

**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。

** 2024 年 11 月改訂(第 8 版)

* 2022 年 3 月改訂(第 7 版)



体外診断用医薬品

ALK 融合タンパクキット

ヒストファイン ALK iAEP® キット

ヒストステイナー用

承認番号: 22600AMX00667000

【全般的な注意】

1. 本キット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. 電子化された添付文書の記載から逸脱した使用方法および使用目的については保証しない。
- **3. 検査をする際には、本品の使用目的欄に示されている薬剤の最新の電子化された添付文書（【効能・効果】およびく効能・効果に関連する使用上の注意>欄等）を参照すること。
4. 十分な経験を有する病理医又は検査施設で検査を実施すること。
5. ヒト由来の検体は、感染の危険があるものとして取扱いに注意すること。
- **6. 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	
		ヒストステイナー用	コントロールスライド
		Code : 727071 40 テスト	Code : 427081 5 スライド
①	ALK 抗原賦活化液 A 液 (10 倍濃縮)	150mL×2 本	—
②	ALK 抗原賦活化液 B 液 (10 倍濃縮)	150mL×2 本	—
③	ブロッキング試薬 **過酸化水素水	8mL×2 本	—
④	第一抗体 **抗ALKモノクローナル抗体 (5A4) (動物種: マウス)	8mL×1 本	—
⑤	陰性コントロール マウス IgG	8mL×1 本	—
⑥	ブリッジ試薬 **抗マウス IgG ポリクローナル 抗体(動物種: ウサギ)	8mL×2 本	—
⑦	ペルオキシダーゼ標識 エンパワー試薬 **ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体(Fab') (動物種: ヤギ)	8mL×2 本	—
⑧	発色基質 **3,3'-ジアミノベンジジン・4HCl	4mL×1 本	—
⑨	基質緩衝液	4mL×1 本	—
⑩	発色試薬 過酸化水素水	4mL×1 本	—
⑪	ALK コントロールスライド 陽性コントロール細胞と 陰性コントロール細胞を含有	—	5 枚
付属品			
①	PBS(粉末) リン酸緩衝塩・洗浄用	—	—
②	PBS (×10) リン酸緩衝液・洗浄用	1L×1 本	—
③	基質溶液用ボトル	2 本	—

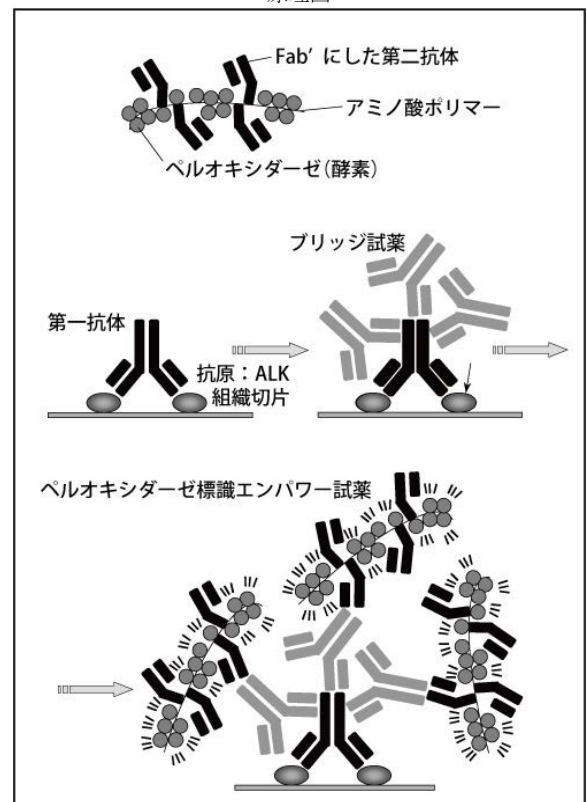
【使用目的】

*がん組織、細胞中に発現する ALK 融合タンパクの検出
(アレクチニブ塩酸塩、クリゾチニブ、セリチニブ、ブリグチニブ
又はロルラチニブの非小細胞肺癌患者への適応を判定するための
補助に用いる)

【測定原理】

本キットは、組織、細胞に対する免疫組織染色法を用いて腫瘍細胞中の ALK 融合タンパクを検出することを目的としている。最初に、腫瘍細胞中の ALK タンパクに対する特異的な第一抗体^{注1)}を反応させ、次に、ブリッジ試薬^{注2)}を反応させる。更に、アミノ酸ポリマーに酵素と抗体を結合させたペルオキシダーゼ標識エンパワー試薬^{注3)}を反応させる。その結果、抗原・第一抗体・ブリッジ試薬・ペルオキシダーゼ標識エンパワー試薬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。本キットは、ALK タンパクのキナーゼドメインに反応するため、ALK 融合タンパクのみならず全長 ALK タンパクにも反応する^{注2)}。しかしながら、全長 ALK タンパクの発現は正常細胞では神経系の細胞にしか見られず、神経系以外の腫瘍における発現はきわめてまれである（肺がんにおいては 1%以下）。また、全長 ALK タンパクが発現している場合、一部の腫瘍細胞のみが陽性となり陰性細胞と混在することから、ALK 融合タンパクのスコアリングおよび判定方法により ALK 融合タンパクを発現する腫瘍の選別が可能である。

原理図



注 1 : 第一抗体: 抗 ALK モノクローナル抗体(5A4)(動物種: マウス)

注 2 : ブリッジ試薬: 抗マウス IgG ポリクローナル抗体(動物種: ウサギ)

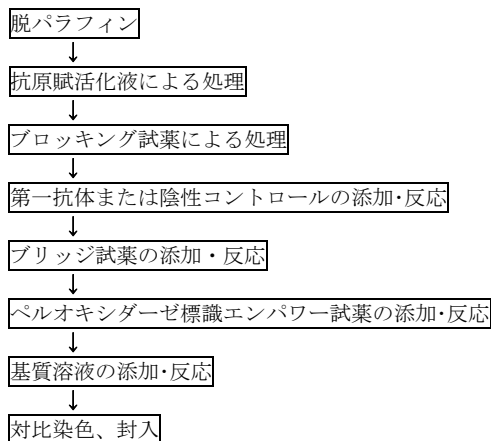
注 3 : ペルオキシダーゼ標識エンパワー試薬: ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体(Fab') (動物種: ヤギ)

【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。
- 包埋の際には使用するパラフィンの融解温度を大きく超えないように注意すること。
- 薄切後 9 週間以上経過した組織切片を用いて染色した場合、切片中の抗原が劣化して、偽陰性の染色結果を示す可能性がある。薄切後 9 週間以内に使用すること。

【用法・用量(操作方法)】

○フローチャート



○検体の準備

非小細胞肺癌を含む組織を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded: FFPE) ブロックを作製する。非小細胞肺癌患者から採取した非小細胞肺癌を含む小さな組織 (約 1cm×1cm×0.5cm) は、採取後すぐに固定する。すぐに固定できない場合は生理食塩水で湿らせたガーゼで包んで冷蔵庫等で保管し、24 時間以内に、下表に従い、固定を行う。

固定液	固定時間
10%(緩衝)ホルマリン	6 ~ 48 時間
20%ホルマリン	

固定後、水洗い、エタノールにて脱水、キシレンに浸して脱アルコール後、パラフィン浸透をしてパラフィン包埋ブロックを作製する。

○切片および標本の準備

【パラフィン包埋切片】

切片を 4 μm に薄切し、poly-L-lysine またはシラン等の切片用接着剤をコーティングした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、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(マウス IgG)を使用して染色操作を行う。

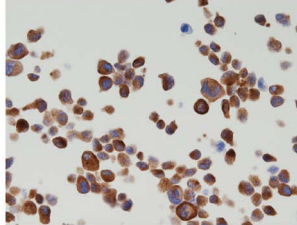
【検体対照スライドの準備】

ALK コントロールスライド [ホルマリン固定パラフィン包埋細胞株 (セルブロック) 2 種類 (NCI-H2228 及び SK-BR-3) を貼付したスライド] を検体対照スライドとして用いるか、あるいは ALK 融合タンパクの陽性対照スライド (スコア 3 相当) と ALK 融合タンパクの陰性対照スライド (スコア 0 相当) を準備する。

- 陽性対照スライド (スコア 3 相当)**
検体標本スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ ALK 融合タンパクの発現を確認している組織、細胞スライドを準備する。
- 陰性対照スライド (スコア 0 相当)**
検体標本スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ ALK 融合タンパクの発現がないことを確認している組織、細胞スライドを準備する。

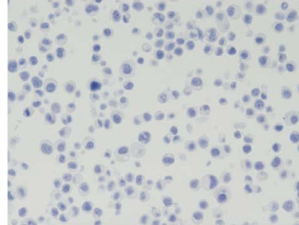
染色例

ALK陽性コントロール細胞



細胞の細胞質に強い陽性反応を示す。

ALK陰性コントロール細胞



すべての細胞に陽性反応を示さない。

以上の検体対照スライドを用意し、検体標本スライドおよ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】

- 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)
- 乾燥器
- 染色ドーゼ
- 耐熱性染色ドーゼ (95~99℃の温浴に使用できるもの)
- 温浴槽 (95~99℃で加温できるもの)
- 温度計
- キシレン
- 95%エタノール
- 100%エタノール
- 洗浄用容器または洗浄ビン
- 精製水
- 試験管
- スライドスタンド
- 湿潤箱
- カバーガラス
- 対比染色試薬 (ヘマトキシリンなどの細胞核を染色する試薬)
- 封入剤
- 吸水紙
- 光学顕微鏡
- 軍手
- 使い捨てゴム手袋
- 自動染色装置ヒストステイナーシステム (ヒストステイナー36A (届出番号 13B3X10013036000) 又はヒストステイナー48A (届出番号 13B3X10013048000))
- 溶媒耐性スライドバーコードラベル (ヒストステイナー用) (Code : LV-6011JP)

【構成試薬の調製方法】

(1) ALK 抗原賦活化液の調製方法

ALK 抗原賦活化液 A 液 : ALK 抗原賦活化液 B 液 : 精製水 = 1 : 1 : 8 になるようにそれぞれはかり、十分混和後、静かに耐熱性染色ドーゼに移す。使用時に必要量調製し、使用後は廃棄すること。1 回使用した溶液は繰り返し使用しないこと。

(2) 基質溶液の調製方法

発色基質、基質緩衝液、発色試薬を用いて、基質溶液を調製する。発色基質 1 滴 (約 50 μL) と基質緩衝液 1 滴 (約 50 μL) を精製水 1mL に加え、よく混合する。発色試薬 1 滴 (約 50 μL) を加え、再び混合する。静かに基質溶液用ボトルに移す。

注) ヒストステイナー用基質溶液の保存に関する注意事項

- 基質溶液は調製後、当日中に使用することを推奨する。
- 調製後の基質溶液をやむを得ず、翌日以降に使用する場合には、冷暗所 (2~8℃) にて保存し、調製日から 10 日を過ぎた場合は使用しないこと。
- 調製後の基質溶液は、調製翌日より茶色の沈殿物が発生することがある。ボトル内に沈殿物が見られた場合、そのまま使用するとヒストステイナーのノズルを詰まらせる原因となるので、使用時に、ピペットなどを用いてこの沈殿物が混ざらないよう静かに上澄液を別の基質溶液用ボトルへ移し、試薬ラック (ヒストステイナー用) にセットする。陽性対照スライド等を用いて、染色性を確認する。

【付属品の調製方法】

(1) バッファーの調製方法

PBS (×10) を精製水で 10 倍希釈し、バッファーとする。調製後のバッファーは 2~30℃で保存し、1 週間を超えたバッファーは使用せず廃棄すること。

注) PBS (×10) は、2~8℃にて長期間保管した場合、溶液中に PBS の結晶が析出する場合がある。結晶が析出している場合は、常温 (15~25℃) に戻して PBS の結晶を溶かしてから使用すること。

その他の試薬は、そのまま用いる。

【脱パラフィン】

明瞭な染色所見を得るには、包埋剤を完全に除去することが大切である。パラフィンが残存すると、バックグラウンド染色の原因となるため、パラフィンを完全に除去すること。

1. キシレン処理

- スライドをキシレンに 3 分間浸す。
- 余分な液を振り払い、別のキシレンに 3 分間浸す。
- 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

- (1)余分な液を振り払い、PBS で洗浄する(洗浄用容器を 2 度かえ 3 分間の洗浄操作を 3 回繰り返すか、または洗浄ピンを使用する)。

【操作方法(染色手順)】

①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、軍手等を用いて高温に気をつける。
(2)調製したALK抗原賦活化液を耐熱性の抗原賦活化用染色ドーズに入れ、抗原賦活化液の温度が95～99℃になるまで温浴槽で温める。過剰な水分蒸発を防ぐためドーズ及び温浴槽にはゆるくふたをしておく。(完全に密閉すると抗原賦活化用染色ドーズ及び温浴槽を破損することがある。)
(3)スライドを温めたALK抗原賦活化液に浸漬させ、ゆるくふたをする。
(4) ALK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ズ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℃)に20分間放置し、ゆっくり熱を冷ます。
(6)スライドをALK抗原賦活化液から取り出し、PBSで洗浄する(洗浄用容器を2度かえ3分間の洗浄操作を3回繰り返すか、または洗浄ピンを使用する)。

②免疫染色

自動染色装置を用いて染色を行う場合、ヒストステイナー36A（届出番号 13B3X10013036000）又はヒストステイナー48A（届出番号 13B3X10013048000）を用いる。
詳細な設定方法は、各装置のマニュアルにしたがって行う。

** ヒストステイナーの操作法に従って下記染色方法のプログラムを設定し、ヒストステイナーの操作法に従って染色を開始する。
注）（ ）内の名称はヒストステイナープログラム内の「プロトコル要素」設定の際の名称である。

- | | |
|--|-------|
| (1) ブロッキング試薬(End.Enz.Block) | 5 分間 |
| (2) バッファー(Rinse Buffer) | 1 回 |
| (3) 第一抗体(Primary Antibody)又は陰性コントロール
検体標本スライド、検体対照(陽性対照、陰性対照)スライドには第一抗体、試薬対照スライドには陰性コントロールを反応させる。 | 30 分間 |
| (4) バッファー(Rinse Buffer) | 2 回 |
| (5) ブリッジ試薬(Secondary Reagent) | 15 分間 |
| (6) バッファー(Rinse Buffer) | 2 回 |
| (7) ペルオキシダーゼ標識エンパワー試薬
(Labelled Polymer) | 30 分間 |
| (8) バッファー(Rinse Buffer) | 2 回 |
| (9) 基質溶液(Substrate) | 10 分間 |
| (10) バッファー(Rinse Buffer) | 1 回 |
| (11) 精製水(Rinse Water) | 1 回 |

注) 洗浄ピンにバッファーを入れておき、全てのスライドをセット後、染色開始までの間に切片が乾燥しないように、組織が覆われるようにバッファーをかけておく。バッファーをかけた後、30 分以上放置する場合は、30 分おきにバッファーを組織が覆われるようにかけること。

** 【試薬バーコードラベル】

試薬バーコードラベルを使用する場合は、自動染色装置ヒストステイナーのプログラムにバーコードラベル情報を入力する必要がある。本製品が未登録の場合は、下記データを入力(漢字のみ全角、他半角入力)し、登録すること。

専用ボトルに貼付されているバーコードラベル内の情報

登録するカテゴリ	End.Enz. Block	登録するカテゴリ	Secondary Reagent
試薬名	ALK キット ブロッキング 試薬	試薬名	ALK キット ブリッジ 試薬
試薬略称(10文字)	ALKuk H202	試薬略称(10文字)	ALKuk Brid
バーコード	ALKuk H202	バーコード	ALKuk Brid
時間(分)	5	時間(分)	15

登録するカテゴリ	Primary Antibody	登録するカテゴリ	Labelled Polymer
試薬名	ALK キット 抗 ALK モノクローナル抗体(5A4)	試薬名	ALK キット ペルオキシダーゼ 標識エンパワー試薬
試薬略称(10文字)	ALKuk MM	試薬略称(10文字)	ALKuk POD
バーコード	ALKuk MM	バーコード	ALKuk POD
時間(分)	30	時間(分)	30

登録するカテゴリ	Primary Antibody	登録するカテゴリ	Substrate
試薬名	ALK キット 陰性コントロール	試薬名	ALK キット DAB 基質溶液
試薬略称(10文字)	ALKuk NEG	試薬略称(10文字)	ALKuk DAB
バーコード	ALKuk NEG	バーコード	ALKuk DAB
時間(分)	30	時間(分)	10

- (1)ブロッキング試薬、第一抗体、陰性コントロール（マウス IgG）、ブリッジ試薬、ペルオキシダーゼ標識エンパワー試薬、基質溶液、バッファー、精製水をセットする。
(2)切片が完全に覆われるような試薬量として、ブロッキング試薬、第一抗体、陰性コントロール、ブリッジ試薬、ペルオキシダーゼ標識エンパワー試薬、基質溶液の試薬量を 200 μ L に設定する。組織切片が大きい場合は、約 1cm×1cm あたり 100 μ L を基準に 300-600 μ L を設定値として指定することを推奨する。
(3)検体標本スライド、試薬対照スライド及び ALK コントロールスライド又は検体対照スライド(陽性対照スライド、陰性対照スライド)をセットする。
(4)ブロッキング試薬を全てのスライドに添加し、常温（15～25℃）で 5 分間反応させる。
(5)バッファーで洗浄する。
(6)第一抗体を試薬対照スライド以外の全てのスライドに添加し、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（マウス IgG）を添加する。常温（15～25℃）で 30 分間反応させる。
(7)バッファーで洗浄する。
(8)ブリッジ試薬を各スライドに添加し、常温(15～25℃)で 15 分間反応させる。
(9)バッファーで洗浄する。
(10)ペルオキシダーゼ標識エンパワー試薬を全てのスライドに添加し、常温（15～25℃）で 30 分間反応させる。
(11)バッファーで洗浄する。
(12)基質溶液を全てのスライドに添加し、常温（15～25℃）で 10 分間反応させる。
(13)バッファーで洗浄する。
(14)精製水で洗浄する。

【免疫染色の終了】

- (1)すべてのスライドをスライドラック（ヒストステイナー用）から取り出し、精製水で洗浄する。
(2)セットした試薬を試薬ラック(ヒストステイナー用)から取り出し、基質溶液以外の試薬は 2～8℃で保存する。
(3)基質溶液用ボトルに残った基質溶液は廃棄し、ボトル内を精製水で洗浄した後、完全に乾かして再利用する。
注) 基質溶液をやむを得ず翌日以降に使用する場合には、2 ページの【構成試薬の調製方法】 基質溶液の調製方法の注を参照すること。

【対比染色】

- (1)対比染色試薬（ヘマトキシリンなどの細胞核を染色する試薬）にスライドを1～5分間浸漬する。
(2)流水洗す。

【封入】

脱水、キシレンによる透徹後、非水溶性封入剤で封入し、カバーガラスをかける。

【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。検体組織中の腫瘍細胞の細胞質が茶褐色を呈するとき、これを陽性所見とする。
(1)陽性対照スライドを選択し、陽性所見の特異染色像を確認する。
(2)良性腫瘍および正常組織は検索対象から除外する。
(3)光学顕微鏡の4倍対物レンズを使用して、検体組織内の腫瘍細胞の陽性所見を観察する。
(4)対物レンズを10倍に切り替え、陽性所見が細胞質に局在するかを検索する。細胞質に陽性所見が見られる場合、陽性と判定する。
(5)ほとんどの検体組織において、10倍対物レンズで細胞質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を20倍に切り替えて検索する。

【試薬対照スライドの染色性】

腫瘍細胞に陽性反応がないことを確認する。このスライドが腫瘍細胞に陽性反応を認めた場合、非特異的なタンパク結合などによる非特異的反応が考えられる。

【ALK コントロールスライド又は検体対照スライド(陽性対照スライド、陰性対照スライド)の染色性】

- ・陽性対照スライド（スコア 3 相当）

**あらかじめ、ALK 融合タンパク陽性が確認されている腫瘍細胞に陽性反応を認めることを確認するとともに電子化された添付文書に記載された染色例を参考にして染色強度に遜色がないことを確認する。

- ・陰性対照スライド（スコア 0 相当）

あらかじめ、ALK 融合タンパク陰性が確認されている腫瘍細胞に陽性反応が認められないことを確認する。本スライドに染色性を認めた場合は何らかの非特異的反応が考えられる。

2. ALK 融合タンパクのスコアリングおよび判定方法^{2) 3)}

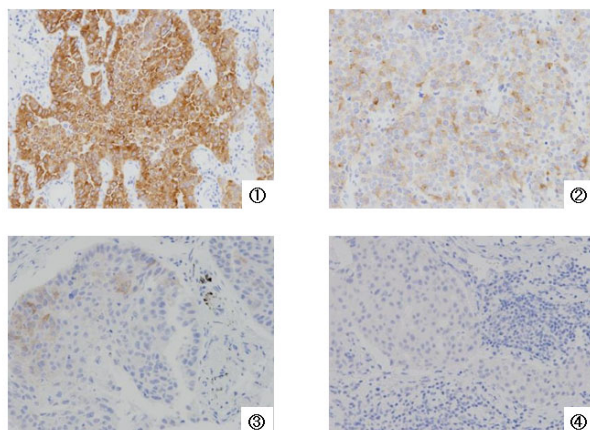
スコア	適合条件	判定
3	陽性腫瘍細胞率>80%	陽性
2	80%≧陽性腫瘍細胞率>50%	境界域
1	50%≧陽性腫瘍細胞率>0%	境界域
0	陽性腫瘍細胞なし	陰性

判定上の注意²⁾より改変

- (1) 試薬対照スライドと比較して染色強度が強い細胞を陽性細胞とする。
- (2) 印環細胞など高度に粘液を含有する細胞は染色されるべき細胞質の領域が少なく、ALK 融合タンパク陽性であっても染色されにくい。陽性細胞が見られる検体で、高度粘液含有細胞が陰性である場合、それらは陽性腫瘍細胞率の算定には加えない。
- (3) 陽性腫瘍細胞率が 80%を超えていても、checker board pattern^{注)}（陰性～弱陽性細胞と陽性～強陽性細胞が頻りに隣り合っている染色像。陰性細胞と陽性細胞が頻りに隣り合っている染色像）はスコア 2 とする。

注) checker board pattern は、AF-001JP 試験では確認できなかった。
以下の染色例を参考にして、判定を行うこと。

染色例



本キットを用いた染色の写真(×200)
①: スコア3 ②: スコア2
③: スコア1 ④: スコア0

患者への適応判定上の留意事項

スコア 3: 明らかな腺癌以外の組織型の場合^{*}、既承認品の FISH 法による ALK 融合遺伝子の確認を行うこと。例えば、全長 ALK タンパク発現等の可能性も考えられる。

※HE 染色等により組織型の鑑別を行うこと。

スコア 2: 既承認品の FISH 法による ALK 融合遺伝子の確認を行うこと。例えば、ALK 融合遺伝子が陰性にもかかわらず一部もしくはすべての細胞が神経内分泌系への分化を呈している、又は、ALK 融合遺伝子が陽性にもかかわらず扁平上皮への分化を呈する部などで限局性に ALK 融合蛋白質量が低下している、などの可能性が考えられる。

スコア 1: 既承認品の FISH 法による ALK 融合遺伝子の確認を行うこと。例えば、ALK 融合遺伝子陰性の可能性が高いことが考えられる。

【判定不可】

各対照スライドの染色性を調べたとき、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) 陽性対照スライドに陽性所見が認められない場合	・陽性対照スライドが不適切であった。 ・染色操作に誤りがあった。
(2) 陰性対照スライド上に陽性所見を認めた場合	・陰性対照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所見を認めた場合	・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。

3. 判定上の留意事項

- * (1) 検出結果に基づく、アレクチニブ塩酸塩、クリゾチニブ、セリチニブ、ブリグチニブ、ロルラチニブの適応については、本キットと既承認品の FISH 法の結果とあわせて、担当医師が総合的に判断すること。
- (2) 神経系に分化した細胞を含む組織の一部に第一抗体による染色性が認められるので、それら組織を検体として使用する場合には、注意すること。
- (3) コロイド小胞、胃底腺、粘膜の一部に検出系試薬由来の弱い非特異染色が見られることがあるので、試薬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。
- (4) 以下のような場合には偽陽性反応が生じることが考えられるので、必ず検体対照スライド及び試薬対照スライドの染色結果と比較して十分に注意して判定すること。
 - ・一般的にタンパク質や基質反応生成物の非免疫的結合により、偽陽性反応が観察される場合がある。偽陽性反応は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 による内因性ペルオキシダーゼ反応によっても起きることがある。
 - ・検体組織の壊死部分は、抗体が非特異的に結合しやすく、非特異染色の原因となりやすい。
 - ・間質系のコラーゲンは固定後疎水性となって抗体と結合しやすくなり、また、陰性に帯電しているため陽性に帯電している抗体と結合しやすく、非特異染色の原因となりやすい。
 - ・顆粒球の一部およびマクロファージなどは細胞膜表面に Fc レセプターを有するため、抗体の Fc 部分と結合する可能性がある。抗体本来の特異的反応部位以外に染色が現れることがある。

【臨床的意義】

本キットは、免疫組織染色法(IHC 法)を用いて、ALK 融合タンパクの有無を検出し、既承認品の FISH 法と組み合わせることにより ALK 融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌患者における薬剤の適応判定を行う。

○アレクチニブ塩酸塩の適応判定

・臨床試験情報

アレクチニブ塩酸塩の国内第 I/II 相試験 (AF-001JP 試験) において、本キットが被験者候補の ALK 融合タンパク発現の有無の確認に用いられた。本キットで陽性(スコア 3)であった 125 例のうち、研究機関で設定された FISH 法で陽性と判定され、試験参加の同意が得られた 39 例が第 II 相部分に登録され、奏効率は 92.3%(95%CI: 79.1~98.4)であった。また、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法を用いて陽性と判定された患者を含めた 46 例の奏効率は、93.5%(95%CI: 82.1~98.6)であった。⁴⁾

AF-001JP 試験の被験者候補における本キットおよび研究機関で設定された FISH 法の結果の相関性

		研究機関で設定された FISH 法			
		陽性	陰性	判定不能	NT ^{*1)}
本 キ ッ ト	陽性(スコア 3)	122	1	2	0
	境界域(スコア 2)	0	0	0	0
	境界域(スコア 1)	0	3	0	0
	陰性(スコア 0) ^{*2)}	0	48	4	194
	判定不能	0	0	0	10

※¹⁾ NT: 検査実施せず、※²⁾ 別途同意が得られた被験者候補 52 例についてレトロスペクティブに FISH 法検査を実施

○クリゾチニブ、ブリグチニブの適応判定

【性能】の臨床性能試験により、本キットと既承認品の FISH 法との同等性が評価され、本キットを非小細胞肺癌患者におけるクリゾチニブ、ブリグチニブの適応判定に用いることの有用性が示された。

* ○セリチニブ、ロルラチニブの適応判定

【性能】の同等性試験により、本キットと既承認品の免疫組織染色法との同等性が評価され、本キットを非小細胞肺癌患者におけるセリチニブ、ロルラチニブの適応判定に用いることの有用性が示された。

【性能】

本キットの操作方法により、感度、正確性、同時再現性の各試験を行った場合、(1)から(3)の規格に適合する。

(1) 感度試験

第一抗体及び第一抗体を第一抗体希釈液^{注1)}にて 2 倍希釈したものをを用い、ALK 陽性肺癌組織スライド^{注2)}を染色するとき、明らかな特異染色像(茶褐色)が観察され、スコア 3 の結果を得る。
第一抗体及び第一抗体を第一抗体希釈液にて 2 倍希釈したものをを用い、スコア標本^{注3)}を染色するとき、各々標本のスコアに一致した結果を得る。

(2)正確性試験

第一抗体を用い、ALK 陽性肺癌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、スコア 3 の結果を得る。第一抗体の代わりに陰性コントロールを用いて染色するとき、特異染色像は観察されず、スコア 0 の結果を得る。また、第一抗体を用い、ALK 陰性肺癌組織スライド^{注2)}を染色するとき、特異染色像は観察されず、スコア 0 の結果を得る。第一抗体を用い、スコア標本を染色するとき、各々標本のスコアに一致した結果を得る。第一抗体の代わりに陰性コントロールを用いてスコア標本を染色するとき、各々スコア 0 の結果を得る。

(3)同時再現性試験

第一抗体を用い、ALK 陽性肺癌組織スライド 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、スコア 3 の結果を得る。第一抗体を用い、スコア標本各々 3 枚を染色するとき、いずれのスライドにおいても各々標本のスコアに一致した結果を得る。

注 1) 第一抗体希釈液: 0.5% ウシ血清アルブミン、0.1%アジ化ナトリウムを含む 10mM リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.2)

注 2) ALK 陽性肺癌組織スライド・ALK 陰性肺癌組織スライド
・ALK 陽性肺癌組織スライド: 腫瘍細胞中に *ALK* 融合遺伝子陽性細胞を 80%以上含むことが既承認品の FISH 法で確認されている組織標本で、近傍に正常組織を含む。
・ALK 陰性肺癌組織スライド: 腫瘍細胞中に *ALK* 融合遺伝子陽性細胞を含まないことが既承認品の FISH 法で確認されている組織標本で、近傍に正常組織を含む。

注 3) スコア標本

本キットで陽性腫瘍細胞率が80%超の状態のNCI-H2228培養細胞株(以下、ALK陽性培養細胞株)と陽性腫瘍細胞率が0%のSK-BR-3培養細胞株(以下、ALK陰性培養細胞株)を用いて作製する4種の標本(スコア3標本、スコア2標本、スコア1標本、スコア0標本)。

・スコア3標本

ALK陽性培養細胞株からなり、陽性腫瘍細胞率は80%超(スコア3)を示す。ALKコントロールスライドの陽性コントロール細胞と同じものである。

・スコア2標本

ALK陽性培養細胞株とALK陰性培養細胞株の配合比率を4:1に混合した細胞集団からなり、陽性腫瘍細胞率は50%超80%以下(スコア2)を示す。

・スコア1標本

ALK陽性培養細胞株とALK陰性培養細胞株の配合比率を1:4に混合した細胞集団からなり、陽性腫瘍細胞率が0%超50%以下(スコア1)を示す。

・スコア0標本

ALK陰性培養細胞株の細胞からなり、陽性腫瘍細胞率は0%を示す。ALKコントロールスライドの陰性コントロール細胞と同じものである。

臨床性能試験⁵⁾

本キットの臨床性能を既承認品の FISH 法との比較によって検討した。国内 2 施設の肺がん患者検体、合計 244 検体(肺腺癌 199 例、肺腺癌以外 45 例)のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、既承認品の FISH 法と本キットの結果を比較した。その結果、陽性一致率は 98.0%、陰性一致率は 99.0%、全体一致率は 98.8%の一致率を示し、ALK 融合タンパクを検出する本キットが有用であることが示唆された。本キットの染色結果をスコア別に示す。

① 肺がん患者検体の FISH 法の結果別のスコア結果

既承認品

スコア	肺腺癌患者		肺腺癌患者以外の肺がん患者		合計
	FISH 法 陽性	FISH 法 陰性	FISH 法 陽性	FISH 法 陰性	
3	50 例	0 例	0 例	0 例	50 例
2	0 例	0 例	0 例	1 例	1 例
1	0 例	0 例	0 例	1 例	1 例
0	1 例	148 例	0 例	43 例	192 例
合計	51 例	148 例	0 例	45 例	244 例
疾患別合計	199 例		45 例		244 例

② 肺がん患者検体の本品の判定と FISH 法の一致率

既承認品

スコア	判定	肺がん患者		合計
		ALK 融合遺伝子陽性 FISH 法(+)	ALK 融合遺伝子陰性 FISH 法(-)	
3	ALK 融合タンパク陽性	50 例	0 例	50 例
2	境界域	0 例	1 例	1 例
1	境界域	0 例	1 例	1 例
0	ALK 融合タンパク陰性	1 例*	191 例	192 例
合計		51 例	193 例	244 例

陽性一致率=98.0%(50 例/51 例)

陰性一致率=99.0%(191 例/193 例)

全体一致率=98.8%(241 例/244 例)

*切片上の腫瘍部(約 250mm²)の FISH 陽性細胞率は 5.0%だったが、一部の領域(約 0.15mm²)に局限して FISH 陽性細胞率が 44.0%であった症例で FISH 法陽性と分類された。

同源性試験

非小細胞肺癌患者の検体を対象として、本キットと既承認品の免疫組織染色法(IHC 法)により、それぞれ ALK 融合タンパクの判定を行い、その結果を比較した。本試験の結果、本キットと既承認品は良好な一致率を示し、同等の性能を有していることが示された。

本キットと既承認品(IHC 法)による判定結果の比較

既承認品(IHC 法)

スコア	判定	既承認品(IHC 法)		合計
		陽性	陰性	
3	ALK 融合タンパク陽性	48 例	0 例	48 例
2	境界域	0 例	0 例	0 例
1	境界域	0 例	0 例	0 例
0	ALK 融合タンパク陰性	0 例	100 例	100 例
合計		48 例	100 例	148 例

試験に供した 150 例のうち 2 例は、既承認品(IHC 法)で判定保留であったため、上記の表から除いた。当該 2 例は、本キットでスコア 3・陽性および FISH 法で陽性と判定された。

本キットと既承認品(IHC 法)による判定の一致率

	一致率	両側 90%信頼区間
陽性	100% (48 例/48 例)	93.9-100
陰性	100% (100 例/100 例)	97.0-100
全体	100% (148 例/148 例)	98.0-100

【使用上または取扱い上の注意】

1.取扱い上(危険防止)の注意

- (1)検体は、取扱者に感染を引き起こす危険性がある。従って、適切な取扱いを必要とする。
- (2)検体組織には、HIV、HBV など、感染のおそれがあるので、取扱いには十分注意すること。
- (3)検査にあたっては、感染の危険を避けるため、使い捨て手袋等を着用すること。
- (4)試薬が皮膚などへ接触することを避けること。
- (5)ALK 抗原賦活化液 A 液、第一抗体、陰性コントロール、ブリッジ試薬にはアジ化ナトリウムが含まれているので、取扱いには十分注意すること。
- (6)発色基質および調製後の基質溶液に含まれる 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、取扱いには十分注意すること。
- (7)ブロッキング試薬と発色試薬には過酸化水素水が含まれているので、取扱いには十分注意すること。

2.使用上の注意

- (1)PBS(×10)は2~30℃で保存し、その他の試薬は2~8℃で保存すること。
- (2)使用前に常温(15~25℃)に戻して使用すること。
- (3)使用期限の過ぎた試薬は使用しないこと。
- (4)異なるロットの試薬や他製品の試薬を混ぜたり、組み合わせて使用しないこと。
- (5)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。
- (6)染色開始前は、いかなる過程でも切片を乾燥させないようにすること。
なお、バッファーを洗浄ビンに入れておき、スライドラック(ヒストステイナー用)にセットした後すぐに、組織が覆われるようにバッファーをかけておく。その後 30 分以上放置する場合は、30 分おきにバッファーを、洗浄ビンを用いて組織が覆われるようにかけること。
- (7)脱パラフィンおよび封入過程で、キシレンがスライドバーコードラベルに接しないように注意する。キシレンがラベルに接すると、印字が消えやすくなる。もしラベルがキシレンで濡れたり、キシレンを取り扱った手袋で触れた場合、完全に乾燥するまでラベルに触れないようにスライドを扱うこと。

3.廃棄上の注意

- **①キット中の ALK 抗原賦活化液 A 液、第一抗体、陰性コントロール、ブリッジ試薬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は多量の水を流すこと。
- (2)調製した基質溶液には 3,3'-ジアミノベンジジンが含まれている。廃棄する際は、各施設のルールに従い、適切に処理すること。
- (3)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、滅菌処理や消毒を行った後、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理すること。
- (4)試薬が飛散した場合は、アルコールスプレーなどを用いてふき取りと消毒を行うこと。

【トラブルシューティング】

問題点	考えられる原因	その対策
○検体標本スライドにおいて腫瘍細胞すべてでは無く一部にのみ染色が見られる。	①全長 ALK タンパクを発現する症例* *:肺大細胞癌、肺内分枝癌や肺小細胞癌の他、横紋筋肉腫(とくに胞巣型)等	①FISH 法による ALK 融合遺伝子の確認を行う。
○陽性対照スライド、陽性コントロール細胞および検体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。 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。 ③抗原賦活化処理が不十分。 ④抗体反応が不十分。 ⑤基質溶液の反応が不十分。	①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。 ②キシレン、エタノール溶液を取り替える。 ③抗原賦活化温度が 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。 ③反応時間を正確に 40 分間にする。 ④指定された各試薬のインキュベーション時間を正確に設定する。 **④電子化された添付文書のインキュベーション時間を守る。 ⑤基質溶液を再調製する。
○すべ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。 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。 ③不完全なパラフィン除去。 ④不十分な抗体の洗浄。 ⑤室内温度が高すぎて、酵素反応が早すぎる。 ⑥切片が乾燥している。	①ブロッキング試薬による処理を確実に行う。 ①処理不足である場合は処理時間を延長する。 ②可能ならば新鮮な組織を包埋する。 ③キシレン、エタノール溶液を取り替える。 ④バッファー(Rinse Buffer)洗浄の回数を増やす。 ⑤常温(15～25℃)にコントロールする。 ⑥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。
○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を必要とするため、はがれ易くなる。	①0.02%poly-L-lysine、シランなどの切片用接着剤を使用する。

【貯蔵方法・有効期間】

- 本キット：2～8℃保存
(構成試薬の詳細は P1【形状・構造等 (キットの構成)】参照のこと)
- 有効期間：製造後 15 ヶ月

【包装単位】

製品区分 ヒストステイナー用

製品名	コード	包装単位
ヒストファイナ ALK iAEP® キット	727071	40テスト

製品区分 コントロールスライド

製品名	コード	包装単位
ヒストファイナ ALK iAEP® キット ALKコントロールスライド	427081	5スライド
2種類の細胞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 ・陽性コントロール細胞(細胞株：NCI-H2228) 80%超の細胞で、細胞質に強い茶褐色の染色を認める。 ・陰性コントロール細胞(細胞株：SK-BR-3) すべての細胞の細胞質に染色が認められない。		

【主要文献】

- 1) Takeuchi K. Interpretation of anti-ALK immunohistochemistry results. J Thorac Oncol. 2013 Jul;8(7):e67-8.
- **2) 竹内賢吾. ALK. 臨床検査. 2013;57(3):271-6.
- 3) Takamochi K, et al. A rational diagnostic algorithm for the identification of ALK rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of surgically treated Japanese patients. PLoS One. 2013 Aug 1;8(8):e69794.
- 4) Seto T, et al. CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. Lancet Oncol. 2013 Jun;14(7):590-8.
- **5) 笠松敏幸. ALK 陽性肺癌の特徴およびヒストファイナ ALK iAEP® キットによるスクリーニング. MEDICAL TECHNOLOGY. 2015;43(4):385-89.

【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