

# NICHIREI BIOSCIENCES

## Focus Report

### 悪性中皮腫(上皮型)と肺腺癌の鑑別

環境省は石綿(アスベスト)を原因とする中皮腫と肺癌の死亡者が、2010年までの今後5年間で、1万5千人を越える可能性があることを試算しました。これまで悪性中皮腫はかなりまれな腫瘍として位置づけられておりましたが、病理検査室で中皮腫と腺癌の鑑別をする機会が増えていくものと思われます。

ここでは上皮型中皮腫と肺腺癌の鑑別に有用な抗体、そのパネルについて2人の先生にお伺いしました。山口県立総合医療センター病理科の亀井 敏昭先生には、悪性中皮腫の疫学、臨床所見・症状、病理所見などを多角的に、また細胞診断の側面からご執筆を頂きました。広島大学大学院医歯薬学総合研究科病理学の櫛谷 桂先生には組織診断の側面からご執筆を頂きました。

#### CONTENTS

- **悪性中皮腫の体腔液細胞診**  
山口県立総合医療センター病理科  
亀井敏昭
- **上皮型中皮腫の鑑別診断に有用な免疫組織化学**  
広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病理学  
櫛谷 桂, 武島幸男, 井内康輝

# 悪性中皮腫の体腔液細胞診

山口県立総合医療センター病理科  
亀井敏昭

## はじめに

肺は臓側胸膜に被覆され、胸壁の内部を被覆している壁側胸膜と共に胸腔を裏打ちしている。腹部臓器である胃、小腸、結腸及び肝臓などは、同様に臓側腹膜に被覆され、腹壁の内部を覆っている壁側腹膜と共に、腹腔を形成している。心膜腔を含め、それぞれの体腔の表面を被覆している組織が漿膜（中皮組織）であり、その最表層を裏打ちしている細胞を中皮細胞という。この中皮細胞が腫瘍化したものを中皮腫と呼ぶ。中皮腫には、その発生部位により、胸膜中皮腫（図1）、腹膜中皮腫ならびに心膜中皮腫に分類される。男性の場合、精巣が胎生期に下り、陰嚢内に鞘膜を伴う腔を形成する。この腔は本来、腹腔と連続したものであり、ごくまれに中皮腫が発生する場合がある。現在、中皮腫はびまん性に増殖するものが大部分を占め、広範囲に胸膜や腹膜に沿って進展する。例外的に、限局性の悪性中皮腫も報告されている。

## 悪性中皮腫の疫学

悪性中皮腫の発生頻度は稀な腫瘍で、その発生は人口 100 万人に対し 4～5 人といわれ、日本の剖検報告例では肺原発肺癌の約 1%、全悪性腫瘍の 0.2-0.3% とされる。男女比は 3～4 対 1 で男性に多く、40～70 歳代に好発する、60 歳代が好発世代とされる。ときに若年例、小児例の報告もある。発症には約 80% の症例でアスベスト（石綿）が関与するとされ、50% 以上の例で、アスベスト曝露歴があるとされる。アスベスト曝露から中皮腫発症までの潜時は最低 15 年以上、平均的には約 40 年といわれる。欧米に比して日本の悪性中皮腫症例のアスベスト曝露歴は少ないとされているが、これは問診時の際の職歴

聴取が十分でないことに起因するものと考えられる。

アスベスト曝露を受ける機会として、アスベスト原料を取り扱う業種から石綿製品製造業関連の業種が知られ、石綿の耐熱性、耐酸性、電気絶縁性、吸音性などから石綿製品を取り扱う事業所は多く、建設工事や保温配管工事、電気工事、ボイラー、溶鉱炉などの製造、取り付け、修繕、自動車の修理（特にブレーキライニング等）、造船業など多数の職種が知られる。これらの職業性曝露以外にも、石綿の鉱山や工場での近隣住民への曝露、石綿粉塵の付着した作業衣服を介した家族への曝露などが報告されている。厚生労働

省のデータによると、中皮腫の死亡者 1995 年 500 人、以来増加を呈し、2002 年は 810 人、2003 年 878 人、そして 2004 年には 953 人と増加しており、この 10 年間で 1.9 倍の伸びを示している（図2）。今後も中皮腫症例の増加が推定されており、日本での中皮腫診断ならびに治療面での標準化と向上が求められている。現在アスベスト曝露と中皮腫の発生については、わが国では注目されている重要な社会問題である。

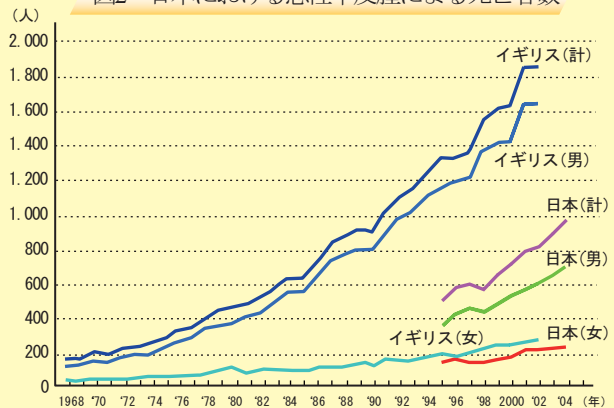
アスベスト曝露以外の悪性中皮腫発生の危険因子として、放射線治療、慢性漿膜炎症、ウイルス感染（SV40 ウイルス）などの関与が疑われているが、アスベスト以外の原因が明らかとなるだけの科学的根拠には乏しい。

図1 胸膜肺切除術で採取された悪性中皮腫例の肉眼所見

腫瘍は灰白色充実性で肺表面を被覆している。



図2 日本における悪性中皮腫による死亡者数



## 臨床症状・臨床所見

胸膜中皮腫の最も頻度の高い症状は胸痛と呼吸困難である。胸痛は呼吸運動によって増強しないが、ときに上腹部や肩に放散する。進行例では慢性咳嗽、発熱、体重減少を認める。身体所見上は症例の 85% に胸水貯留を認めるため、患側の呼吸音減弱、打診音の濁音化などの所見を呈する。血液検査では特異的所見はなく、白血球増多、貧血、血小板増多を種々の頻度で認め、この三者は予後不良を規定する因子ともいわれる。上皮型、上皮型と肉腫型を伴う二相型例では胸水貯留を伴うことが多いが、肉腫型では胸水貯留を認めないかごく少量のことが多い。胸部X線、CTなどの画像検査では肺野末梢、葉間の胸膜の不規則な肥厚を呈し、しばしば結節を伴う（図3）。ときに肺門、縦隔腫瘍、末梢型肺癌に類似した孤立性腫瘍影をみる。進行例では

縦隔が患側に偏位する。その理由は肺が胸膜腫瘍に囲まれ容積の縮小をもたらすことや、病変の肺内伸展に伴う無気肺によるものと考えられる。胸膜中皮腫は片側性に発生し、胸壁、肺、縦隔などの隣接臓器への浸潤を示す。

腹膜中皮腫では、CTなどの画像検査では腹膜、大網、腸間膜の不規則なびまん性肥厚、多発性結節像、まれに孤立性腫瘍を認め、しばしば腹水貯留を伴う。臨床的には腫瘍形成型と腹水貯留型に分類される。症状としては、早期では腹痛、腹部の不快感などに、便秘、食欲低下、嘔気、嘔吐などを伴うことが多い。病態の進行に伴い、腹水貯留や腸管の通過障害による症状が出現するが、腹腔外に進展することは少ない。

その他に発生するものとして心膜中皮腫

では心嚢液貯留、不整脈、心不全を契機にみつかることが多い。精巣鞘膜の中皮腫は通常陰嚢水腫、陰嚢腫瘍を呈する。

図3 悪性中皮腫症例の胸部CT所見

右肺を包み込むような腫瘍を認め、健側の左肺では、胸壁の内側に線状の胸膜ブランクを認める。



## 悪性中皮腫診断へのアプローチ

病歴、職場および生活環境中での石綿曝露歴の有無を詳細に聴取し、上述した画像所見を含めた臨床症候が確認されれば臨床的に悪性中皮腫が疑われる。ただし、明らかな石綿曝露歴が確認されない例も少なくないため、臨床的に原因不明の腔水症(胸水、腹水、心嚢液貯留など)を認める場合には本症を積極的に疑うことが必要である。体腔液中のヒアルロン酸値では、100mg/L以上の症例は悪性中皮腫を念頭に置き精査する必要があるが、ヒアルロン酸の高値そのものは悪性中皮腫に必ずしも特異的とはいえない。確定診断のためには、病理組織学的あるいは細胞診断学的検索が必要である。侵襲性の点からは貯留体腔液の細胞診が一番望ましいが、細胞診で診断に至らない場合も多いとされる。しかしながら、最初に体腔液が貯留された際に、その体腔液細胞診をきちんと解析すること

により悪性中皮腫と診断される例も増加しており、むやみに軽視すべきではない。病理組織学的診断が有用なことはいうまでもないが、検体の採取には従来経皮的針生検が行われており、検体量が不十分な場合が多く確診率は低い。最近では胸腔鏡下、腹腔鏡下による生検(VATS)による組織診断が盛んに実

施され、有効な診断方法となっている(図4)。

体腔液細胞診や病理組織診による中皮腫診断では、通常の検索以外に、組織化学、免疫組織化学、電子顕微鏡学的検査など、多彩な補助的手法を駆使した検討が必要で、早期診断することが今後は求められる。

図4 悪性中皮腫症例の胸腔鏡下生検での肺組織



## 悪性中皮腫の病理所見

悪性中皮腫の発生部位としては一般に胸膜が圧倒的に多く(70-90%)、次いで腹膜(10%前後)、そして心嚢膜や精巣鞘膜での発生が(ごく少数)報告されている。肉眼的には初期では壁側胸膜の多発性の境界不明瞭な白色または灰白色の小結節として認められ、進行するにつれて結節が融合し、斑状の塊となりびまん性に漿膜を覆う。悪性中皮腫とは一般にびまん性中皮腫のことを指す。しかし、稀に漿膜に孤立性腫瘤を形成する限局型悪性中皮腫も報告されている。また、これまで限局性線維性中皮腫(localized fibrous mesothelioma)と呼ばれた腫瘍は、組織学的に線維芽細胞様の腫瘍細胞よりなり、中皮細胞マーカーは陰性で、CD34陽性であり、未分化間葉系細胞の腫瘍と考えられ、孤立性線維性腫瘍(Solitary fibrous tumor; SFT)と呼ばれるようになった。大部分は良性であり、15~20%例が悪性とされる。この疾患は漿膜に関連しない臓器での報告も相次いでいる。

悪性びまん性中皮腫の組織学的分類は、上皮型、二相型(混合型)、および肉腫型(線維型)である。各組織型の頻度は上皮型(50-60%前後)、二相型(20~30%)、肉腫型(20%)といわれる(表1)。腹膜では上皮型の発生頻度が高いといわれている。

上皮型では、腫瘍細胞が乳頭状(図5)、管状、乳頭管状、小嚢胞状ないしは充実性に配列し、粘液腫様の間質を伴う。種々の配列様相が同一腫瘍内に混在していることが多い。腫瘍細胞の形態は、扁平形、立方形、類円形、

印環細胞型など多彩であるが、円柱形を呈する例はまれである。特徴的な細胞形態としては大型で豊富な好酸性細胞質をもつ類円形、多角形を示す細胞があげられる。これらの多少とも乳頭管状構造を示す組織形態が半数以上に認められる。分化度の高い腫瘍では腫瘍細胞の異型性および多形性は軽度で核分裂像は少ない。低分化な腫瘍では管状乳頭状構造を欠きシート状ないしは巣状に増殖し細胞異型も目立つ。また細胞の結合性が緩くなり粘液腫様の間質に腫瘍細胞が浮遊する像もみられる。上皮型の稀にみる亜型として小細胞型中皮腫、脱落膜様中皮腫(deciduoid mesothelioma)がある。

肉腫型では、核異性を伴う短~長紡錘形及び多形の腫瘍細胞が、種々の量で線維性の間質を伴い束状ないし錯綜性に配列する(図6)。ときに紡錘形細胞に混じて、多核巨細胞やrhabdoid cellを認める。また骨化生、軟骨化生もときにみられる。肉腫型中皮腫のなかで特に多量の膠原線維の増生を伴う例を線維形成性中皮腫(desmoplastic mesothelioma)と呼ぶ。この型では、胸膜線維化や癒痕などの炎症性変化との鑑別がきわめて重要である。

二相型は上皮様と肉腫様の成分が混在した中皮腫であり、古典的な中皮腫とされる(図7)。それぞれの成分が全体の10%を超えていることで診断されるが、生検材料での正確な二相型中皮腫の診断は難しい場合が多い。また、両者の成分では移行像を認めることもある。

図5 上皮型中皮腫の組織所見

比較的単調な腫瘍細胞が管状パターンないし乳頭状パターンを呈する。

HE染色 対物×10

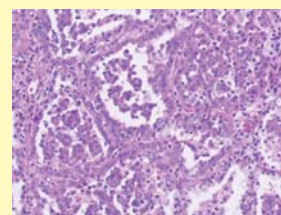


図6 肉腫型中皮腫の組織所見

紡錘形核を有し、繊維状の胞体をもった腫瘍細胞であり、主に束状ないし錯綜性の増生パターンを示す。

HE染色 対物×10

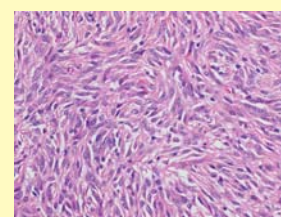


図7 二相型中皮腫の組織所見

肉腫型の組織と一部腺管を形成する上皮様の腫瘍細胞が混在する。

HE染色 対物×10

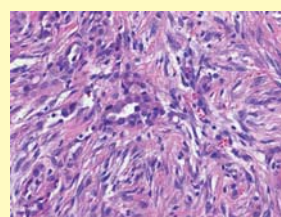


表1 中皮腫の分類 (WHO分類・日本肺癌学会分類)

WHO分類 (1999) "Mesothelial tumours"	日本肺癌学会分類 (2003) "中皮細胞腫瘍"
3.1 Benign	1. 良性
3.1.1 Adenomatoid tumor	1) アデノマトイド腫瘍
3.2 Malignant mesothelioma	2. 中皮腫
3.2.1 Epithelioid mesothelioma	1) 上皮型中皮腫
3.2.2 Sarcomatoid mesothelioma	2) 肉腫型中皮腫
3.2.2.1 Desmoplastic mesothelioma	a) 線維形成型中皮腫
3.2.3 Biphasic mesothelioma	3) 二相型中皮腫
3.2.4 Ohters	4) その他



## 悪性中皮腫の体腔液細胞診の特徴

### (1) 細胞学的特徴

体腔液中に出現する中皮腫細胞は、大部分が上皮型中皮腫の腫瘍細胞や二相型中皮腫の上皮型成分から剥離するものである。肉腫型では体腔液貯留をきたすこと自体も少ないが、体腔液中にその腫瘍細胞が剥離した場合でも、細胞異型が強調される点からもその細胞診断は困難なことが多い。背景としては血性のことが多く、種々の炎症細胞の出現を認める。壊死性背景のことは少ない。ヒアルロン酸産生に富む症例では、貯留体腔液は粘稠であり、擦り合わせ式の塗抹標本作製を行う必要がある。塗抹標本はパニコロウ染色で背景に顆粒状あるいはフィルム状を呈したびまん性の好酸性物質を認める。腫瘍細胞の出現様式としては、孤立散在性に出現する

ものや、マリモ状、乳頭状、球状の大型の細胞集塊あるいは比較的平面的な小集塊のものなど多彩である(図8)。一般的に腫瘍細胞の出現細胞数は多く、集塊の辺縁部はこぶ状の突出(knobby contour)を呈することが多い。また、細胞相接像 cell to cell apposition や対細胞 pair cell もしばしば認められる。個々の腫瘍細胞の大きさは直径 20 ~ 45 $\mu$ m で多形性に乏しい(図9)。そして、核/細胞質比(N/C比)は反応性中皮細胞と比してむしろ小さい。核は類円形で核形の不整に乏しく、比較的均一な大きさをもち、細胞の中心性に位置する。核クロマチンは軽度増量し、典型的な症例では微細顆粒状で、明瞭な核小体が1 ~ 2個認められる。また、出現細胞は単核細胞が75.2%、2核細胞が22.0%で、3核以上の多

核細胞は2.8%にみられる(図10)。また、ときに10核以上に及ぶ核数を有する多核巨細胞の性状を呈する中皮腫細胞が出現する(図11)。細胞質は比較的豊富でライトグリーン好性を示し、一般に核周囲は明るく、その周囲では重厚感を増し、同心円状の層板状構造を認める。またギムザ染色標本では、細胞質の好塩基性が強調される(図12)。細胞質辺縁部は全周性の微絨毛の発達を反映しており、不明瞭な境界を示す。また、中皮腫症例ではしばしば腫瘍細胞に混じてオレンジG好性細胞がみられることが多く(図13)、診断に関しては有用な指標となる。しかしながら、その細胞由来については更に検討すべきであろう。

図8 胸水中の中皮腫細胞

比較的平面的な配列を呈する細胞集塊であり、乳頭状パターンを示す。  
Papanicolaou染色 対物×20

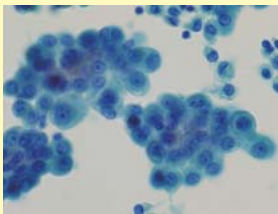


図9 胸水中の中皮腫細胞

比較的孤立性の出現を示す。2核細胞が目立つ。  
Papanicolaou染色 対物×20

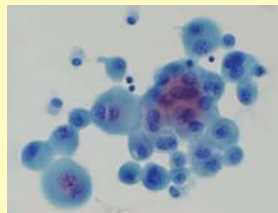


図10 体腔液に出現する中皮腫、腺癌、反応性中皮の核数の比率

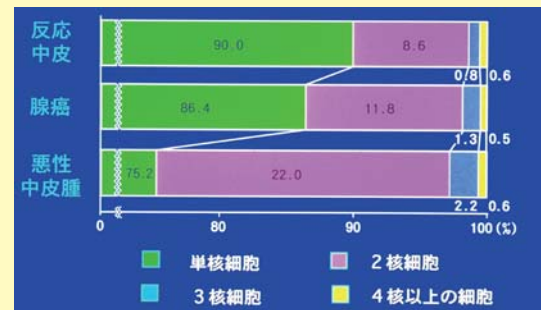


図11 多核細胞としての中皮腫細胞

中皮腫細胞の特徴としては多核細胞が多い。この写真では、5核以上の中皮腫細胞を認める。  
Papanicolaou染色 対物×20

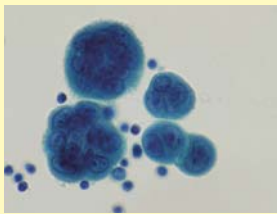


図12 中皮腫細胞のギムザ染色所見

細胞質の好塩基性が目立つ。  
May-Giemsa染色 対物×10

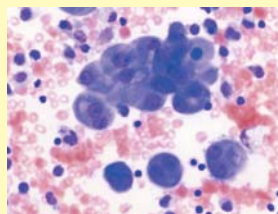
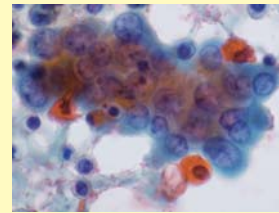


図13 中皮腫例に認められるオレンジG好性細胞

中皮腫細胞の集塊内に、オレンジG好性細胞が散見され、その細胞の核は濃縮気味である。  
Papanicolaou染色 対物×20



### (2) 特殊染色所見

#### 1) PAS染色とアルシアン青染色

PAS(periodic acid-Schiff)染色では、腫瘍細胞質内に顆粒状ないし滴状ドット状の陽性物質を認めることが多い(図14)。この陽性物質はジアスターゼ処理で消失し、グリコゲンに一致するが、その量は症例により様々である。アルシアン青染色(pH2.5)やコロイド鉄染色では、上皮型の腫瘍細胞の形成する腺腔様構造の内部、間質に陽性反応を示し、と

きに細胞質内にも種々の程度で陽性反応を示す。この反応はヒアルロンダーゼ処理で消失ないし著しく減弱し、ヒアルロン酸の産生を示す。しかし、上皮型でも未分化な例では陽性物質が乏しいか、もしくは陰性のことが多い。さらに通常の固定に使用されるホルマリン水溶液に相当量のヒアルロン酸が溶出することに注意が必要である。アルシアン青染色で陽性となる物質は、ヒアルロン酸結合蛋白(HABP)を用いた免疫染色での陽性所見と同様な分布を呈する。

#### 2) 免疫細胞・組織化学染色(表2)

悪性中皮腫および中皮細胞の特徴のひとつは細胞質内に複数の中間径フィラメントを有することである。上皮型の中皮腫で上皮性のcytokeratin、間葉系のvimentinが高率に陽性となる。さらにまた、筋細胞系の中間径フィラメントのdesminが一部の症例で陽性を示す。これらの中間径フィラメントの陽性率は組織型、分化度により異なる。また、肉腫型中皮腫ではcytokeratinが約70%以上の症例で陽性所見を呈し、一部では $\alpha$ -smooth muscle actinが陽性を示すこともある。そして、上皮膜抗原のひとつであるepithelial

図14 中皮腫細胞のPAS染色体度

中皮腫細胞の胞体内にはドット状のPAS陽性物質を認める。殆どがグリコゲンの性状を示す。  
PAS染色 対物×20

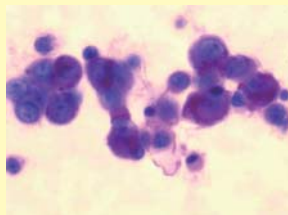


表2 反応性中皮、腺癌および中皮腫との鑑別に有用な抗体パネル

中皮マーカー (反応性中皮、中皮腫に対して感度(陽性率)が高い抗体)	calretinin, D2-40, Mesothelin, CK5/6, thrombomodulin, (HBME1)
腺癌マーカー (腺癌細胞に感度が高い抗体)	CEA, BerEP4, MOC31, LeuM1(CD15)
反応性中皮と中皮腫との鑑別に有用な抗体	EMA (epithelial membrane antigen)

membrane antigen (EMA) が上皮型中皮腫に高い陽性率を示し、細胞膜に沿って膜状に強陽性を示すのが特徴的な所見である(図15)。しかし、低分化な上皮型中皮腫や肉腫型中皮腫ではEMAの陽性率は低いとされる。

近年、腺癌に比し悪性中皮腫および中皮細胞に陽性率が高いマーカー(中皮関連マーカー)として calretinin、thrombomodulin、HBME-1などが知られるようになった。calretinin は分子量 29kd のカルシウム結合蛋白で、上皮型悪性中皮腫では一部の報告を除き、概ね 80%以上の陽性率を示す(図16)。使用する抗体の製造元によって陽性率に差があることが報告されており注意する必要がある。calretinin は細胞診検体では中皮腫の陽性率はほぼ 100%であり、細胞質に陽性所見を呈する。ホルマリン固定後のセルブロック、組織標本では細胞質および核内に陽性を示すことが多い。calretinin が陽性を示す症例では出現細胞の多くが陽性となることが多い。しかし、少数の腺癌例でも陽性を示し(約 13%)、出現している腫瘍細胞での陽性数は少数に留まる。現時点で上皮型悪性中皮腫に対して最も特異性が高く、有用なマーカーである。ただし、組織検体での肉腫型中皮腫の陽性率は 40%以下であるため、他の所見を合わせた総合的な判定が必要となる。

thrombomodulin は分子量 75kd の細胞膜を貫通する糖蛋白で血管内皮細胞や中皮細胞に陽性となる。thrombomodulin は通常細胞膜に陽性となる。細胞診検体では悪性中皮腫での陽性率は 60~70%である。しかし、thrombomodulin が陽性を示す悪性中皮腫例でも腫瘍細胞の陽性頻度が低いことが少なからず経験される。また、組織検体では肉腫型中皮腫の陽性率は一般に低い。

抗中皮抗体である HBME-1 は細胞膜表面に陽性を示し、組織標本、細胞診標本で中皮細胞、上皮型悪性中皮腫での陽性率は高い(約 90%)が、腺癌の半数以上の例でも陽性を示すことが報告されており、中皮関連マーカーとしての特異性は低い。

組織標本を用いた免疫組織化学的検討で、ウィルス腫瘍関連遺伝子産物である WT1 (核内に陽性)や cytokeratin5/6 の陽性率が上皮型悪性中皮腫に高く、肺腺癌に低いことが

知られるようになった。ことに cytokeratin5/6 は上皮型中皮腫を肺腺癌と鑑別する目的では calretinin に匹敵する感度、特異度が報告されているが、著者の検討では細胞診検体では特異度はあまり高いものではなく(特異度)、細胞鑑別の目的としては使いづらい印象がある。

最近注目されている中皮関連マーカーとしては、リンパ管内皮細胞マーカーの D2-40 や細胞接着蛋白のひとつである Mesothelin であり、これらのマーカーに対する抗体を用いた検索が悪性中皮腫診断に有用とされる。D2-40 は中皮腫細胞の細胞膜に陽性所見を呈し(図17)、Mesothelin は細胞膜や細胞質に陽性所見を示す。

一方、悪性中皮腫、中皮細胞に陰性もしくは陽性率が低く、腺癌に陽性率の高い抗体として、CEA(carcinoembryonic antigen)、Ber-EP4、B72.3、MOC-31 などの上皮性マーカーがある。CEA は種々の腺癌に陽性を示し、悪性中皮腫には原則として陰性といわれている(図18)。しかし、CEA には一部共通な抗原活性をもつ数多くの交叉抗原が知られており、用いる抗体によっては少ないながらも CEA 陽性の悪性中皮腫例が報告されている。腺癌の陽性率は概ね 55~90%である。原発巣、組織型によって CEA 陽性率には差があり、肺、消化管由来の腺癌では陽性率は高いが、例えば卵巣癌や甲状腺癌、前立腺癌、腎細胞癌などでは CEA の陽性率は低い。殊に、卵巣癌(腺癌)では粘液性腺癌を除き、CEA 陽性率はきわめて低い(30%以下)。

Ber-EP4 は乳癌細胞の培養株を免疫原として分離された上皮細胞の表面糖蛋白(30 および 34kd)で、腺癌での陽性率は 60~70%であるが、その陽性率は原発部位により異なり、肺癌、卵巣癌、子宮体癌、消化管由来の腺癌での陽性率は 80%以上である。一方、肝、腎由来の腺癌ではその陽性率は低い。また、Ber-EP4 は CEA 陽性率の低い卵巣癌の漿液性腺癌では高い陽性率が認められる。一方、悪性中皮腫での陽性率は 0~20%とされる。

MOC-31 は肺小細胞癌細胞の培養株を免疫原として分離された上皮細胞の細胞膜を貫通する糖蛋白(分子量 40kd)で、悪性中皮

腫での陽性率は 0~20%であるが、一部の報告例を除き多くの報告では 10%以下である(図19)。肺癌をはじめに種々の臓器由来の腺癌では 80~100%と高い陽性率が報告されている。B72.3 は乳癌細胞の培養株を免疫原として分離された TAG-72 とよばれる糖蛋白で腺癌の陽性率は 47%~100%、一方、中皮腫の陽性率は 0~48%であるが、肺癌の約 20%が陰性を示すといわれる。

Leu-M1 (CD15) は顆粒球、単球系のマーカーで成熟リンパ球も陽性を示すが、種々の上皮細胞において陽性となる。悪性中皮腫での陽性率は低い(0~10%)が、腺癌での陽性率は概ね 28~75%程度で、特に肺癌では約半数例で陰性とする報告もある。他に腺癌で陽性率が高く悪性中皮腫で陰性もしくは陽性率の低いマーカーとして E-cadherin、BG-8 などがあるが、その評価はまだ定まっていない。

以上の抗体の陽性率は、用いる検体の種類(パラフィン包埋の組織切片、細胞診検体でもセルブロックか、スメアか)、固定法、前処置(免疫原賦活の有無、方法)、結果の評価法(何%以上の細胞が陽性となれば陽性と判定するか、当該細胞の陽性局在など)によって異なるので注意が肝要である。

これまでに腺癌との鑑別に軸に悪性中皮腫の免疫細胞・組織学的検討が多数なされてきたが、現時点では悪性中皮腫に単一で診断精度の高い抗体は存在しない。したがって悪性中皮腫の免疫組織学的診断は複数の抗体を組み合わせた抗体パネルとして応用することが推奨されている。どの抗体の組み合わせが最も有用かは必ずしも意見の一致はないが、これまでに十分な検討が行われ、評価がほぼ定着している点から考えると、特に腺癌との鑑別においては、悪性中皮腫(上皮型)に対する陽性マーカーとしては calretinin、Mesothelin、や D2-40 を、陰性マーカーとして CEA、BerEP4、MOC-31 の内から想定される腺癌の原発巣に応じて複数個を選んで使用することが有用であろう。

このような抗体パネルとしての考え方は、細胞所見をきちんと把握し、その上で鑑別対象を絞り、適切な抗体選択を行なった上で、実施することが望ましい。中皮腫や腺癌との鑑別におけるわれわれの成績を表 3~5 に記載する。

図15 免疫細胞化学的所見

中皮腫細胞はEMA強陽性であり、主に細胞膜部に強調される。抗EMA抗体 対物×20

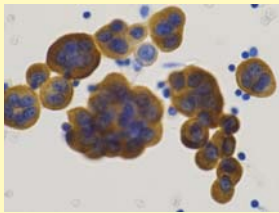


図16 免疫細胞化学的所見

中皮腫細胞はcalretinin強陽性であり、主に細胞質に染色される。組織所見で認められる核内の陽性所見はあっても乏しい。抗calretinin抗体 対物×20

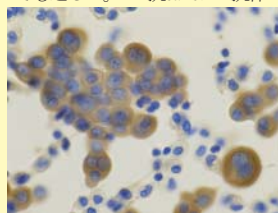


図17 免疫細胞化学的所見

中皮腫細胞はD2-40に陽性所見を示し、主に細胞膜が染色される。抗D2-40抗体 対物×20

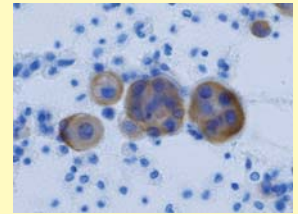


図18 免疫細胞化学的所見

中皮腫細胞はCEAに対して陰性であり、この所見は腺癌との鑑別に重要である。抗CEA抗体 対物×20

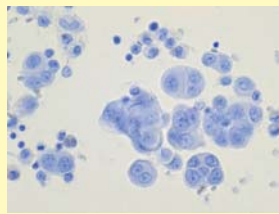


図19 免疫細胞化学的所見

中皮腫細胞は腺癌マーカーであるMOC31には陰性であるが、ときに小範囲で陽性所見を呈する症例もある。抗MOC31抗体 対物×20

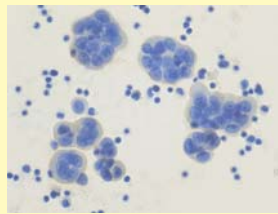




表3 悪性中皮腫と腺癌との抗体パネルによる細胞鑑別 (診断特性)

悪性中皮腫に対する特性	感度	特異度
Calretinin	100	83
Thrombomodulin	82	90
Cytokeratin 5/6	75	56
HBME-1	93	35

表4 腺癌と反応性中皮との抗体パネルによる細胞鑑別 (診断特性)

反応性中皮に対する特性	感度	特異度
Calretinin	100	83
Thrombomodulin	40	90
Cytokeratin 5/6	90	56
HBME-1	100	35

表5 悪性中皮腫と反応性中皮のEMA染色による細胞鑑別 (診断特性)

悪性中皮腫に対する特性	感度	特異度
EMA	96	35
m-EMA	93	75

m-EMA：細胞膜に強調されるEMAの陽性像

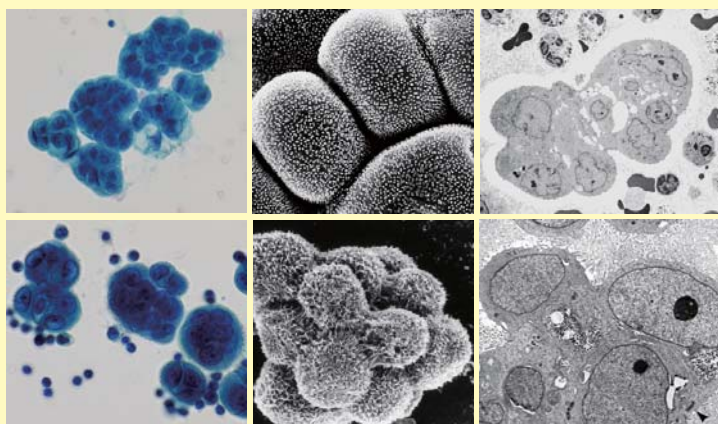
### (3) 電子顕微鏡学的所見 (図 20)

上皮型悪性中皮腫では、細長く、迂曲した微絨毛が特徴的であり、細胞表面や細胞内管腔面に観察され、微絨毛が密在する。また細胞内管腔にも微絨毛は認められる。最長5本の微絨毛の長さとの直径の比率の平均値 (length-diameter ratio: LDR) は一般に10~17で、腺癌では10以下のものが多く、両者の鑑別に有用な所見とされる。なお腺癌の微絨毛の断面には芯フィラメントがしばしばみられるが、上皮型悪性中皮腫では通常認めない。細胞質ではミトコンドリアや粗面小胞体が発達し、しばしば豊富なグリコーゲン顆粒が認められる。また、細胞質内の中間径フィラメントが豊富であり、核周囲を取り囲むような分布が特徴的である。

腺癌との鑑別に有用な所見としては、微絨毛のLDRに加え、中間径フィラメントの量、細胞間接着装置の長さが上皮型悪性中皮腫で有意に大きく、細胞内リボゾームの量は腺癌で多いことなどが参考となる。しかし、これらの所見の特徴は比較的分化度の高い上皮型中皮腫にみられるもので、上皮型であって低分化上皮型中皮腫や肉腫型中皮腫例では上記の微細構造の特徴は不明確となる。肉腫型中皮腫は紡錘形の線維芽細胞様の腫瘍細胞より成るが、詳細に観察すると未発達な微絨毛様の細胞質突起やトノフィラメント様の線維束、デスモゾーム様の細胞間接着装置など上述した上皮型細胞の特徴のいくつかを備えた細胞として認められる。また、肉腫型中皮腫では細胞質内に dense body を伴い、マイクロフィラメントが集積し筋フィラメントに類似した構造を示す場合がある。

図20 電子顕微鏡学的所見

上は腺癌のPapanicolaou染色、走査電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡所見。下は中皮腫である。腺癌に比して中皮腫が微絨毛の発達が顕著であることがわかる。また、中皮腫細胞はグリコーゲンに富む。



### 染色プロトコール

1 固定	95%エタノール	室温、30分以上
2 洗浄	0.05M TBS (pH7.6)	
3 内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止	0.3%過酸化水素加メタノール	室温、30分
4 洗浄	0.05M TBS (pH7.6)	3回(1,2回は流す程度,3回目は5分以上)
5 正常血清ブロッキング	5%正常血清	5分
6 正常血清のTap Off		
7 抗原抗体反応	一次抗体	湿潤箱中、4℃、overnight
8 洗浄	0.05M TBS (pH7.6)	3回(1,2回は流す程度,3回目は5分以上)
9 抗原抗体反応	シンプルステイン MAX-PO(MULTI)	湿潤箱中、室温、30分
10 洗浄	0.05M TBS (pH7.6)	3回(1,2回は流す程度,3回目は5分以上)
11 発色	DAB発色液	1枚ずつ顕微鏡下で実施
12 洗浄	流水	
13 核染色	マイヤーのヘマトキシリン	
14 洗浄	流水	
15 脱水、透徹、封入		

### まとめ

悪性中皮腫がアスベスト曝露に関連して増加するという社会的状況を考えると、悪性中皮腫の概念やその組織所見、細胞診所見について正しい知識を得る必要性が求められている。このことは中皮腫診断のプロセスや治療の標準化に向けた取り組みの中では、最大の課題であろう。これまで稀とされてきた悪性中皮腫の病態を理解し、臨床的に正しく診断するためには、目的毎の細胞鑑別の方法にも精通し、体腔液細胞診に臨む必要があることを強調したい。

### 参考文献：

1. 海老原善郎, 亀井敏昭監修：体腔液細胞診アトラス, 篠原出版新社, 東京, 2002.
2. 亀井敏昭, 岡村宏, 渋谷秀美, 他：悪性中皮腫の体腔液細胞診. 病理と臨床 22(7): 693 ~ 700, 2004.
3. 亀井敏昭, 渋谷秀美, 岡村宏, 他：体腔液細胞診における細胞鑑別-反応中皮, 中皮腫および腺癌の鑑別を中心に -Medical Technology 28: 61 ~ 68, 2000.
4. 森永謙二編：職業性石綿ばく露と石綿関連疾患-基礎知識と労災補償 -三信図書 2002.

# 上皮型中皮腫の鑑別診断に有用な免疫組織化学

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病理学  
櫛谷 桂、 武島幸男、 井内康輝

## はじめに

昨今、アスベスト曝露により発症したと考えられる中皮腫の増加が話題となっている。中皮腫の原因として疫学的に立証されているものとしては石綿（アスベスト）とエリオナイト（天然鉱物繊維）があるが、最近のわが国で急増している中皮腫の発症要因は、ほとんどがアスベストと考えられている。石綿曝露開始から中皮腫発症までの平均潜伏期間は約40年であり、わが国における石綿輸入量のピークが1970年～1990年であったことから推定すると、わが国の中皮腫患者数は2010年～2030年にピークを迎えると考えられる。今後さらなる中皮腫患者の増加が予想され、自治体や国家レベルでの実態調査や被害補償の必要性が叫ばれている状況を鑑みると、悪性中皮腫の病理診断が今後一層その重要性を増すことは想像に難くない。しかし、これまで悪性中皮腫は症例が少なく、個々の施設における経験が限られるため、診断の精度に問題がないとはいえない状態であった。こうした状況のもと、中皮腫に関する全国的なアンケート調査と鑑別診断に有用な免疫組織化学的所見に関する検討を行うことができたので、ここにその結果をまとめ、病理診断の精度向上のために必要な知識を提示したい。

## 中皮腫の分類

1999年に改訂されたWHO分類および2003年にそれに準拠して改訂された日本肺癌学会分類では、中皮腫は表1のように分類される。日本病理学会認定病理専門医に対し、1995年～2002年に経験した悪性中皮腫症例を対象として行ったアンケート調査によると、悪性中皮腫の各組織型の発生頻度は、上皮型が53.5%、二相型が23.9%、肉腫型が20.3%であり、発生部位は胸膜が80.8%、腹膜が13.8%、心膜が3.0%であった。

## 中皮腫の病理学的鑑別診断

悪性中皮腫の約80%が上皮型の成分を含む組織型であり、約80%が胸膜原発であることから考えると、中皮腫の鑑別診断において最も問題となる可能性が高いのは中皮腫と肺腺癌の鑑別であろう。肺末梢に生じた腺癌がときに胸膜に沿って進展し、腫瘍が肺を囲繞する中皮腫と類似した形態を示すことがあるが、さらに肉眼所見を参考にすることのできない生検材料や部分切除材料による診断では、上皮型中皮腫の確定診断は容易ではない。こうした場合、免疫組織化学的染色による検討が有効であり、いくつかの抗体を組み合わせたパネルを設定し、その染色結果によって鑑別を行うべきである。

我々は上記の抗体パネルの設定のために悪性中皮腫88例、肺腺癌51例を用いて、12種類の抗体を用いた免疫組織化学的検討を行い、さらに単独の抗体および2種類ないし3種類のマーカーの組み合わせでの感度・特異度を検討した。

表1 中皮細胞腫瘍の組織分類

WHO分類 (1999) “Mesothelial tumours”	日本肺癌学会分類 (2003) “中皮細胞腫瘍”
3.1 Benign	1. 良性
3.1.1 Adenomatoid tumor	1) アデノマトイド腫瘍
3.2 Malignant mesothelioma	2. 中皮腫
3.2.1 Epithelioid mesothelioma	1) 上皮型中皮腫
3.2.2 Sarcomatoid mesothelioma	2) 肉腫型中皮腫
3.2.2.1 Desmoplastic mesothelioma	a) 線維形成型中皮腫
3.2.3 Biphasic mesothelioma	3) 二相型中皮腫
3.2.4 Others	4) その他

その結果、表2に示す如く、単独の抗体としてはWT-1が感度、特異度ともに高く、上皮型中皮腫の陽性マーカーとして最も有用と考えられる。CalretininもWT-1とほぼ同等の高い感度を示したが、特異度の面ではWT-1に及ばなかった。しかし、腺癌におけるcalretinin陽性例の多くでは、腫瘍組織の10%未満で陽性を示すに過ぎず、実際の病理診断業務における有用性はWT-1に匹敵すると考えられる。ThrombomodulinはWT-1に次ぐ高い特異度を示したが、感度の面ではWT-1、calretininに及ばなかった。上皮型中皮腫の陰性マーカーとしてはCEAが感度・特異度ともに高く、鑑別に有用と考えられた。また、

表3に示す如く、複数のマーカーの組み合わせでは、WT-1とCEAの2者の組み合わせで最も高い感度と特異度が得られた。しかし、WT-1はcalretininに比して陽性を示す細胞の割合が低く、発現強度も弱い傾向があるため、特に少量の生検材料などで診断を行う場合、calretininとCEAの2者、あるいはcalretinin、WT-1、CEAの3者の組み合わせが有用となる場合もある。また、低分化な上皮型中皮腫では、ごく少数の腫瘍細胞でのみcalretinin、WT-1が陽性であることが多い点には注意が必要である<sup>2)</sup>。

今回検討を行ったもの以外に、過去の我々の施設における染色経験では

TTF-1が肺腺癌105例中102例(97.1%)で陽性、中皮腫10例全例で陰性であり、中皮腫の陰性マーカーとして有用であると考えられる。また、最近D2-40、podoplaninなどの感度・特異度ともに高い新たな中皮細胞陽性マーカーが報告されており、今後のさらなる検討が待たれる。

### 文献

- 1) 森永謙二：中皮腫の疫学、病理と臨床 22: 660-666, 2004
- 2) 井内康輝, 武島幸男, 櫛谷桂：中皮腫の病理、病理と臨床 22: 681-686, 2004

表2 上皮型中皮腫と肺腺癌の免疫組織化学的所見

マーカー	陽性率	
	上皮型中皮腫	肺腺癌 (n=51)
Calretinin	95% (83/87)	33% (17/51)
WT-1	99% (83/84)	16% (8/51)
AE1/AE3	100% (88/88)	100% (51/51)
CAM5.2	97% (84/87)	100% (51/51)
Cytokeratin 5/6	71% (55/78)	41% (21/51)
Vimentin	91% (80/88)	47% (24/51)
EMA	96% (84/88)	100% (51/51)
Thrombomodulin	70% (59/84)	20% (10/51)
Mesothelin	77% (64/83)	69% (35/51)
CEA	7% (6/86)	98% (50/51)
CA19-9	18% (7/40)	73% (37/51)
CA125	85% (34/40)	80% (41/51)

表3 各種免疫組織化学的所見の上皮型中皮腫に対する感度・特異度

所見	感度	特異度
Calretinin(+)	95%	67%
WT-1(+)	99%	84%
Cytokeratin 5/6(+)	71%	59%
Vimentin(+)	91%	53%
Thrombomodulin(+)	70%	80%
CEA(-)	93%	98%
CA19-9(-)	83%	73%
Calretinin(+)/WT-1(+)	100%	63%
Calretinin(+)/Thrombomodulin(+)	99%	55%
Calretinin(+)/CEA(-)	98%	65%
WT-1(+)/Thrombomodulin(+)	99%	71%
WT-1(+)/CEA(-)	100%	82%
Thrombomodulin(+)/CEA(-)	98%	78%
Calretinin(+)/WT-1(+)/Thrombomodulin(+)	100%	53%
Calretinin(+)/WT-1(+)/CEA(-)	100%	61%
Calretinin(+)/Thrombomodulin(+)/CEA(-)	100%	53%
WT-1(+)/Thrombomodulin(+)/CEA(-)	100%	69%

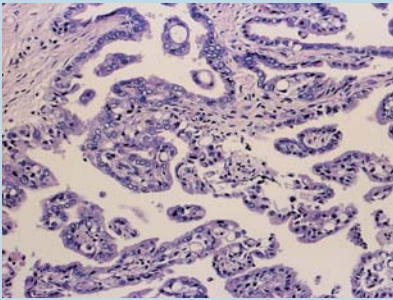
\* A/BはAまたはB、A/B/CはAまたはBまたはCの意。  
 \* 複数の所見の組み合わせにおける感度：中皮腫症例のうち、A、B(またはA、B、C)のうち1つ以上の所見を示した症例の割合。  
 \* 複数の所見の組み合わせにおける特異度：腺癌症例のうちA、B(またはA、B、C)のいずれの所見も示さなかった症例の割合。

### 染色プロトコール

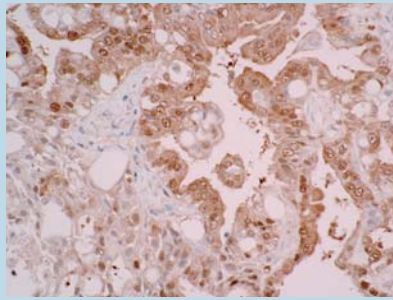
1 脱パラフィン	キシレン〜アルコール	
2 洗浄	流水	
3 抗原性の賦活化	0.01M クエン酸緩衝液(pH6.0)	オートクレーブ、121°C、20分
4 室温放置		20分以上
5 洗浄	流水	
6 内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害	0.3%過酸化水素加メタノール	室温、30分
7 洗浄	0.01M PBS (pH 7.2)	5分×3回
8 抗原抗体反応	一次抗体	湿潤箱中、37°C、60分
9 洗浄	0.01M PBS (pH 7.2)	5分×3回
10 抗原抗体反応	シンプルステインMAX-PO(MULTI)	湿潤箱中、室温、30分
11 洗浄	0.01M PBS (pH 7.2)	5分×3回
12 発色	DAB発色液	湿潤箱中、室温、20分
13 洗浄	流水	
14 核染色	マイヤーのヘマトキシリン	数秒
15 洗浄	流水	
16 脱水分別	100%アルコール	3回
17 透徹	キシレン	3回



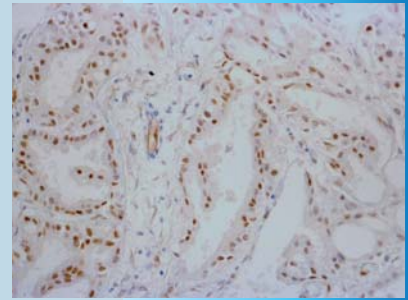
## Mesothelioma



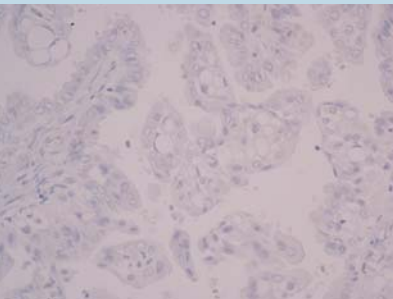
HE 染色



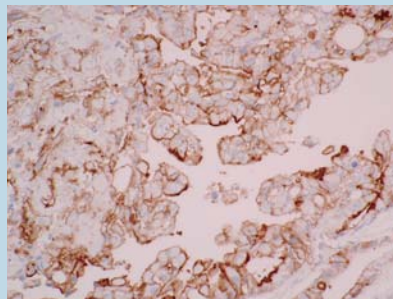
Calretinin: 腫瘍細胞の核と細胞質に陽性を示す。細胞質より核の陽性所見が強い。



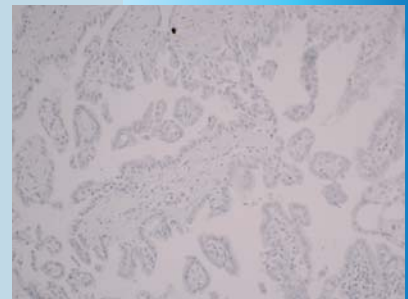
WT-1: 腫瘍細胞の核に陽性を示す。



CEA: 陰性。

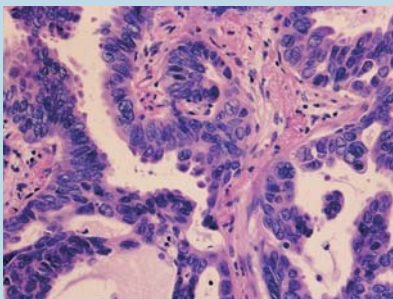


D2-40: 腫瘍細胞の細胞膜に陽性を示す。

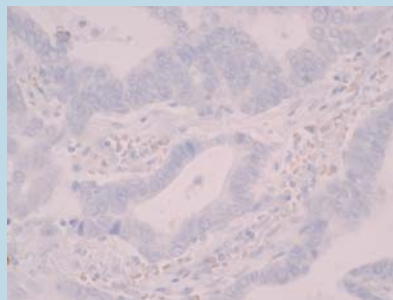


TTF-1: 陰性。

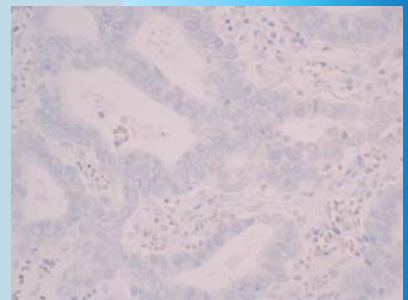
## Adenocarcinoma



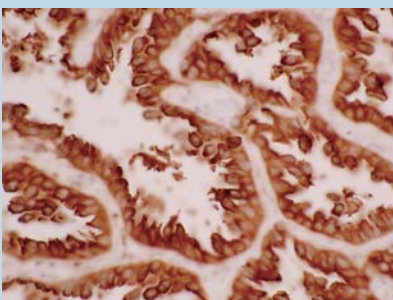
HE 染色



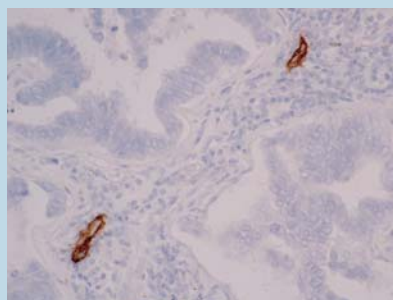
Calretinin: 陰性。



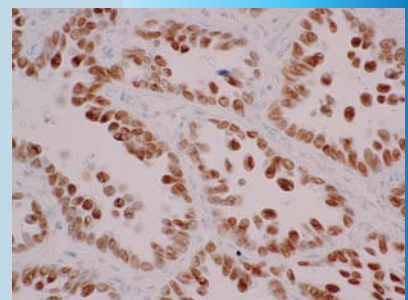
WT-1: 陰性。



CEA: 腫瘍細胞の細胞質に強陽性を示す。



D2-40: 腫瘍細胞は陰性。間質のリンパ管内皮細胞が陽性を示す。



TTF-1: 腫瘍細胞の核に陽性を示す。

### 1. ヒストファインユニバーサル試薬

シンプルステイン  
ペルオキシダーゼ染色

	組み合わせる第一抗体の動物種	品名	コード	包装	価格(円)
医薬品	マウス・ウサギ両用	ヒストファイン シンプルステインMAX-PO(MULTI)	424151	170テスト	40,000
		Histofine Simple Stain MAX-PO(MULTI)	424152	500テスト	58,000
			424154	1500テスト	120,000
医薬品	マウス	ヒストファイン シンプルステインMAX-PO(M)	424131	170テスト	36,000
		Histofine Simple Stain MAX-PO(M)	424132	500テスト	54,000
			424134	1500テスト	118,000

### 2. ヒストファイン補助試薬 基質

ペルオキシダーゼ基質

	品名	コード	包装	価格(円)
医薬品	シンプルステインDAB溶液	415171	170テスト	15,000
		415172	500テスト	25,000
		415174	1500テスト	48,000
	DAB基質キット	425011	500テスト	24,000

### 3. 第一抗体

ヒストファイン

	品名	コード	希釈済抗体	包装	価格(円)	備考
	抗アクチン(平滑筋)モノクローナル抗体	412021	希釈済抗体	6 mL	50,000	
	CD15モノクローナル抗体(MCS-1)	413461	希釈済抗体	6 mL	30,000	要AC処理
		413471	未希釈抗体	1 mL (1:25-50)*1	48,000	要AC処理
	抗癌胎児性抗原モノクローナル抗体(COL-1)	413121	希釈済抗体	6 mL	32,000	要AC処理
	D2-40モノクローナル抗体	413451	希釈済抗体	6 mL	48,000	要MW処理
医薬品	抗デスミンモノクローナル抗体	422011	希釈済抗体	6 mL	38,000	
	抗ケラチン/サイトケラチンモノクローナル抗体(AE1,AE3)	412811	希釈済抗体	6 mL	30,000	要AC処理
医薬品	抗上皮膜抗原モノクローナル抗体	422021	希釈済抗体	6 mL	30,000	
医薬品	抗ビメンチンモノクローナル抗体	422101	希釈済抗体	6 mL	38,000	

免疫組織化学染色システム Thermo Fisher Scientific Inc. 製品

	品名	コード	希釈済抗体	包装	価格(円)	備考
	抗カルレチニンポリクローナル抗体	08-1211	希釈済抗体	6 mL	48,000	要AC処理

MW: マイクロウェーブ、AC: オートクレーブ、\*1: 免疫組織化学染色における希釈倍率

医薬品: 体外診断用医薬品

価格はメーカー希望小売価格で表示しております。  
なお、この価格には、消費税は含まれておりません。

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  
TEL. 03(3248)2208 FAX. 03(3248)2243

関西支所 〒530-0043  
大阪市北区天満1-3-21  
TEL. 06(6357)2128 FAX. 06(6357)2330

学術問合せ TEL. 03(3248)2208 FAX. 03(3248)2243

ホームページ <http://www.nichirei.co.jp/bio/>

