

## 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

過去に職業上の石綿曝露歴が明らかな悪性胸膜中皮腫 188 例の平均曝露期間は 20 年(1.5-50.2)、症状確認時年齢は 62 歳(30-95)、平均潜伏期間は 39 年(11.5-70.8)であった。肉腫型中皮腫と二相型中皮腫(このうち肉腫型を示す部分を対象とする)と対照として外科的に切除された肉腫について種々の免疫組織化学的染色を行った結果、CAM5.2 と AE1/AE3 の感度、特異度が高いことが分かった。体腔液細胞診検体についても、中皮腫と腺癌及び反応性中皮との鑑別に有用な免疫染色について検討した結果、カルレチニンが中皮マーカーとして、CEA, MOC31, BerEP4 の併用が重要であることがわかった。また反応性中皮との鑑別の補助には EMA が有用であることが示唆された。胸水中の可溶性 RCAS1 濃度は肺がん比べて有意に低く、RCAS1 免疫組織染色陰性例は陽性例に比べて予後が悪かった。治療については 3 剤(シスプラチン/ゲムシタビン/ナバルピン)併用化学療法、新規化学療法(シスプラチン+葉酸拮抗剤)、胸膜外肺全摘術の治療成績を検討している。前年度までに行った 3 回の中皮腫パネルに引き続いて第 4 回のパネルを開催し 6 例について、臨床歴及び病理所見を詳細に検討して診断の妥当性を討論した。この中で 2 例は比較的良好な経過を示す例であり、組織型、進展の程度、治療の内容について興味深い内容を示す例であった。

#### 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	(独)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 悪性胸膜中皮腫の診断、治療、予後推測に有用な因子の追究 悪性胸膜中皮腫の効果的な化学療法に関する検討
井内 康輝	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授	悪性胸膜中皮腫に対するシスプラチン/ゲムシタビン/ナバルピン併用化学療法の抗腫瘍効果と安全性に関する研究
樋田 豊明	愛知県がんセンター 部長	悪性胸膜中皮腫の臨床的ならびに生物学的予後因子に関する研究
丸山 理一郎	国立病院機構九州がんセンター 医員	悪性胸膜中皮腫の外科治療
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化学療法の検討
東山 聖彦 (班友)	大阪府立成人病センター 部長	悪性胸膜中皮腫における Osteopontin 発現の意義の検討
湯峯 克也	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 医師	悪性胸膜中皮腫における Osteopontin 発現の意義の検討 体腔液細胞診における悪性中皮腫診断の精度向上に関する研究
青江 啓介	国立病院機構山陽病院 医長	
亀井 敏昭	山口県立総合医療センター 部長	

## 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16(2004)年には647人(男516、女131)と、10年間に男性で2.6倍、女性で1.8倍に増加している。我が国では1960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、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 研究方法

## 1) 罹患(死亡)の動向

診断精度の確かな職業性石綿曝露歴のある事例について、潜伏期間を調べ、肺癌のそれと比較した。

過去の人口動態死亡統計を吟味しつつ、死亡動向を観察した。

## 2) 診断精度の向上に関する検討

前年度までに行った3回の中皮腫パネルに引き続いて第4回のパネル(臨床病理医を中心に呼吸器内科・外科医、放射線科医、疫学者で構成)を開催し、臨床歴及び病理所見を詳細に検討して診断の妥当性を討論した。

悪性胸膜中皮腫の診断に有用と思われる免疫組織化学的染色については、昨年度は上皮型中皮腫と腺癌との鑑別、上皮型中皮腫と反応性中皮細胞増生との鑑別について検討したので、今年度は肉腫型中皮腫について他疾患との鑑別について詳細に検討した。用いる抗体は、calretinin, CAM5.2, AE1/AE3, WT1, Mesothelin, EMA, thrombomodulin, desmin,  $\alpha$ -SMA, S-100p, CD34, KP-1とし、陽性の程度は0-3の4段階でスコア化した(0:全く陰性、1:1-25%、2:26-50%、3:51%以上の腫瘍細胞が陽性)。

体腔液細胞診における免疫組織化学検索の有用性については悪性中皮腫、腺癌、及び反応性中皮のエタノール固定塗沫標本を用いて、calretinin, cytokeratin 5/6 (CK 5/6)、HBME1, thrombomodulin (TM)、CEA、Ber-EP4、MOC31、LeuM1 および EMA に対する免疫組織化学的検索を

EnVision法で施行し、比較検討した。なおEMAについては細胞膜に強調される陽性像をm-EMAとして別に判定した。また悪性中皮腫の体腔液検体にてしばしばオレンジG好性細胞を認めることから、この細胞の性格と出現頻度について検討した。

## 3) 治療法に関する研究

腫瘍抗原 Receptor-binding cancer antigen expressed on Siso cells 1 (RCAS1)の免疫組織染色結果が予後のマーカーとして使えるかどうかを検討した。

悪性胸膜中皮腫培養株の樹立を行い、COX-2 選択的阻害剤の効果について予備的検討を行った。また、悪性胸膜中皮腫に対する薬剤の増殖抑制効果について、in vitroにてMTTアッセイ法を用いて検討した。外科切除悪性胸膜中皮腫組織を用いたin vitro抗癌剤感受性試験collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST)を導入し、各種抗癌剤のin vitro感受性頻度を検討した。

内科的治療については、レトロスペクティブに検討するとともに、現在進行中のシスプラチン/ゲムシタビン/ビノレルビンによる3剤併用化学療法についても検討した。

## 3 研究成果

1) 過去に石綿曝露歴が明らかな(職業上)悪性胸膜中皮腫188例の平均曝露期間は20年(1.5-50.2)、症状確認時年齢は62歳(30-95)、平均潜伏期間は39年(11.5-70.8)であった。

過去10年間の男女比は、全部位で3.0倍であるが、胸膜3.7倍、腹膜1.5倍、心膜2.0倍、その他2.5倍、部位不明2.4倍であった。死亡統計で問題になるのは、まず第一に部位不明(原発部位記載なし)の件数が多いことである。過去10年間において1,703(男1,198、女505)と、同期間の全部位の中皮腫7,004(男5,235、女1,769)の実に24.3%(男22.9%、女28.5%)を占める。胸膜中皮腫の推移をしてみる。1958年から1967年の間は我が国ではICD7が採用され、悪性胸膜中皮腫は胸膜原発悪性腫瘍に含まれ、年間3-9人であり、非常にまれな悪性腫瘍であること、また増加傾向は見られてない。1978年から採用されたICD9によると、1978年では62人(男42、女20)で、その後徐々に増加傾向がみられる。その間(1968-1977年)の推移は不明であるが、この時期に増加が徐々に始まったものと推測されるが、最近の急増は石綿使用量の急増が1960年代であることと一致する。

2) 6例について、臨床歴及び病理所見を詳細に検討して診断の妥当性を討論した。この中で2例は比較的良好的経過を示す例であり、組織型、進展の程度、治療の内容について興味深い内容を示す例であった。また1例は13年前に胸膜中皮腫と診断されていたが、今回の再発腫瘍について免疫組織化学的検討を行うと中皮腫の診断が妥当でないことが判明した。

全国28施設の協力をえて収集した肉腫型中皮腫24例と二相型中皮腫20例(このうち肉腫型を示す部分を対象とする)、計44例(男38、女5、不明1)、対照は広島大学病院で外科的に切除された肉腫47例(男28、女19、悪性線維性組織球腫16、平滑筋肉腫8、悪性神経鞘腫瘍7、脂肪肉腫4、デスモイド4例、線維肉腫2例、ユーイング肉腫2例、その他4例)を用い、7種類の免疫組織化学的染色抗体について肉腫型中皮腫の診断における感度と特異度をみると、CAM5.2とAE1/AE3の感度、特異度が高く、両者の組み合わせで肉腫型中皮腫と肉腫を鑑別すると91%の正診率が得られた。

体腔液細胞診における免疫組織化学検索の有用性については、悪性中皮腫31例(上皮型22例、二相型9例)、腺癌60例および反応性中皮21例を対象に検討した。その結果、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100%、特異度85%で高く有用であった。thrombomodulinはcalretininと同等の特異度を示したが、感度が84%とやや低く、反応性中皮に対する感度が43%と低かった。CK 5/6やHBME-1は特異度が低く有用とはいえない。また、腺癌関連マーカーとしては、MOC31(90%)、CEA(77%)、Ber-EP4(77%)が、腺癌に対する感度が高かった。CEAは腺癌に対する特異度が100%であり、中皮腫に対する陰性マーカーとしての有用性が確認されたものの、特に卵巣や乳腺原発の腺癌に対する感度がそれぞれ29%、50%と低いことに注意が必要である。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MOC31(100%)、Ber-EP4(86%)の併用が肝要であることが明らかとなった。ただし乳癌に感度が高い腺癌マーカーの開発が今後の課題である。悪性中皮腫と反応性中皮の鑑別には、EMAの染色態度を考慮し、細胞膜に強調される陽性像(m-EMA)の感度90%、(EMA 97%)、特異度76%(EMA 33%)であり有用性が期待された。MPM20例を含む様々な疾患での体腔液検体のオレンジG好性細胞の出現率について検討した結果、オレンジG好性細胞の出現が最も目立つ検体は悪性中皮腫であり、体腔液検体を用いた診断の一助になる可能性が見いだされた。

3) 悪性中皮腫における腫瘍抗原 Receptor-binding cancer antigen expressed on Siso cells 1 (RCAS1)の発現の臨床的意義と胸水中の可溶性RCAS1について検討した結果では、38例中34例(90%)でRCAS1の発現が認められ、組織型別では、上皮型で79%、二相型、肉腫型はそれぞれ、91%、100%であった。RCAS1の発現と性別、年齢、組織型、臨床病期の間には有意の関連は認められなかった。生存期間の検討では、他の癌種においてはRCAS1陽性例の予後が不良となることが多いが、今回の悪性中皮腫症例ではRCAS1陰性群の生存期間がRCAS1陽性群に比べ有意に不良であった(4.3ヶ月 vs. 13.0ヶ月)。

悪性胸膜中皮腫細胞株3株の樹立に成功した。これを用い、COX-2選択的阻害剤の効果について予備的検討を行い、COX-2選択的阻害剤による増殖抑制効果を現在、観察中である。悪性胸膜中皮腫32検体のCD-DSTを行い、その内4検体が既に化学療法既治療(導入化学療法施行症例)の検体で、導入化療施行効果は、PR2例、SD1例、PD1例で、PR症例2例では、既治療薬剤の*in vitro*感受性はborderlineの感受性を示し、SD症例の1例も同様に投与された薬剤は*in vitro*でも比較的感受性良好(borderline)を示した。一方、既治療にてPD症例では、用いた薬剤はresistantであった。この結果は、既治療の薬剤の臨床効果を概ね反映しており、化学療法未施行症例の悪性胸膜中皮腫組織を用いたCD-DSTの結果と同様に、術後の化療や再発時の化療を行う際の薬剤選択に有用な情報を提供するものと考えられた。

多施設から収集した悪性胸膜中皮腫54例(年齢中央値69才、男女比5.7:1、PS 0/1は21例/29例、組織型は上皮型22例、非上皮型26例、不明6例)の診断日を起点としてKaplan-Meier法で背景因子による生存曲線を求めた。そのうち予後良好の背景因子は年齢70才未満( $P=0.0337$ )、受診から悪性腫瘍診断までの期間が2ヶ月以内( $P=0.0028$ )、治療施行( $P=0.0268$ )、上皮型( $P=0.0407$ )であった。生検標本での腫瘍壊死による生存曲線では、壊死が無い群のMSTは15ヶ月で、有る群の7ヶ月に比べ予後は良好であった( $P=0.0077$ )。単変量解析で有意差のあった年齢、受診から悪性腫瘍診断までの期間、治療、EORTC予後点数、腫瘍壊死について、比例ハザードモデルによる多変量解析を行い、腫瘍壊死は独立した予後因子であり( $P=0.0349$ 、ハザード比10.4、95%信頼区間1.2-90.9)、独立した生物学的予後因子になると考えられた。過去5年間に単一施設で悪性胸膜中皮腫と診断され、内科的治療を施行した43歳から86歳まで(中央値67歳)の50例(男44、女6)を対象に、これ

をレトロスペクティブに検討した結果では、初診日から確定診断までの日数が平均して、80.4日間、確定診断から治療までの平均日数は43.2日間であった。具体的な治療方法として、抗癌剤のGEM+VNRが18人、CBDCA+CPT-11が8人、CDDP+ADRが5人、VNR単剤が3人CDDP+ADR+CPA・CDDP+DTX+CPA・GEM単剤がそれぞれ1人ずつ、ピシバニール等による癒着術のみが5人、放射線治療など対症療法が8人であった。治療効果は、全例でみるとCRが0人、PRが7人、SDが29人、PDが14人で、奏効率は14.0%であった。これを抗癌剤使用例だけでみると、SDが18人、PDが12人で、奏効率は18.9%となる。PR症例の内訳をみるとCDDP+ADRが5例中3例、GEM+VNRが16例中2例、CDDP+ADR+CPAが1例中1例、CBDCA+CPT-11が1例中1例であった。全50例中、抗癌剤を使用したのは37例で、奏効率は14.0%、MSTは342日間であった。

新規化学療法（シスプラチン+葉酸拮抗剤）を悪性胸膜中皮腫6症例に対して実施している。

#### 4 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の際の病理標本（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。治療方法に関しては、患者、家族へ病名を告知した上で、現状の治療法の限界ならびに化学療法の重篤な合併症と毒性の出現について十分に説明し、書面で承諾を得る。

#### 研究成果の刊行発表

##### 外国語論文

1. Fujiwara, H., Morinaga, K., Inai, K., et al., An Autopsy case of primary pericardial mesothelioma in arc cutter exposed to asbestos through talc pencils. *Ind Health* 43(2):346-50, 2005
2. Morinaga, K., et al., Asbestos and the compensation: the experience of Japan. *Int Labor Brief* 3(10):9-14, 2005
3. Suzuki, T., Hida, T., Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol* 23:2513-2520, 2005
4. Mitsudomi, T., Hida, T., et al., Establishment and characterization of four malignant pleural

mesothelioma cell lines from Japanese patients. *Cancer Sci*, (in press)

5. Maruyama, R., et al., Triplet chemotherapy with cisplatin, gemcitabine and vinorelbine for malignant pleural mesothelioma. *Jpn J Clin Oncol* 35:433-438., 2005
6. Hiraki A, Aoe K., Kamei T., et al., Expression of the tumor-associated antigen RCAS1 and its soluble protein in pleural fluid in malignant mesothelioma. *Oncol. Rep*, 14: 357-362, 2005.

##### 日本語論文

1. 森永謙二、石綿. 予防医学事典. 松島綱治ら(編)、朝倉書店、東京、pp336-8、2005
2. 森永謙二、石綿関連疾患-予防・診断・労災補償(第三版). 産業医学振興財団、東京、pp29-41, 60-63、2005
3. 森永謙二、いま、なぜアスベスト問題なのか. アスベストの職業ばく露と環境ばく露. アスベスト汚染と健康被害. 森永謙二(編)、日本評論社、東京、pp1-13, 43-63、2005
4. 森永謙二、石綿関連疾患の疫学. *Mebio* 23(3) : 12-20, 2006
5. 森永謙二、他、アスベストはどんな事業場、どんな場所使われてきたか. アスベスト関連疾患日常診療ガイド、労働者健康福祉機構(編)、労働調査会、東京、pp14-23、2006
6. 森永謙二、石綿の人体への影響. *空気清浄* 43(5):17-21, 2006
7. 森永謙二、石綿による健康障害. *ビル管理* (112): 46-53, 2006
8. 森永謙二、石綿による健康障害、pp90-116、なぜアスベストは危険なのか、中央労働災害防止協会(編)、中央労働災害防止協会、東京、pp90-116、2006
9. 井内康輝、アスベストの毒性とメカニズム. アスベスト汚染と健康被害. 森永謙二(編)、日本評論社、東京 pp87-100、2005
10. 井内康輝、中皮腫の鑑別診断. 呼吸器診療のコツと落とし穴. 工藤翔二編、東京、pp138-9、2005
11. 井内康輝、胸膜中皮腫の病理診断-鑑別に有用な免疫組織科学の進歩. MOOK肺癌の臨床2004-2005. 加藤治文他(監修)、東京、pp. 81-88、2005
12. 井内康輝、中皮腫. 石綿関連疾患-予防・診断・労災補償(第三版)、産業医学振興財団、東京、pp86-95、2005
13. 井内康輝、悪性と誤りやすい良性疾患、良性と誤りやすい悪性腫瘍、9. 胸膜：病理と臨床、第24巻増刊号(印刷中)
14. 丸山理一郎、他、悪性胸膜中皮腫の治療. MOOK『肺癌の臨床 2004-2005 疫学・病理・発見・診断・治療』、(in press)
15. 丸山理一郎、悪性胸膜中皮腫：病期による治療方針と予後. *THE LUNG perspectives*、(in press)
16. 亀井敏昭、悪性中皮腫の体腔液細胞診. *Nichirei Focus Rep* 1:1-5、2005