

2024年 12月

PRODUCT INFORMATION



HISTOFINE 免疫組織化学染色試薬

体外診断用医薬品

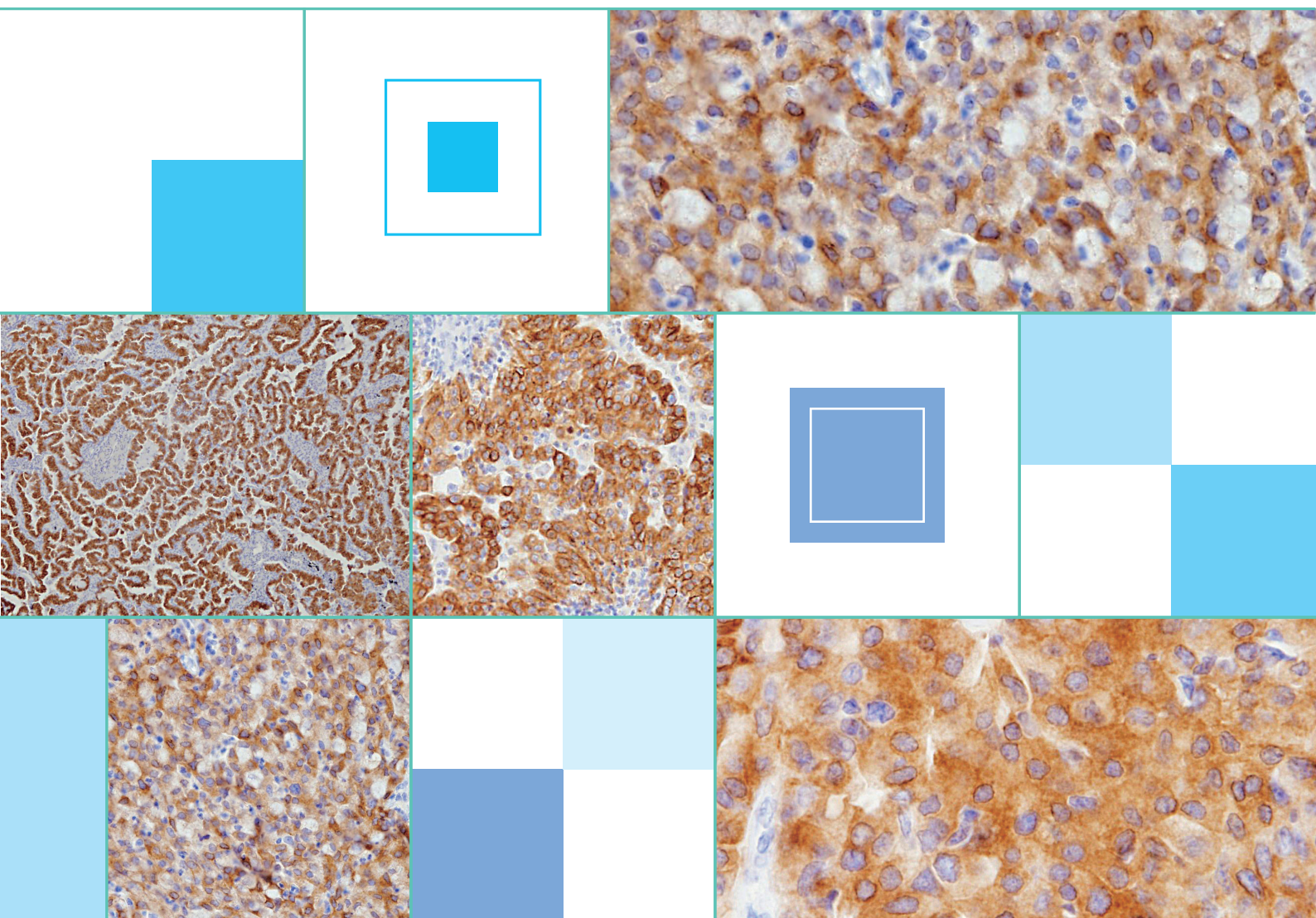
製造販売承認番号：22600AMX00667000

パラフィン  
包埋切片用

# ALK

ALK 融合タンパクキット

## ヒストファインALK iAEP<sup>®</sup> キット



NICHIREI BIOSCIENCES INC.

# ALK 融合タンパクキット ヒストファイン ALK iAEP® キット

製造販売承認番号：22600AMX00667000

## ○ 製品一覧

品名	製品区分	コード	包装	価格(円)
<b>医薬品</b> ヒストファイン ALK iAEP® キット	用手法用	427071	20テスト	375,000
<b>医薬品</b> ALKコントロールスライド	コントロールスライド	427081	5スライド	35,000

**医薬品**：体外診断用医薬品

## ○ 構成

### ○ ヒストファイン ALK iAEP® キット

構成試薬	成分	製品区分	
		用手法用 Code:427071 20テスト	コントロールスライド Code:427081 5スライド
① ALK抗原賦活化液 A液	(10倍濃縮)	150mL×1本	——
② ALK抗原賦活化液 B液	(10倍濃縮)	150mL×1本	——
③ ブロッキング試薬	過酸化水素水	4mL×1本	——
④ 第一抗体	抗ALKモノクローナル抗体(5A4) (動物種:マウス)	2mL×1本	——
⑤ 陰性コントロール	マウスIgG	2mL×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)	4mL×1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)	4mL×1本	——
⑧ 発色基質	3,3'-ジアミノベンジジン・4HCl	0.5mL×1本	——
⑨ 基質緩衝液		0.5mL×1本	——
⑩ 発色試薬	過酸化水素水	0.5mL×1本	——
⑪ 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2種類を貼付したスライド ・陽性コントロール細胞株 NCI-H2228 ALK 融合タンパク発現量 スコア 3 相当 ・陰性コントロール細胞株 SK-BR-3 ALK 融合タンパク発現量 スコア 0 相当 / スライド	——	5枚
<b>付 属 品</b>			
PBS (粉末)	リン酸緩衝塩・洗浄用	191g×1本	——

## ○ 染色に適した検体

### ● 検体の準備

検体には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）したブロックを使用してください。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、採取後すぐに固定してください。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、固定を行ってください。

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	

#### 【操作上の注意】

1. 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してください。
2. 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してください。

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してください。

### ● 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てください。37℃の乾燥器内で 24 時間乾燥させてください。

注：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ります。薄切後 9 週間以内に使用してください。

#### [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 枚準備してください。

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ってください。

#### [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）を準備してください。

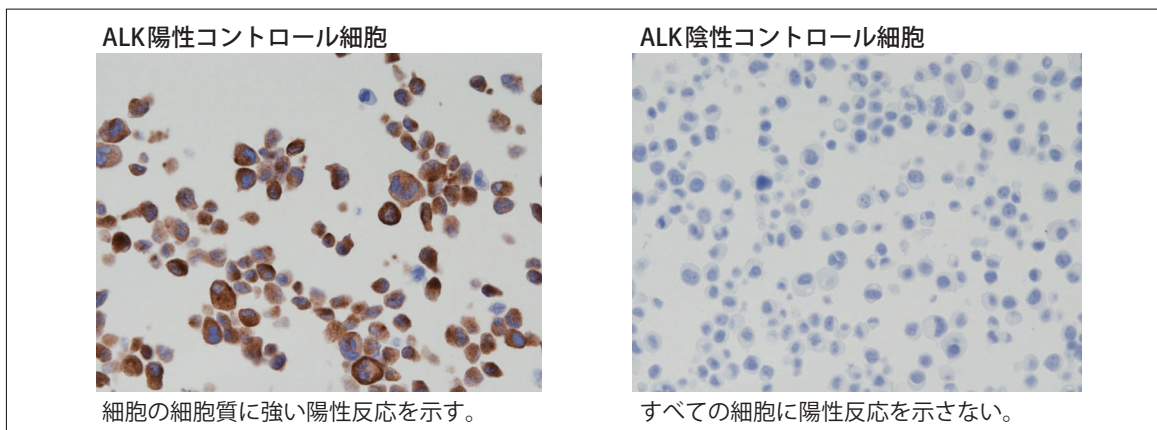
#### ・陽性対照スライド（スコア 3 相当）

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してください。

#### ・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してください。

### ● 染色例

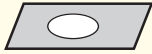


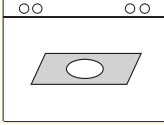
以上の検体対照スライドを用意し、検体標本スライドおよび試薬対照スライドと並行して、検体の準備から染色処理、検鏡までの全工程を行ってください。

## ○ 操作手順

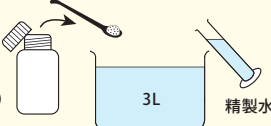
- \*各ステップでの反応温度、反応時間は厳密に守ること。
- \*特に温度指定のない場合は、常温(15~25℃)で操作すること。
- \*染色結果に影響を及ぼす為、必ず下記の操作手順に従って操作を行うこと。

### ● 検体準備

 50℃で十分に湯伸ばした切片(4μm厚)をシランなどのコーティングスライド上に貼り付ける。

 切片を恒温器で十分乾燥させる。(37℃、24時間)

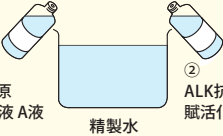
### ● PBS (洗浄用) の準備

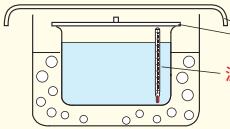
 PBS (粉末) 28.65g  
3L  
精製水  
PBS (洗浄用)  
PBS (粉末) 28.65gを精製水で3L(9.55g/L)にメスアップする。

1回洗浄で140mL使用した場合、全工程で約2.5L必要。

### ● ALK抗原賦活化液の調製・準備

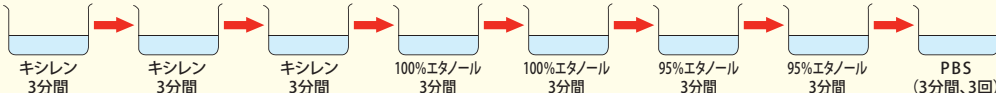
注：高温に気をつけ、軍手等用いる。

 ① ALK抗原賦活化液 A液  
精製水  
② ALK抗原賦活化液 B液  
A液：B液：精製水=1：1：8になるように必要量をそれぞれはかり、希釈する。

 調製したALK抗原賦活化液を抗原賦活化用染色ドーズに入れ、ふたをする。さらにふたをした温浴槽にて抗原賦活化液を95-99℃に温める。

注：  
・95-99℃に温める為にはドーズ及び温浴槽にふたをすることが効果的である。  
・ふたは過剰な水分蒸発防止にも役立つが、完全に密閉するとドーズ及び温浴槽を破損することがあるのでゆるくふたをすること。

### ● 脱パラフィン

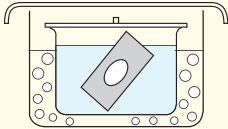
 キシレン 3分間 → キシレン 3分間 → キシレン 3分間 → 100%エタノール 3分間 → 100%エタノール 3分間 → 95%エタノール 3分間 → 95%エタノール 3分間 → PBS (3分間、3回)

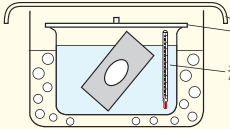
- \*各ステップごとによく液を切る。
- \*脱パラフィンを完全にするために、各溶液はスライド40枚ごとに取り換えることが好ましい。

### ● 抗原賦活化処理

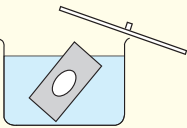
注：高温に気をつけ、軍手等用いる。

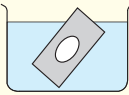
染色結果に大きな影響を及ぼす為、温度確認、時間等を正確に行う。

 95-99℃に温めたALK抗原賦活化液にスライドを浸漬させ、ゆるくふたをする。さらに抗原賦活化液の温度を高温に保つ為に温浴槽にゆるくふたをする。

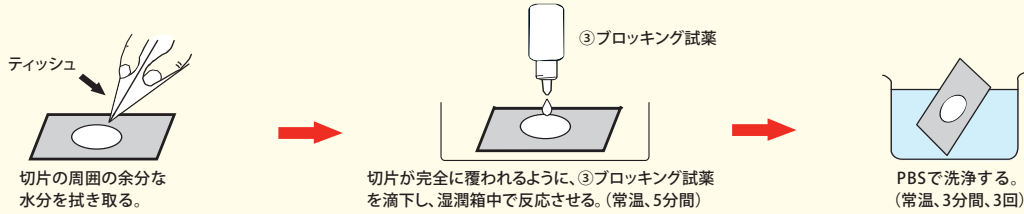
 抗原賦活化液の温度が95-99℃まで上昇したことを温度計等で確認してからインキュベートする。(95-99℃、40分間)

注：  
・95-99℃を保つ為にはドーズ及び温浴槽にふたをすることが効果的である。  
・ふたは過剰な水分蒸発防止にも役立つが、完全に密閉するとドーズ及び温浴槽を破損することがあるのでゆるくふたをすること。

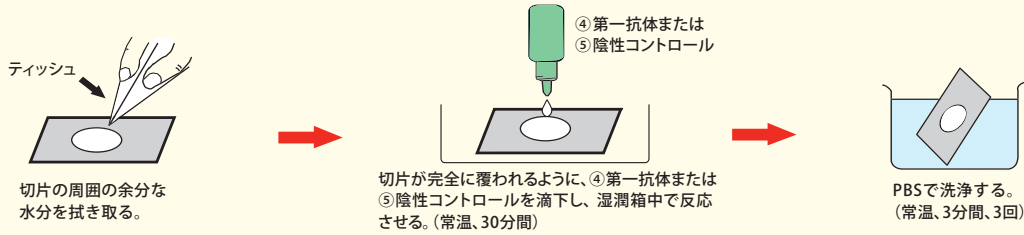
 抗原賦活化用染色ドーズを温浴槽から取り出し、ふたをはずす。スライドを浸したまま放置しゆっくり熱を冷ます。(常温、20分間)

 PBSで洗浄する。(常温、3分間、3回)

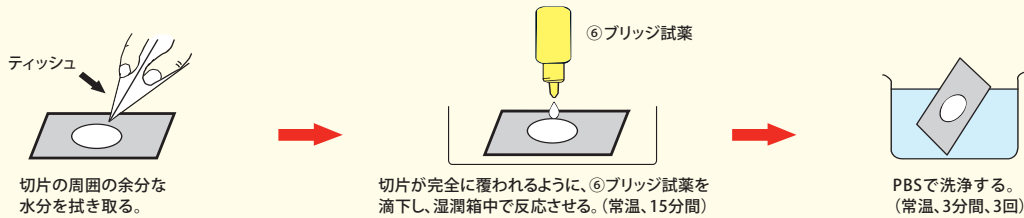
● **ブロッキング試薬による処理** (過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼ処理)



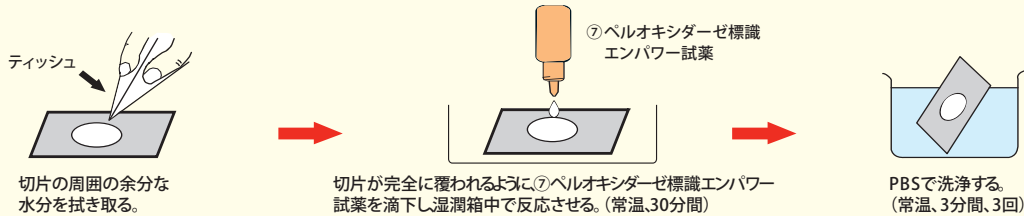
● **第一抗体 [抗ALKモノクローナル抗体 (5A4) (動物種: マウス)] または陰性コントロール [マウスIgG] の添加・反応**



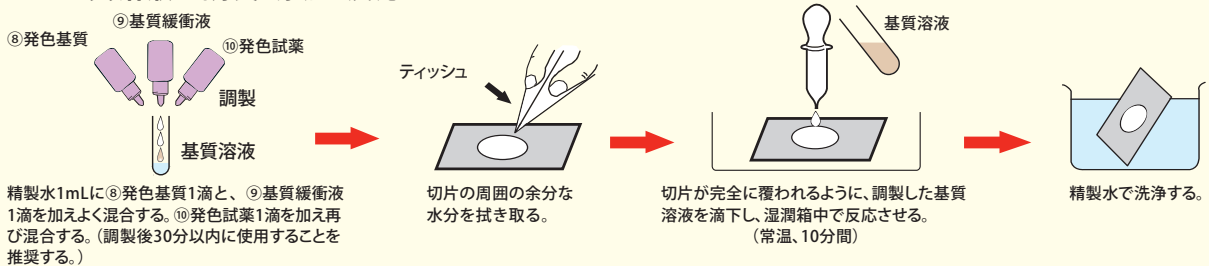
● **ブリッジ試薬の添加・反応**



● **ペルオキシダーゼ標識エンパワー試薬の添加・反応**



● **基質溶液の調製・添加・反応**



● **対比染色**

対比染色試薬 (ヘマトキシリン) にスライドを浸した後、流水洗する。

● **封入**

脱水、キシレンによる透徹後、非水溶性封入剤で封入する。

## ○ 判定基準

□ ヒストファイン ALK iAEP® キットによる ALK 融合タンパクのスコアリングおよび判定方法

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 \*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してください。
- (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ことがあります。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でください。
- (3) 陽性腫瘍細胞率が 80% を超えていても、checker board pattern (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 としてください。

### 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ってください。例えば、全長 ALK タンパク発現等の可能性も考えられます。

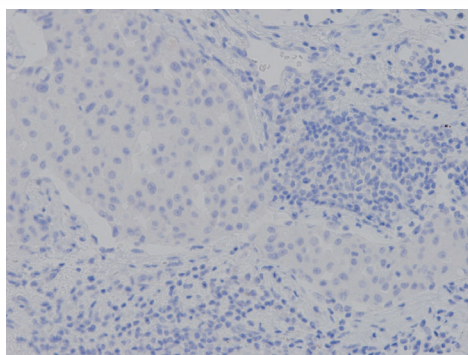
※ HE 染色等により組織型の鑑別を行ってください。

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ってください。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 融合蛋白量が低下している、などの可能性が考えられます。

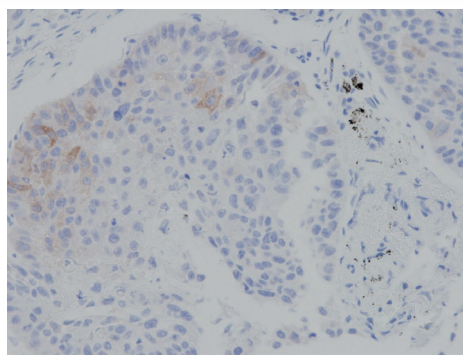
スコア 1: 既承認品の FISH 法による ALK 融合遺伝子の確認を行ってください。例えば、ALK 融合遺伝子陰性の可能性が高いことが考えられます。

\*: 竹内賢吾、ALK. 臨床検査 2013、57、271-6

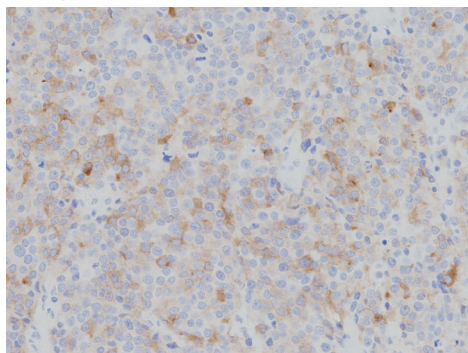
## ○ スコア判定例



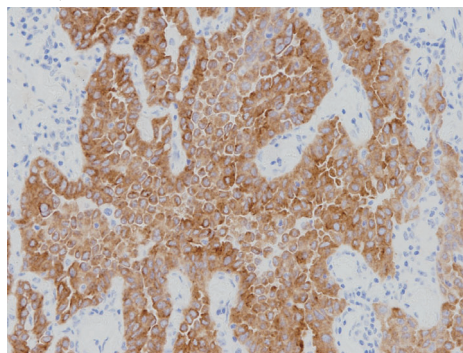
スコア 0



スコア 1



スコア 2



スコア 3

## ○ ヒストファイン ALK iAEP® キットの利用価値

ALK阻害剤の効能・効果は「ALK融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌」であるため、ALK阻害剤の適応可否を診断する上でALK融合遺伝子の診断は必要不可欠です。

ヒストファイン ALK iAEP® キットは、IHC法を用いて、ALK融合タンパクの有無を検出し、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（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）の適応判定を行うことができる体外診断用医薬品です。

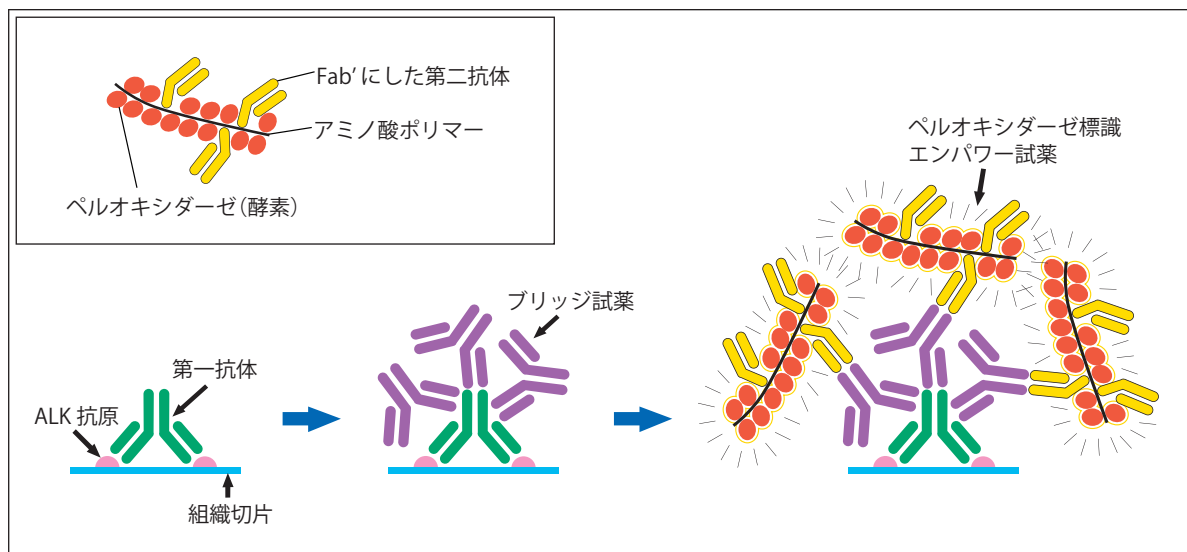
## ○ 使用目的と臨床的有用性

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)

## ○ 原理

ヒストファイン ALK iAEP® 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ます。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<sup>注1)</sup>を反応させ、次に、ブリッジ試薬<sup>注2)</sup>を反応させます。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<sup>注3)</sup>を反応させます。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ます。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します。



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)

## ○ 自動染色装置

自動染色装置を用いて染色を行う場合は下記の装置をご使用ください。

- ・ヒストステイナー 36A (届出番号13B3X10013036000)
- ・ヒストステイナー 48A (届出番号13B3X10013048000)
- ・ヒストステイナー AT (届出番号13B3X10013036100)

他の自動染色装置によるヒストファイン ALK iAEP® キットの使用は検証されておりません。

各装置用のヒストファイン ALK iAEP® キットにつきましては、弊社までご連絡ください。

ALK 融合タンパクキット  
ヒストファイン ALK iAEP® キット

製造販売元 **株式会社ニチレイバイオサイエンス**

本社 〒104-8402 東京都中央区築地6-19-20

お問い合わせ先 TEL.03(3248)2208 FAX.03(3248)2243

ホームページ <https://nichireibiosciences.co.jp/>

2024.12(第5版)