

15-18 悪性胸膜中皮腫の診断精度の向上及び

治療法に関する研究

主任研究者 産業医学総合研究所 森永 謙二

研究成果の要旨

過去7年間(1995～2002年)の病理例についてアンケート調査を行い、悪性中皮腫648例について回答を得た。そのうち、126例(45施設)の組織ブロックを用いてSAB法による免疫組織化学染色を実施、うち11例(8.7%)については悪性中皮腫でないと判断された。上皮型中皮腫と腺癌との鑑別にはCEA, calretinin, WT-1の組み合わせ、反応性中皮細胞増生との鑑別にはEMA, p53, desminの組み合わせ、肉腫型中皮腫と肉腫との鑑別にはcalretinin, cytokeratin(AE1/AE又はCAM5.2)の組み合わせが有用と思われた。体腔液細胞診検体についても、同様の検討を行った。悪性中皮腫の診断精度の向上の一環として中皮腫パネルを開催し、17例について種々の免疫組織化学染色を単一施設で実施、これらの結果を加えて検討した。外科療法については、肺胸膜全摘出術に化学療法と放射線療法を同時併用した集学的治療と、姑息的なタルクの腔内散布による胸膜癒着効果と抗腫瘍効果を検討した。悪性胸膜中皮腫21例について、in vitro 抗癌剤感受性試験を施行し、各種抗癌剤の感受性頻度を調べた結果、CDDPと新規抗癌剤では希望がもてる結果がえられたものの、非小細胞肺癌に比べて化学療法に抵抗性であることが示された。日本の悪性胸膜中皮腫におけるSV40の関与については35例中2例にSV40 TagのDNA配列を認めたのみであった。

研究者所属施設および職名

研究者名	所属施設及び職名	分担研究課題
森永 謙二	産業医学総合研究所 部長	悪性胸膜中皮腫の診断精度の向上及び罹患動向に関する研究
井内 康輝	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授	悪性胸膜中皮腫の形態診断と分子生学的性状に関する研究
別所 昭宏	国立病院機構四国がんセンター 医員	悪性胸膜中皮腫の化学療法に関する研究
奥村 栄	癌研究会附属病院 医長	悪性胸膜中皮腫の外科療法に関する研究
東山 聖彦	大阪府立成人病センター 部長	悪性胸膜中皮腫に対する in vitro 抗癌剤感受性試験の臨床応用について
中野喜久雄	国立病院機構呉医療センター 医長	悪性胸膜中皮腫に対する集学的治療(胸膜肺全摘術 + 同時放射線化学療法)の研究
青江 啓介	国立病院機構山陽病院 医長	日本の悪性胸膜中皮腫におけるSV40関与に関する検討
亀井 敏昭	山口県立中央病院 部長	体腔液(胸水)細胞診での悪性中皮腫診断の向上に関する研究

総括研究報告

1 研究目的

悪性胸膜中皮腫は現在のところ発生頻度は低いものの、全国の人口動態統計によると平成7(1995)年の死

亡数は275人であったが、平成15(2003)年には566人と倍増している。人口動態統計では部位不明の中皮腫

も平成15年の死亡数205人と中皮腫(全部位)の23.3%を占めている。我が国では1970年代の石綿消費量の増加から、将来の中皮腫の増加が懸念されている。本研究の目的は、全国中皮腫パネルを開催し、種々の免疫組織化学染色の結果の組み合わせを検討し、悪性中皮腫の診断精度の向上を図ることを目的とする。また早期診断のひとつとしての体腔液細胞診に、種々の免疫組織化学染色を用いて有用かどうかを検討する。また、これまでの治療方法及び治療成績を明らかにし、手術の適応、術式の選択や補助療法の適応、及び全身化学療法の有効性を評価し、全国規模の共同臨床試験を行う基盤を整備することにある。

2 研究成果

1) 欧米(イギリス, ドイツ, フランス, イタリア, スウェーデン, アメリカ)の石綿消費量・輸入量 x (kg/人口/年)と中皮腫死亡率 y (対人口100万)の相関は $y=8.913x-5.4702$ であり、日本の2010年には年間の悪性胸膜死亡数は1000例を上回ることが推測されるが、部位不明の中皮腫の扱いなど、さらに詳細な検討が必要である。

2) 悪性胸膜中皮腫の発症要因として欧米ではアスベスト(石綿)以外にSV40の関与も疑われている。3病院で1982年から2002年までに生検、手術の行なわれた35例(男32、女3)の悪性中皮腫(上皮型12、二相型9、肉腫型14)の組織を使用した。TaqManプローブによりSV40特異的なreal time PCRを用いてSV40のTag配列の有無を検討した。その結果、35例中2例においてSV40 TagのDNA配列が認められた。検体のQRはそれぞれ36.0と4.9で、陽性対照のQRは199であった。1例が二相型、もう1例は上皮型であった。次にSV40 Tagの発現を免疫組織染色で検討したところ、陽性対照が細胞質および細胞膜にびまん性に染色されているのに対し、35例全例陰性を示した。この結果は「run-hit theory」として理解することができる。このことから考えると、SV40 DNAの検出はSV40感染の痕跡であって、ウイルス活性を示すSV40の存在を示すものではない。もう1つの可能性として、免疫組織染色とPCR法の感度の違いが考えられる。つまり、SV40を検出する方法としては、非常に鋭敏なreal time PCR法比べて免疫組織染色は感度が低い可能性がある。今回の検討で、日本人においてはSV40感染の頻度は低いこと、また出現頻度の低さから日本人の悪性胸膜中皮腫においてはその発症に大きな関与はしていないと推測される。

3) 平成15年度に行った全国の医療機関の病理医に対する

アンケート調査によって、各施設における悪性中皮腫の診断数とその手順についての実情を把握したが、診断方法として免疫組織化学的染色が未だ十分に利用されていないことが判明したので、全国の医療機関の病理医に対して中皮腫の組織ブロックの借用を依頼し、借用が可能であった126例(45施設)を対象として、calretinin, WT-1, Cytokeratin-multi, Cytokeratin(CAM5.2), Cytokeratin 5/6, Vimentin, Thrombomodulin, Mesothelin, CEA, CA19-9, CA-125, Desmin, α -SMA, S-100p, CD34, CD68, p53, Ki-67の抗体を用いてSAB法によって免疫組織化学的染色を行った。その結果、11例(8.7%)は悪性中皮腫ではないと判断した。その内訳は、反応性の中皮細胞過形成4例、癌腫4例、急性心外膜炎1例、肉腫1例、癌肉腫1例である。従って、悪性中皮腫として以下の分析を行った例は115例(男89例、女25、不明1)である。発生部位は胸膜97例、腹膜12例、心膜3例、精巣鞘膜2例、不明2例であり、1例は胸膜・心膜のいずれの原発か決まられていない。H&E染色所見及び上記の免疫組織化学的染色による組織型診断は、上皮型71例(61.7%)、肉腫型24例(20.9%)、二相型20例(17.4%)である。免疫組織化学的染色の判定にあたっては、上皮型、肉腫型と二相型を上皮様部分と肉腫様部分に分けて判定し、評価方法としては、(-):全く陰性、(+):腫瘍細胞の25%未満が陽性、2(+):腫瘍細胞の25~50%が陽性、3(+):腫瘍細胞の50%以上が陽性とした。以上の判定によって各抗体の陽性率を検討した結果から以下のような結論を得た。

(1) 上皮型中皮腫と腺癌との鑑別には、calretinin, WT-1、CEAを組み合わせた染色が有用である。(2) 上皮型中皮腫と反応性中皮細胞増生との鑑別には、EMA、p53、desminを組み合わせた染色が有用である。(3) 肉腫型中皮腫と肉腫との鑑別には、calretinin、cytokeratin (AE1/AE3あるいはCAM5.2)の染色が有用である。

3) 同様の免疫組織化学染色を体腔液細胞診でも有用かどうかを検討した。悪性中皮腫28例(上皮型19例、二相型9例)、腺癌52例の体腔液細胞診検体(エタノール固定塗抹標本)を対象にEnVision法により実施した。悪性中皮腫(28例)での陽性例(陽性率)は、calretinin 28例(100%)、TM 23例(82%)、CK 5/6 21例(75%)、HBME-1 26例(93%)、Ber-EP4 2例(8%)、MOC-31 5例(18%)、EMA 27例(96%)およびm-EMA 26例(93%)で、CEAおよびLeu-M1には全例で陰性であった。腺癌(52例:肺癌18、胃腺癌13、卵巣癌12(漿液性乳頭状腺癌8、明細胞腺癌4)、乳癌(浸潤性乳管癌)4、膀胱癌3、大腸癌2)では、calretinin 9例(17%)、TM 7例(13%)、CK 5/6 23例(44%)、HBME-1 34例(65%)、CEA 40(77%)、

Ber-EP4 38 例 (73%)、MOC-31 46 例 (88%)、Leu-M1 28 例 (54%)、EMA 50 例 (96%) および m-EMA 16 例 (31%) であった。反応性中皮 (20 例) では、calretinin 20 例 (100%)、TM 8 例 (40%)、CK 5/6 18 例 (90%)、HBME-1 20 例 (100%)、EMA 13 例 (65%) および m-EMA 5 例 (25%) で、CEA、Ber-EP4、MOC-31 および Leu-M1 にはいずれも陰性であった。

以上の結果から、(1) 中皮関連マーカーとしては、calretinin が悪性中皮腫および反応性中皮に対する感度および特異度とも高く有用である。(2) TM では悪性中皮腫に対する感度は高いが、反応性中皮に対する感度が 40% と低い点が問題である。(3) CK 5/6 および HBME-1 は特異度が低く有用とはいえない。その他、卵巣癌と悪性中皮腫の鑑別が問題となる場合には、卵巣癌で感度の高い MOC-31 や Ber-EP4 の併用が良い。悪性中皮腫と腺癌および反応性中皮と腺癌の鑑別には、中皮関連マーカーとして calretinin、腺癌マーカーとして、CEA、MOC-31 および Ber-EP4 の組み合わせによる抗体パネルの応用が有用と思われる。一方、悪性中皮腫と反応性中皮の鑑別には m-EMA が有用であるが、特異度にやや問題が残る。4) 悪性中皮腫の診断精度の向上をはかるため、中皮腫パネルを 2 回開催し、17 例について検討した。その結果、昨年度同様、(1) 純粋な上皮型、肉腫型の診断に一致率は比較的高かったが、免疫組織化学染色の結果を加えて判断すると、さらにその一致率は向上した。(2) 低分化の上皮型と肉腫型・二相型の区別は病理医間での不一致は昨年度に比べて低下した。(3) 線維形成型(desmoplastic type)の悪性中皮腫と非腫瘍性の胸膜線維化との鑑別は、少量の生検材料しか与えられない場合、免疫組織化学染色の結果を加味しても診断の一致を得るのは困難であり、最終判断は予後の結果に依拠せざるを得ないと判断された事例もあった。

5) 悪性胸膜中皮腫の外科療法については、胸膜肺全摘術、胸膜切除+剥皮術、胸膜癒着術などが用いられているが、それぞれ単独での延命効果は明らかでなく、現時点での最善の方法は、早期例を対象にした複数の治療法を併用した集学的治療と、進行例に対す QOL を考慮した症状緩和・腫瘍量の減少を目的とした治療法である。

胸膜肺全摘術後に cisplatin 6mg/m² 連日と vindesine 3mg/m² 毎週投与での化学療法と三次元原体照射による放射線療法 50Gy との同時併用療法を、3 例 (50~66 歳男性、臨床病期は I 期 1、II 期 2、病理病期 (IMIG 分類) は T2N0M0、T3N0M0、T3N2M0、上皮型 2、二相型 1) に対し施行した。術後の重篤な合併症はなく、同時放射線化学療法での

Grade 3 以上の毒性は好中球減少だけであり、全例認めたが、それに伴う発熱はなかった。その他の毒性は放射線食道炎の Grade 1 が 2 例、食欲低下の Grade 2 が 2 例であり、耐用可能であった。また治療は遅延なく全例完遂でき、再発は症例 1 と症例 2 でそれぞれ術後 12 カ月と 5 カ月にいずれも患側胸郭の照射野外に認めたが、照射野内には再発がなく症例 1 は術後 26 ヶ月生存中である。症例 3 は全ての胸腔が照射野に含まれ、かつ Dose-volume histogram での制限を設定した三次元放射線治療計画を立てた。その結果、患側胸郭での再発はなかったが、術後 9 ヶ月で対側胸腔内へ浸潤した。以上のことから、悪性胸膜中皮腫の根治治療は局所制御が重要であり、特に集学的治療での放射線治療は綿密な三次元放射線治療計画が必要と考えられた。

他の 1 施設では 5 例の悪性胸膜中皮腫に対してタルクの胸腔内散布を施行し、胸膜癒着効果と抗腫瘍効果を臨床的・画像診断学的に検討した。胸水貯留防止における短期効果 (3 ヶ月) は 4 例に見られたが、施行後 6 ヶ月以上生存した 4 例における長期癒着効果は 2 例のみであった。腫瘍制御効果は 1 例に見られている。

6) 悪性胸膜中皮腫 24 例について collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST) による抗癌剤感受性試験を行った結果、21 例 (88%) で CD-DST 法が成功した。各種抗癌剤の感受性頻度は、cisplatin (CDDP): 5/20 (25%)、carboplatin: 2/18 (11%)、adriamycin (ADR): 1/14 (7%)、etoposide: 2/12 (17%)、mitomycin: 1/13 (8%)、vindesine: 1/12 (8%)、5-fluorouracil: 0/11 (0%)、gemcitabine (GEM): 3/8 (38%)、vinorelbine: 1/5 (20%)、taxotere (TXT): 3/6 (50%) であり、CDDP と新規抗癌剤 (GEM, TXT) で感受性ありの症例頻度が若干高かったが、非小細胞肺癌での多くの薬剤が 20-30% の感受性を示したとと比較すると、悪性胸膜中皮腫ではその頻度が 10% 以下にとどまる薬剤がほとんどであった。このことは、悪性胸膜中皮腫が化学療法に極めて抵抗性があることが in vitro の結果からも示されていると考えられる。

化学療法に温熱 (43°C) を加えた in vitro 温熱抗癌剤感受性試験も行い、MPM に対する局所温熱化療との関係についても検討を加えた。43°C-CD-DST 施行症例 14 例では、加熱効果により、CDDP では平均 1.1 倍、CBDCA では平均 1.2 倍の抗腫瘍効果増大を示した。これら 14 例に対し術後胸腔内温熱化療を施行し、43°C in vitro 感受性あり 4 例となし 10 例を局所無増悪生存 (Kaplan-Meier 法) で検討すると、術後 6 ヶ月は 100% と 60%、MST は 12 ヶ月と 8 ヶ月となり、統計学的には有意ではないが前者で良好な局所

制御を得ることができた(p=0.19)。

7) 現在まで進行悪性胸膜中皮腫に対して様々な化学療法が試みられてきたが、長期生存を期待できるような治療法はまだ確立されていないのが現状である。悪性胸膜中皮腫の化学療法は単剤または多剤併用で行われるが、奏効率は10～30%程度に留まっており、併用化学療法が単剤化学療法よりも優れているという明らかな証拠はない。欧米では vinorelbine の臨床第Ⅱ相試験で悪性胸膜中皮腫に対して 21%の奏効率を示したことから、vinorelbine と MVP(mytomicin + vinblastine + cisplatin) と BSC(best supportive care)とを比較する大規模な臨床第Ⅲ相試験が進行中である。北欧(スウェーデン、ノルウェー、デンマーク)では gemcitabine + carboplatin + liposomized doxorubicine (Caelyx)の第Ⅱ相試験が進行中である。ドイツの臨床第Ⅱ相試験で gemcitabine は悪性胸膜中皮腫に対して 31%の奏効率が報告されており、cisplatin との併用療法では 15-48%の奏効率が報告されている。米国において進行中の比較試験において cisplatin+gemcitabine を標準治療群とした、比較試験も進行中である。gemcitabine と vinorelbine の2剤はお互いに作用機序が異なり、毒性プロファイルが重ならないこと、また投与が簡便であることより両剤の併用はプラチナ系抗癌剤を含まない併用化学療法として注目されている。現在までに報告されている進行非小細胞肺癌に対する gemcitabine+ vinorelbine 併用化学療法の、主な毒性は血液毒性であるが許容できる範囲内であり、cisplatin 併用化学療法に比して軽い傾向にある。以上の背景をもとに進行性悪性胸膜中皮腫に対して gemcitabine+ vinorelbine 併用療法の臨床第Ⅱ相試験の実施マニュアル(試案)を作成した。

これまでの化学療法と今春から開始される CDDP + pemetrexed の臨床試験との比較が課題になる。

3 倫理面への配慮

免疫組織化学染色の実施及び中皮腫パネルを実施する際の病理標本(ブロック、体腔液細胞診検体)については、個人識別コードを用い、患者同定に関わる個人情報はない。個人情報は、個々の研究データとは別に保管し、漏洩することがないように保管者を定め、厳重に保管している。遺伝子検索を実施する際には、厚生労働省・文部科学省の定めるところの遺伝子解析に関する倫理指針に基づいて行う。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Morinaga K., Country report - Japan. Proceedings of the European Asbestos Conference 2003 : 101-104, SLIC, 2004
2. Li L., Morinaga K., et al., Cohort studies on cancer mortality among workers exposed only chrysotile asbestos: a meta-analysis. Biomed Environ Sci 17 : 459-468, 2004
3. 李魯, 森永謙二, 他, 単純接触温石綿人員癌症死亡隊列研究の荟萃分析. 中華預防医学雑誌 38(1):39-41, 2004
4. Inai K., et al., Mesothelioma, World Health Organization Classification of Tumours, Pathology & Genetics, Tumours of the lung, pleura, thymus and heart :125-144, IARC press, 2004
5. Awaya H., Inai K., et al., Inactivation of the p16 gene by hypermethylation and loss of heterozygosity in adenocarcinoma of the lung. Pathol Inter 54:486-489, 2004
6. Awaya H., Inai K., et al., Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 in atypical adenomatous hyperplasia, bronchioloalveolar carcinoma, adenocarcinoma with mixed subtypes, and mucinous bronchioloalveolar carcinoma of the lung. Am J Clin Pathol 121:644-653, 2004
7. Furukawa O., Inai K., et al., Aberrant methylation of p14^{ARF}, p15^{INK4b} and p16^{INK4a} gene and location of the primary site in pulmonary squamous cell carcinoma. Pathol Inter 54:549-555, 2004
8. Awaya H., Inai K., et al., Loss of expression of E-cadherin and β -catenin is associated with progression of pulmonary adenocarcinoma. Pathol Inter 55:14-18, 2005
9. Hiraki A., Bessho A., et al., Hypercalcemia-leukocytosis syndrome associated with lung cancer. Lung Cancer. 2004 Mar 43(3):301-307, 2004
10. Kozuka T., Bessho A., et al., Peripheral blood circulating immature cell counts predict CD34+ cell yields in G-CSF-induced PBPC mobilization in healthy donors. Transfusion. 2004 Apr 44(4):526-532, 2004
11. Okita R., Bessho A., et al., Multiple ground-glass opacity in metastasis of malignant melanoma diagnosed by lung biopsy. Ann Thorac Surg. 2005 Jan 79(1):e1-2, 2005

12. Higashiyama M., et al., Pulmonary middle lobe fixation using TachoComb in patients undergoing right upper lobectomy with complete oblique fissure. Interactive Cardiovasc Thorac Surg 3:107-109, 2004
13. Aoe K., et al., Cisplatin down-regulates topoisomerase I activity in lung cancer cell lines. Anticancer Res 24:3893-3898, 2004
14. Umemori Y., Aoe K., et al., Primary choriocarcinoma of the lung: Case Report and Review of the Literature. Anticancer Res 24:1905-1910, 2004
15. Aoe K., et al., Thrombocytosis as useful prognostic indicator in patients with lung cancer. Respiration 71:170-173, 2004
16. Aoe K., et al., Soluble receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo Cells (RCAS1) in pleural fluid: A potential diagnostic marker for malignant pleural effusion. Chest 126:1195-1197, 2004
17. Hiraki A., Aoe K., et al., High frequency of allele-specific down-regulation of HLA class I expression in lung cancer cell lines. Anticancer Res 24:1525-1528, 2004
18. Hiraki A., Aoe K., et al., Comparison of six biologic markers for diagnoses of tuberculous pleuritis. Chest 125:987-989, 2004

日本語論文

1. 岸本卓巳, 森永謙二, 石綿の健康障害. 産業医学ジャーナル 26(2) : 5-11, 2004
2. 森永謙二, 石綿問題にどう取り組むか. 産業医学プラザ 7 : 1-8, 2004
3. 森永謙二, 中皮腫の疫学. 臨床と病理 27(7) : 660-666, 2004
4. 森永謙二, 職業性ばく露の機会. (改訂新版) 職業性石綿ばく露と石綿関連疾患—基礎知識と労災補償. (森永謙二編) : 43-59, 三信図書, 2005
5. 森永謙二, 他, 石綿の健康障害の歴史. (改訂新版) 職業性石綿ばく露と石綿関連疾患—基礎知識と労災補償. (森永謙二編) : 105-122, 三信図書, 2005
6. 森永謙二, 疫学からみた石綿関連疾患. (改訂新版) 職業性石綿ばく露と石綿関連疾患—基礎知識と労災補償. (森永謙二編) : 123-159, 三信図書, 2005
7. 藤原寛, 森永謙二, 他, 中皮腫症例 その4 石筆使用によって石綿ばく露を受けたと考えられる心膜中皮腫. (改訂新版) 職業性石綿ばく露と石綿関連疾患—基礎知識と労災補償. (森永謙二編) : 340-345, 三信図書, 2005
8. 井内康輝, 中皮腫 (良性・悪性). 腫瘍鑑別診断アトラス. 肺. (下里幸雄、井内康輝編) : 195-210, 2004
9. 井内康輝, 中皮腫の病理診断のクルー—線維形成型中皮腫 desmoplastic mesotheliomaと線維性胸膜炎の鑑別診断. 肺癌診療二頁の秘訣. (藤村重文編) : 128-129, 金原出版, 2004
10. 井内康輝, 中皮腫の病理. 病理と臨床. 22 : 681-686
11. 井内康輝, 病理からみた石綿関連疾患. (改訂新版) 職業性石綿ばく露と石綿関連疾患—基礎知識と労災補償. (森永謙二編) : 237-264, 三信図書, 2005
12. 児玉 憲, 東山聖彦, 他, 肺癌の標準手術 肺区域切除・楔状切除. 外科治療 90:316-324, 2004
13. 東山聖彦, 他, 大腸癌肺転移に対する外科治療: 手術の適応、工夫と成績について, 臨床消化器内科 20:199-206, 2005
14. 中野喜久雄, 他, 胸膜肺全摘出術後に片側胸郭への同時放射線化学療法を行った悪性胸膜中皮腫の2例. 肺癌 44:779-784, 2004
15. 亀井敏昭, 他, 悪性中皮腫の体腔液細胞診 —中皮腫細胞の特徴と反応性中皮や腺癌との鑑別を主に—病理と臨床 22(7) : 693-700, 文光堂, 2004
16. 村上知之, 亀井敏昭, 他, 心膜、腹膜、および精巣鞘膜発生の中皮腫—病理と臨床 22(7) : 701-707, 文光堂, 2004
17. 亀井敏昭, 特集: 術中体腔洗浄細胞診 1. 術中体腔洗浄細胞診 —総論— Medical Technology 32(11) : 1122-1124, 医歯薬出版, 2004
18. 渋谷秀美, 亀井敏昭, 特集: 術中体腔洗浄細胞診 2. 標本作製 Medical Technology 32(11) : 1125-1132, 医歯薬出版, 2004