（肺癌．2018;58:189-195）
© 2018 The Japan Lung Cancer Society

INVITED REVIEW ARTICLE

PD-L1 病理検査の現状と課題

石井源一郎[1]

Current Status and Issues of PD-L1 Testing in Non-small Cell Lung Cancer

Genichiro Ishii[1]

[1]*Division of Pathology, Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center (EPOC), National Cancer Center, Japan.*

ABSTRACT —— Unlike anti-cancer drugs and molecular-targeted drugs that directly act on cancer cells, immune checkpoint inhibitors (anti-PD-1/PD-L1 antibodies) exert their effects by modifying the immune microenvironment of cancer. Several antibodies are currently in advanced clinical trials or have gained regulatory approval; however, different companion diagnostic agents have been developed for each drug. PD-L1 immunostaining (PD-L1 IHC) is a biomarker assay for anti-PD-1/PD-L1 antibodies, but the detailed diagnostic criteria are poorly recognized. Furthermore, new problems associated with the actual PD-L1 IHC judgment have been highlighted. Even if a standard operating procedure document is prepared, the above problems will probably not be resolved. In this paper, we will describe and discuss the current state, issues and future countermeasures associated with PD-L1 IHC.

(*JJLC.* 2018;58:189-195)

KEY WORDS —— Immune checkpoint inhibitor, Programmed cell death protein 1 (PD-1), Programmed death-ligand 1 (PD-L1), Tumor proportion score (TPS), Immunohistochemistry (IHC)

Corresponding author: Genichiro Ishii.

要旨 —— がん細胞に直接作用する抗がん剤，分子標的薬とは異なり，免疫チェックポイント阻害薬（抗 PD-1/PD-L1 抗体薬）は，がんの免疫微小環境を改変することにより効果を期待する全く新しい作用機序の治療薬である．現在，免疫チェックポイント阻害薬として複数の薬剤が使用されているが，それぞれの薬剤に対して異なるコンパニオン診断薬の開発が進んでいる上，異なる診断基準が示されている．PD-L1 免疫染色（PD-L1 IHC）は，抗 PD-1/PD-L1 抗体薬の効果を規定する要素のひとつではあるが，その詳細な診断/判定基準に関してはあまり周知されていない．さらには，実際の PD-L1 IHC 判定に関する新たな問題点も指摘されている．標準作業手順書のみが整備されても，おそらくは上記問題点は改善されないであろう．今後，PD-L1 IHC を臨床検査として安定的に定着させるためには，こうした問題点を整理し，早急に対応する必要がある．本稿では，PD-L1 IHC の現状，問題点，今後の対応策を述べる．

索引用語 —— 免疫チェックポイント阻害薬，PD-1，PD-L1，TPS，免疫染色（IHC）

1）腫瘍微小環境における免疫抑制機構

がん細胞は，複数の免疫監視機構から回避することにより，生存増殖を可能としている．現在までに知られている回避機構としては，1）TGF-β，IL-10 などの免疫抑制因子を分泌する，2）がん抗原や MHC 分子の発現を減少させることにより，がん細胞自らの免疫原性を低下させる，3）制御性 T 細胞，骨髄由来免疫抑制細胞などの T 細胞活性化を抑制する細胞を腫瘍内に動員する，4）がん細胞上あるいはマクロファージや樹状細胞などの免疫細胞上に，PD-L1 などの免疫抑制シグナルに関わる分子の発現を誘導する，などが知られている．[1-3] 上記の中で，4）

[1]国立がん研究センター先端医療開発センター臨床腫瘍病理分野．

論文責任者：石井源一郎．

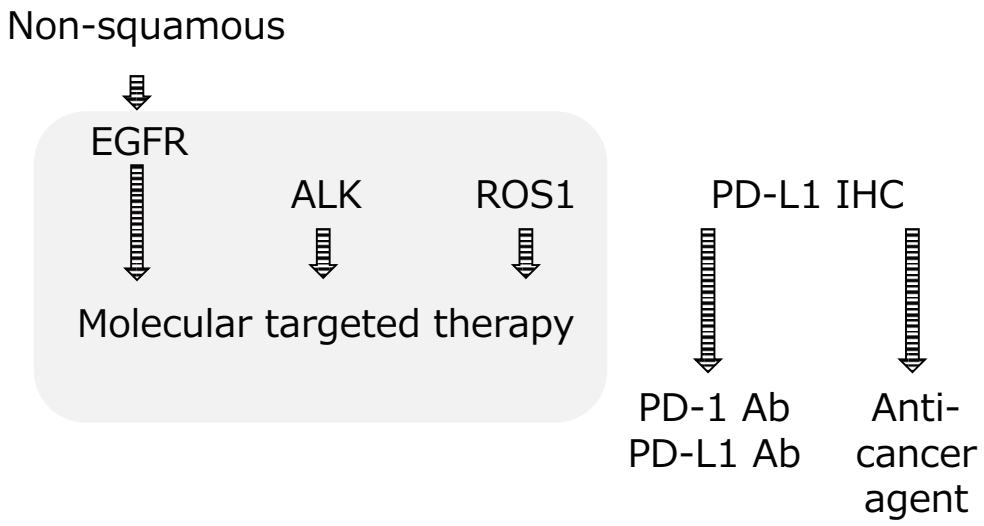

Figure 1. Clinical practice guidelines for advanced-stage non-small cell lung cancer.

に関わる分子，すなわち CTLA-4，PD-1 などの共抑制分子を介して伝わる共抑制シグナルに関わる分子を，免疫チェックポイント分子と呼ぶ.[4] 腫瘍内に浸潤した細胞障害性 T 細胞（CTL）は共抑制分子を発現するため，がん細胞あるいは免疫担当細胞が PD-L1（PD-1 のリガンド）を発現している場合，PD-1/PD-L1 経路によって CTL の殺細胞効果を抑制する.[5] このようにして，がん組織内では 1）～4）にて記した免疫抑制細胞や免疫抑制因子などにより抗腫瘍免疫応答が抑制されている状態と考えられている．免疫チェックポイント阻害薬は，上記 4）の作用を抑えることにより，抗腫瘍免疫の再活性化を誘導し，がん細胞の生存・増殖を低下させる．

2）非小細胞性肺がん診療における PD-L1 免疫染色（PD-L1 IHC）の位置づけ

PD-L1 IHC 運用の現状を知るためにはまず，進行期非小細胞肺がんの診療におけるバイオマーカーのフローチャートを理解しておく必要があるであろう．Figure 1 に，バイオマーカーのフローチャートの概略を示す．腺がんなどの非扁平上皮がん症例では，まずは EGFR 遺伝子変異をバイオマーカーとして検査する．EGFR 遺伝子変異が陰性の場合，ALK 融合遺伝子，ROS1 融合遺伝子の検査を行う．これらと同時に PD-L1 IHC を実施し，通常化学療法あるいは免疫チェックポイント阻害薬（抗 PD-1 抗体，抗 PD-L1 抗体）使用の指標とする．このように免疫チェックポイント阻害薬に対するバイオマーカーとして，PD-L1 IHC が広く運用されている．通常，EGFR，ALK などの遺伝子異常を認めない症例において，PD-L1 IHC の結果が，その後の治療方針を左右する．

3）PD-L1 IHC に用いられる抗体

免疫チェックポイント阻害薬は全く新しい作用機序の治療薬であり，現在，複数種類の薬剤が開発されている．免疫チェックポイント阻害薬使用のバイオマーカーとして，抗 PD-L1 抗体を用いた IHC は，現在一部がコンパニオン診断薬（当該医薬品の使用に不可欠な体外診断用医薬品）として認可されている．Table 1 に，PD-L1 染色に用いられている各種抗体を記す．しかし問題点も多数指摘されている．1 例として，それぞれの薬剤に対して異なるコンパニオン診断薬の開発が進んでいる上，異なる診断基準が示されている点が挙げられる．実際，陽性腫瘍細胞のカットオフ値は，使用する抗体により 1%，25%，50% と様々である．また，がん細胞のみならず免疫細胞の評価を必要とする抗体もあり（SP142 クローン），病理医は，PD-L1 IHC に用いる各種抗体およびその判定基準について知っておく必要がある．

4）PD-L1 IHC の注意点

患者治療に直接影響するため，各施設で行う IHC においては，pre-analytical phase（検体の採取法，固定，切り出し，標本の薄切），analytical phase（一連の IHC 染色），post-analytical phase（病理医による診断）について厳格な精度管理が求められている． PD-L1 IHC においても，通常の IHC 同様，一般的な免疫組織化学的検索に適した標本管理を行わねばならない．

A）Pre-analytical phase における注意点

検体の採取部位としては原発巣，転移巣からの検体ともに使用可能とされている．しかしながら，体腔液セルブロック検体や脱灰処理した骨生検組織は推奨されてい

Table 1. PD-L1 Antibodies

Drug	Nivolumab	Pembrolizumab	Atezolizumab	Durvalumab	Avelumab
Company	BMS	MERCK	ROCHE	AstraZeneca	Pfizer
Clone	Dako 28-8	Dako 22C3	Ventana SP142	Ventana SP263	Dako 73-10
IHC platform	Link 48	Link 48	BenchMark ULTRA	BenchMark ULTRA	Link 48
Cells to be evaluated	Tumor cells	Tumor cells	Tumor cells Immune cells	Tumor cells	Tumor cells
Staining criteria	≥1% ≥5% ≥10%	≥50% ≥1%	TC≥50% or IC≥10%	≥25%	≥1%

Table 2. Appropriate Samples for PD-L1 IHC (Summary)

Fixation	Neutralized formalin
Samples	Surgical sample, biopsy sample (Cytology samples and decalcified metastatic bone samples are not acceptable)
Location	Primary and metastatic sites
Number of tumor cells required	≥100
Others	Sometimes the evaluation of stromal cells is needed

ない．体腔液セルブロック標本は，中皮細胞やマクロファージとがん細胞との鑑別がしばしば問題となり，正確な評価ができない可能性があるからである（特にマクロファージはPD-L1陽性になることが多い）．骨転移巣など，脱灰処理操作を必要とする標本作製過程においては，脱灰液により染色性に影響が生じる可能性が指摘されている．

標本の固定は，10%中性緩衝ホルマリンを用い，6〜48時間後に包埋処理を行うことが推奨されている．また，標本薄切後は早急に染色を行う必要がある．

B）Analytical phaseにおける注意点

各抗体により，IHC autostainer（自動染色装置）が指定されている点に留意が必要である（Table 1，免疫染色プラットフォーム）．指定機器以外の機器で染色された標本に関しては，染色結果の信頼性を保証できない，とされている．

非常に稀ではあるが，autostainerを用いても，ある一定の頻度で染色性に不具合が生じることがある．疑陰性診断を防ぐためにも，陽性コントロールスライドの準備は必須である．

C）Post-analytical phase

標本を診断する際，PD-L1発現は同一腫瘍内において不均一なことがあり，また腫瘍の進行，治療などにより，ダイナミックに変化することが知られている．病理医が実際の評価を行うにあたり，これらの情報は知っておく必要がある．

小さな生検標本では，存在するがん細胞の数が著しく少ない場合がある．PD-L1 IHCの場合，100個以上の腫瘍細胞数が必要とされている．したがって，まずHE標本にて十分な腫瘍細胞が含まれているかどうかを確認しなければならない．注意点に関しては，Table 2にまとめた．

5）PD-L1 IHCの評価の実際

A）腫瘍細胞の評価

染色の評価には，陽性率（Tumor Proportion Score；TPS）を用いる．この場合，分母は全腫瘍細胞数，分子が陽性腫瘍細胞数，となる．陽性細胞の判定に関しては，腫瘍細胞の膜に陽性所見を認めるもののみを「陽性」とする．染色性の強度は問題にならない（淡い染色でも，膜に反応産物を認めれば陽性と判断する）．細胞質/核の陽性所見は，陽性とならない．以下，具体的なTPSを示す．

Figure 2A（TPS＝1%未満）；腫瘍細胞に陽性所見を認めない．染色されているのは，非がん細胞（免疫担当細胞）である．腫瘍細胞と免疫担当細胞との鑑別には，陽性細胞のサイズが有用である（腫瘍細胞のほうが大きい）．

Figure 2B（TPS＝10〜24%）；大型の細胞（腫瘍細胞）に陽性所見を認める．染色性が弱くても陽性と判定するが，細胞質あるいは核に染色されていても陽性細胞とは判定しない（矢頭）．

Figure 2C（TPS＝50〜59%）；大型の細胞（腫瘍細胞）に陽性所見を認める．本症例では染色性が強い細胞，弱い細胞が混在している．周囲の小型の陽性細胞は免疫担当細胞である．矢印部分は免疫担当細胞の集簇巣と考える．全体としては，5割程度の腫瘍細胞が陽性と判定されたが，このようなケースは診断が難しく，病理医により判定が異なる可能性がある．

Figure 2D（TPS＝90%〜）；ほとんどすべての大型細胞（腫瘍細胞）に陽性所見を認める．

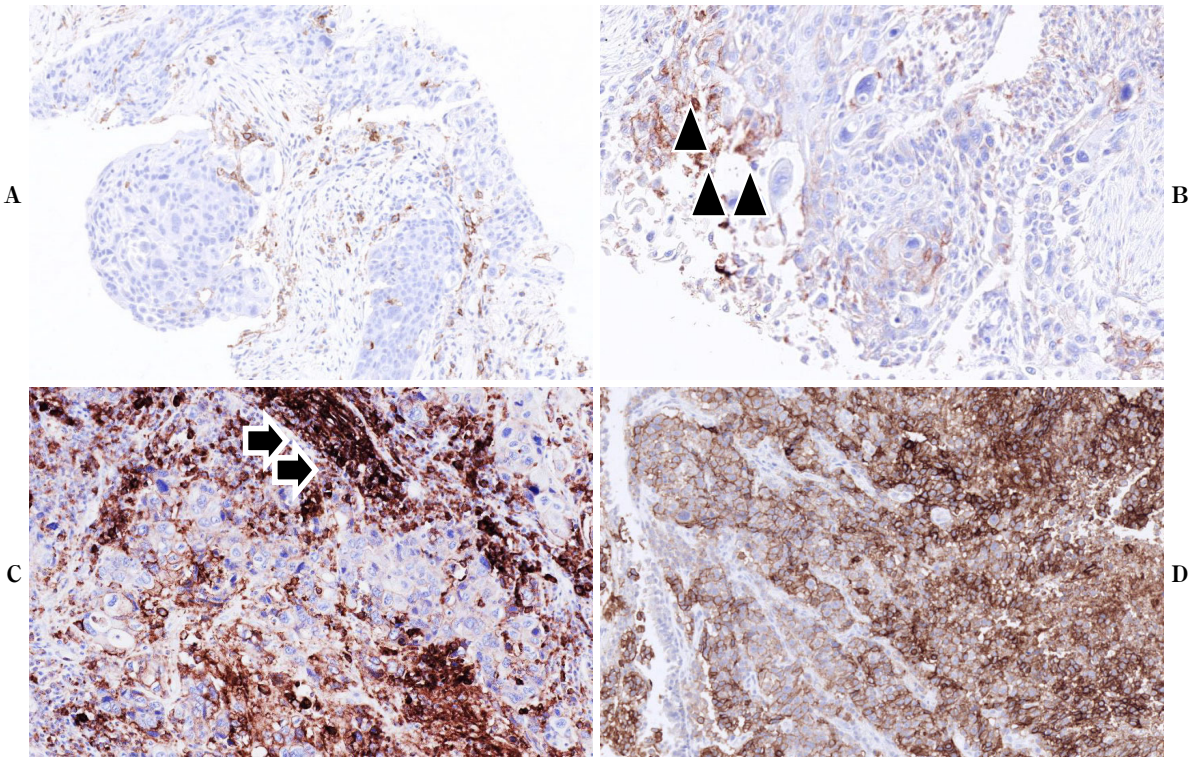

Figure 2. PD-L1 IHC testing (tumor cells). **A:** Case showing <1% TPS. **B:** Case showing 10-24% TPS. **C:** Case showing 50-59% TPS. **D:** Case showing ≥90% TPS.

以下に判定の際，注意すべき点を記す．

Figure 3A；弱拡大では，陽性所見ははっきりしない．しかし黒点四角部の拡大図（Figure 3B）では，腫瘍細胞の膜に淡い陽性所見を認める．PD-L1 免疫染色の判定には，陽性反応の濃淡は問わない．これらの腫瘍細胞は陽性細胞と判定する．

Figure 3C；肺胞マクロファージは，PD-L1 免疫染色に対して陽性を示す（染色の内部コントロールとしても使用される）．マクロファージと腫瘍細胞とを間違わないよう，再度 HE 染色を見直し，腫瘍細胞の同定が必要である．本症例の場合は，炭粉の貪食像を認めるため，マクロファージの同定は比較的容易である．

Figure 3D；しばしば，顆粒状に染色されるケースもあるが，その場合でも染色パターンが腫瘍細胞の周りを囲んでいるように見えれば陽性と判定する（矢頭）．

判定に関する留意点を Table 3 にまとめる．

手術検体などの標本が大きい場合，total 腫瘍細胞数の計測は極めて困難である（Figure 4A）．このような場合には，腫瘍の存在領域を分割して評価する．まず，腫瘍領域を適宜分割する（Figure 4B）．本ケースでは 16 領域に分割した．各領域の腫瘍細胞面積（黒線で囲った領域）をおおよそ算出し，それらを合計することにより，全腫瘍細胞数（実際は面積だが，近似値として使用）とする．次に各領域における陽性細胞数（黒で塗りつぶした領域）を算出，合計する．以上を全腫瘍細胞数で割ることにより TPS を算出する．しかし実際は，各領域においてそれぞれ陽性細胞比率を算出し，それらを平均するほうがより現実的な方法といえよう．

B）免疫担当細胞の評価

ある種の抗体（SP-142）では，免疫担当細胞（リンパ球，マクロファージ，樹状細胞など）の評価が必要とされている．

免疫細胞の評価においては，分母は全腫瘍面積である（腫瘍細胞の評価の時は，全腫瘍細胞数）．この場合の全腫瘍面積とは，腫瘍細胞成分，間質細胞成分を含む．評価の対象となる細胞は，腫瘍組織内に存在する免疫担当細胞，すなわちリンパ球，マクロファージ（tumor associated macrophage），樹状細胞などである．腫瘍外に存在するリンパ球，肺胞マクロファージなどは評価の対象にならない．特に，肺胞マクロファージは PD-L1 陽性を示すことが多く，陽性コントロール細胞として使用されることもあるため注意が必要である．

Figure 5 に具体的な例を示す．

Figure 5A；腫瘍細胞成分のみを点線で囲んだ．腫瘍細胞には陽性所見を認めない．免疫担当細胞の陽性面積率は，約 10% と判定する．

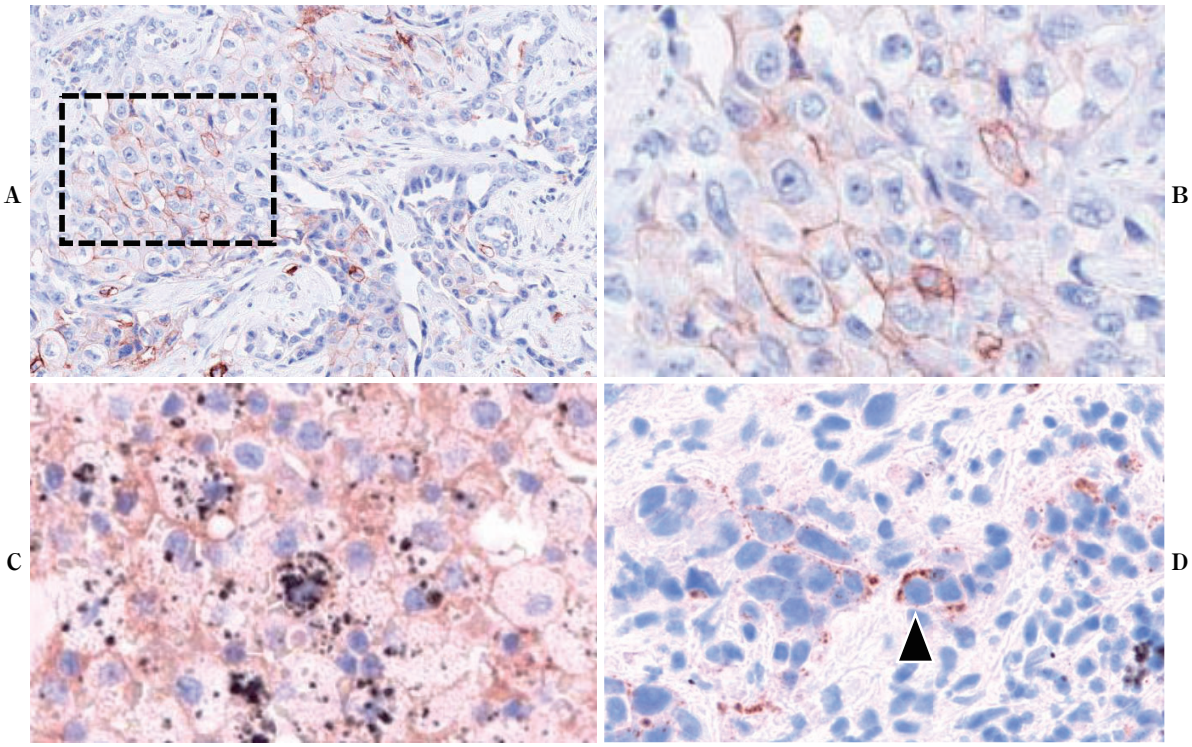

Figure 3. Points to keep in mind for PD-L1 IHC. **A:** Weakly positive case (lower magnification). **B:** Weakly positive case (higher magnification). **C:** Macrophage showing a positive reaction for PD-L1 Ab (anthracotic macrophages). **D:** Granular staining pattern.

Table 3. Points to Keep in Mind for PD-L1 IHC (Summary)

The evaluation of TPS	Denominator: total number of viable tumor cells Numerator: total number of "positive" tumor cells
Localization of staining	Membranous staining (partial or complete) Granular staining
Intensity	Any intensity is OK
Necrotic area	Staining of necrosis and intraluminal debris should be excluded from scoring
Others	Do not include alveolar macrophages or mesothelial cells that are "positive" for PD-L1

Figure 5B；腫瘍細胞成分のみを点線で囲んだ．腫瘍細胞にも陽性所見を認める．本症例では，腫瘍細胞の TPS は 50%，免疫担当細胞の陽性面積率は約 40% と判定する．この症例のように，腫瘍細胞と免疫担当細胞のどちらにも陽性を示す症例も存在する．

手術症例など標本が大きい場合，免疫担当細胞の評価は困難である．このような場合は，腫瘍細胞の評価と同様，腫瘍組織を分割して評価を行う．

6）PD-L1 IHC の問題点

PD-L1 免疫染色の評価を実際に行ってみると，いくつかの問題点が浮かび上がってきた．

1）抗体のクローンにより，染色性が異なることがある．ある種の抗体では陽性（TPS が 50% 以上）であったが，他の抗体では陰性（TPS が 0%）を示した症例も少数例ながら存在する．2）病理医の評価が必ずしも一致しないこともある．3）組織中にがん細胞が 80 個しかなかったならば，評価不能と返信するのか，それとも参考値として評価を記載するのか，4）診断薬メーカーごとに自動染色機が指定されており，これを抗体に応じて複数所持することは一般病院には負担である．現状では，これらに対する適確な回答は得られていない．

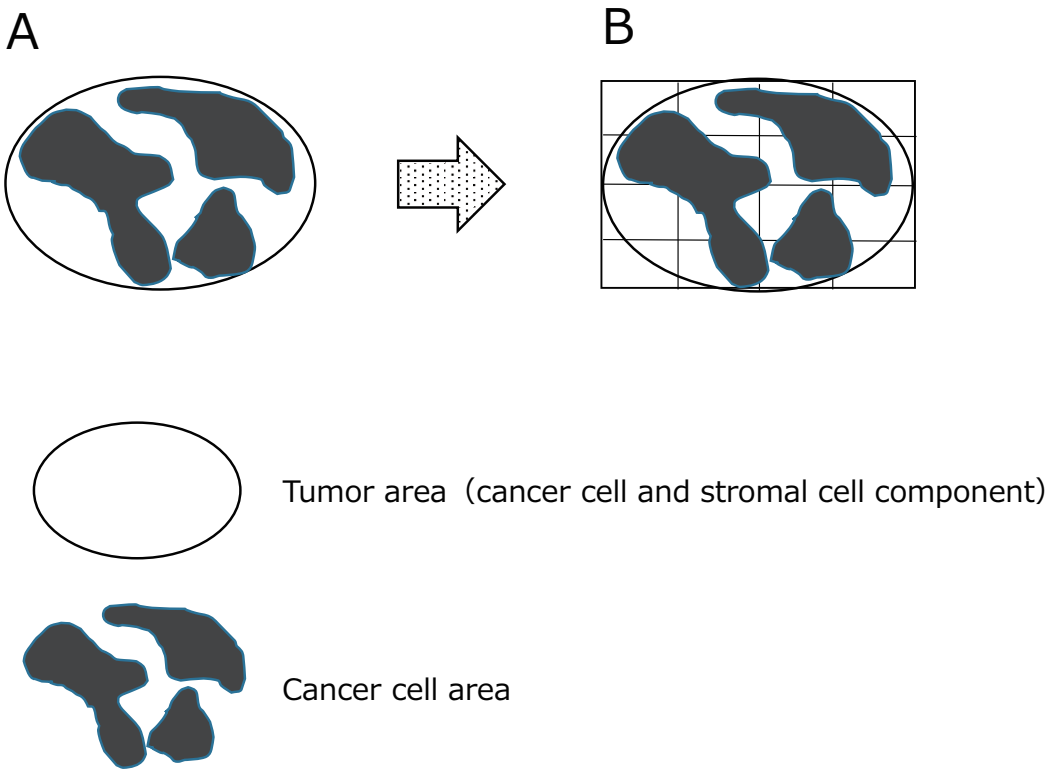

Figure 4. The evaluation method with larger tumors. **A:** Schematic illustration of a large tumor (cancer cell component and stromal component). **B:** Schematic illustration of the evaluation method.

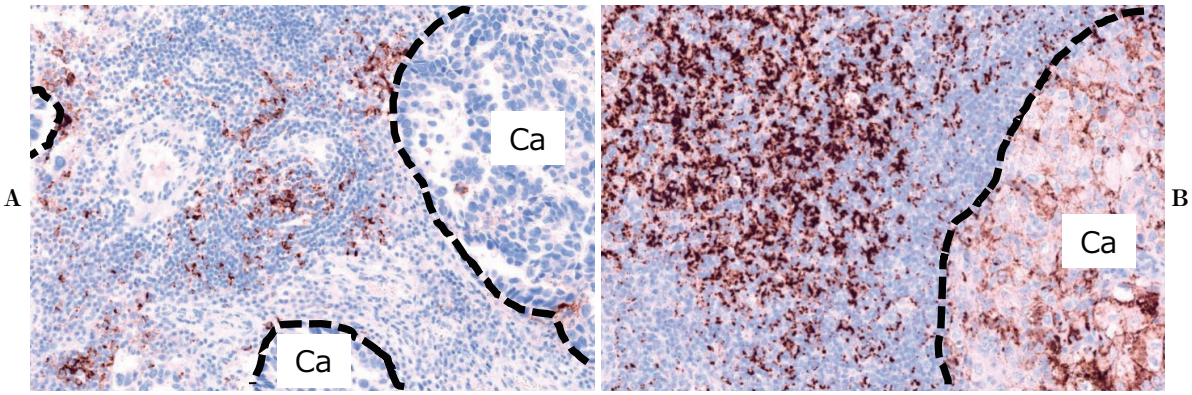

Figure 5. PD-L1 IHC testing (immune cells). **A:** Case showing positive immune cells. Dotted line indicating the cancer cell component. The immune cells were positive for PD-L1 Ab, while cancer cells were negative for PD-L1 Ab. **B:** Another case showing positive immune cells. Dotted line indicating the cancer cell component. Both the immune cells and cancer cells were positive for PD-L1 Ab. Ca: carcinoma.

7）終りに

PD-L1 IHC に関する現状，問題点を記した．今後，混乱なく PD-L1 IHC を実施していくためには，学会（肺癌学会，病理学会），企業，PMDA，厚労省などの連携が要求されるであろう．[6]

医学の進歩は目覚ましく，IHC の評価者として病理医に求められる役割も著しく増加することが予想される．本稿で紹介した PD-L1 IHC 評価の実際は，ほんの 1 例にすぎない．今後の IHC 評価には，人工知能の活用も重要な選択肢になるであろう．

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

REFERENCES

1. がんと免疫．坂口志文，西川博嘉，編集．南山堂；2015.
2. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014;27:16-25.
3. Monjazeb AM, Zamora AE, Grossenbacher SK, Mirsoian A, Sckisel GD, Murphy WJ. Immunoediting and antigen loss: overcoming the achilles heel of immunotherapy with antigen non-specific therapies. *Front Oncol.* 2013;3:197.
4. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:252-264.
5. Kim JM, Chen DS. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Ann Oncol.* 2016;27:1492-1504.
6. 第1回日本肺癌学会・日本病理学会合同 PD-1/PD-L1 コンパニオン診断 関係者会議議事録．https://www.haigan.gr.jp/modules/kaiin/index.php?content_id=51