（102検体/103検体）

既承認品目２

		陽性	陰性	Total
本品	陽性	50	4	54
	陰性	0	55	55
	Total	50	59	109

陽性一致率:　100.0%（ 50検体/ 50検体）
陰性一致率:　 93.2%（ 55検体/ 59検体）
全体一致率:　 96.3%（105検体/109検体）

本品と既承認品目の間に良好な相関性が得られた。

**【使用上又は取扱い上の注意】

**１．取扱い上（危険防止）の注意

(1) ヒト由来の検体は、取り扱い者に感染を引き起こす危険性がある。従って、適切な取り扱いを必要とする。

(2) 検体組織には、HIV、HBV など、感染のおそれがあるので、取り扱いには十分注意すること。

(3) 構成試薬および付属品の試薬が皮膚などへ接触することを避けること。

(4) 発色基質である 3,3'-ジアミノベンジジン・4HCl は変異原性が認められているので、取り扱いに際しては十分注意すること。

**(5) ブロッキング試薬 I と発色試薬には過酸化水素水が含まれているので、取り扱いに際しては十分注意すること。

２．使用上の注意

(1) 試薬は 2－8℃で保存すること。

(2) すべての試薬は常温(15 - 25℃)に戻して使用すること。

(3) 有効期間の過ぎた試薬は使用しないこと。

(4) 他製品の試薬を混ぜて使用しないこと。

(5) 染色中は、いかなる過程でも切片を乾燥させない。試薬との反応中、切片を湿潤箱に入れておくと乾燥を防ぐことができる。

(6) 抗原は熱に弱いので、組織を包埋する際、パラフィンの温度を 58℃以上に上げない。

(7) 脱パラフィンに用いるキシレンおよびエタノールは、スライドを 40 枚処理するごとに取り替える。

(8) 構成試薬の一部は、個別に補充できる。

3．廃棄上の注意

**(1) キット中の第一抗体、陰性コントロール、濃縮抗原賦活化液にはアジ化ナトリウムが含まれている。アジ化ナトリウムは水道管に含まれる銅、鉛の反応によって爆発の危険性があるので、これらの試薬を排水管より処分した後には多量の水を流すこと。

(2) 検体組織に接触した器具・試薬および試薬容器等は感染の危険性があるので、オートクレーブで 120℃、20 分間滅菌処理するか、または 1.0V/V%次亜塩素酸などの消毒液に浸して一晩処理すること。

トラブル解決法

本キットの操作で遭遇する可能性のある問題点を以下に示す。

問題点	考えられる原因	その対策
○陽性コントロールスライドおよび標本スライドの染色が認められない、あるいは弱い。	① 切片が乾燥している。	・切片を湿潤させた後は、湿潤箱などを用いて乾燥させない。
	② 包埋剤が不適当あるいはパラフィン包埋組織からのパラフィン除去が不完全である。	・適当な包埋剤を選択する。また、包埋組織から、パラフィンを完全に除去する。 ・キシレン、エタノール溶液を取り替える。
	*③ 抗原賦活化処理が不十分。	*・抗原賦活化液の温度が 95-99℃になっていることを温度計を使って正確に確認してからインキュベートする。 *・反応時間を正確に 40 分間にする。
	*④ 抗体反応が不十分。	*・各ステップでの水分の拭き取りを完全にする。 *・抗体との反応時間を十分にする。添付書のインキュベーション時間を守る。
	*⑤ 基質溶液の反応が不十分。	*・基質溶液を調製してから 1 日以上経過している場合には、基質溶液を再調製し、調製当日中に使用する。
	*⑥ 強度が弱い原因が不明。**	*・精製水 1 mL に対して、発色基質 2 滴（約 40μL）、基質緩衝液 2 滴（約 40μL）、発色試薬 1 滴（約 40μL）の基質溶液を調製し、使用する。
○全ての染色スライドのバックグラウンドが強く染色される。	① 内因性ペルオキシダーゼを不活性化するための処理が不十分。	・付属のブロッキング試薬 I を使用し、処理を確実に行う。
	② 自己消化の結果、組織液に遊離した抗原が過剰に存在する。	・できるだけ新鮮な組織を包埋する。
	③ 不完全なパラフィン除去。	・キシレン、エタノール溶液を取り替える。
	④ 不十分な抗体の洗浄。	・抗体の洗浄を十分に行う。
	⑤ 室内温度が高すぎて、酵素反応が早すぎる。	・常温(15－25℃)にコントロールする。
○反応中に組織切片がスライドからはがれてしまう。	*① 熱による抗原賦活化処理反応を必要とするため、はがれ易くなる。	*・poly-L-lysine、シランなどの組織切片用接着剤を使用する。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法：2 - 8℃で保存
有効期間：製造後 12 ヶ月

【包装単位】

製品名	コード	包装単位
抗プロゲステロンレセプターモノクローナル抗体(A9621A)(動物種：マウス)	423511	20テスト

**【主要文献】

1) al Saati T, et al. Production of monoclonal antibodies to human estrogen-receptor protein (ER) using recombinant ER (RER). Int J Cancer. 1993 Oct 21;55(4):651-4.
2) Kumar V, et al. Functional domains of the human estrogen receptor. Cell. 1987 Dec 24;51(6):941-51.
3) Leong AS-Y et al. Comparison of antibodies to estrogen and progesterone receptors and the influence of microwave-antigen retrieval. Appl Immunohistochem. 1993;1:282-8
4) Mauri FA, et al. ER1D5 and H222 (ER-ICA) antibodies to human estrogen receptor protein in breast carcinomas: results of a multicentric comparative study. Appl Immunohistochem. 1994;2:157-63.
5) Sannino P, et al. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. J Clin Pathol. 1994 Jan;47(1):90-2.

【問合せ先、製造販売元、販売元】

株式会社ニチレイバイオサイエンス

〒104-8402　東京都中央区築地 6-19-20
TEL：03-3248-2208　　FAX：03-3248-2243