

表3 DNAプロモーター領域のメチル化についての文献のまとめ

報告者	方法	遺伝子	対象とした中皮腫組織・細胞(数)
Murthy SS, 2000 ¹³⁾	Southern blot	GPC3	細胞株 (22)
Toyooka S, 2001 ¹⁴⁾	MSP	RASSF1A, RAR β , CDH13, GSTP1, MGMT, p16, APC	凍結組織 (66)・細胞株 (6)
Toyooka S, 2002 ¹⁵⁾	MSP	RASSF1A, RAR β , CDH13, GSTP1, MGMT, p16, APC	細胞株 (1)
Hirao T, 2002 ¹⁶⁾	MSP	p16, p14	凍結組織 (45)
Wong L, 2002 ¹⁷⁾	MSP	p16	パラフィン包埋組織 (7)・凍結組織 (4)・細胞株 (10)
Lee AY, 2004 ¹⁸⁾	MSP	SFRP1, SFRP4, SFRP5	凍結組織 (21)・細胞株 (2)
Suzuki M, 2005 ¹⁹⁾	MSP	DeR1, DRM/Gremlin, RRAD, DCR2, HPP1, CyclinD2, RASSF1A, HIC-1, RIZ1, CRBP1, TMS1, NORE1A	凍結組織 (63)・細胞株 (6)
Tsou JA, 2005 ²⁰⁾	MethyLight	MTHFR, MGMT, RASSF1, PGR, CALCA, PTGS2, MYOD1, ESRI, CDH1, ESR2, APC, TIMP3, CDKN2A, GSTP1	凍結組織 (6)・細胞株 (10)
He B, 2005 ²¹⁾	MSP	SFRP4	細胞株 (1)
Batra S, 2006 ²²⁾	MSP	WIF-1	凍結組織 (12)・細胞株 (4)
Fischer JR, 2006 ²³⁾	MSP	APC1A, APC1B, RASSF1A, DAPK, E-cadherin, FHIT, p16, p14, RAR β	血清 DNA (43)
Tomii K, 2006 ²⁴⁾	MSP	IGFBP-3	凍結組織 (56)・細胞株 (5)
Szlosarek PW, 2006 ²⁵⁾	MSP	AS	細胞株 (5)
Pu RT, 2007 ²⁶⁾	Real-time MSP	RAR β 2, TERT, CDKN2A, GPC3, CCND2	パラフィン包埋組織 (41)
Tsou JA, 2007 ²⁷⁾	MethyLight	APC, ATM, CDH1, CDH13, CDKN2A, CDKN2B, CDX2, CHFR, CYP1B1, ESRI, HMGAI, HOXA1, LZTS1, MGMT, MTIA, MT2A, OPCML, PGR, PTEN, RASSF1, SFRP1, SFRP4, SFRP5, SLC6A20, SOCS4, SYK, TWIST1, VHL	凍結組織 (52)
Destro A, 2007 ²⁸⁾	MSP	p15, p16, RASSF1A, Nore1A	パラフィン包埋組織 (79)

4 中皮腫におけるDNAプロモーター領域のメチル化

中皮腫のDNAプロモーター領域のメチル化の報告は、2000年以降では数論文に限られている(表3)。それら論文のほとんどでは、方法としてmethylation-specific PCR (MSP)法を用いているが、MSP法は定量性が乏しく、結果の判定が困難な場合があることから、2005年頃より、PCRとTaqManプローブを用いるMethyLight法が用いられるようになった^{20,27)}。研究の標的となる遺伝子としては、RASSF1Aのプロモーター領域のメチル化を対象としている論文が多い。Toyookaら^{14,15)}は66例の中皮腫と40例の肺腺癌を対象とし、前者では後者と比較して、RASSF1A (33% vs 43%)とGSTP1 (5% vs 8%)以外の、p16 (2% vs 30%: $p<0.01$)、RAR β (10% vs 30%: $p=0.02$)、APC (0% vs 55%: $p<0.01$)、CDH13 (8% vs 45%: $p<0.01$)、MGMT (3% vs 20%: $p<0.01$)のメチル化の頻度が有意に低いことを報告している。加えて、上皮型中皮腫では肉腫型中皮腫と比較してRASSF1A (35% vs 0%: $p=0.047$)のメチル化の頻度が有意に高いこと、さらに、肺腺癌ではSV40のゲノムシークエンスを認める例はなく、SV40ゲノムシークエンスを見出す中皮腫では見出せない中皮腫と比較して、RASSF1A (48% vs 15%: $p=0.022$)のメチル化の頻度が有意に高いことも報告している。Suzukiら¹⁹⁾は63例の中皮腫凍結組織と6例の中皮腫細胞株を用いて、SV40ゲノムシークエンスを認める中皮腫では認めない中皮腫に比べ、RASSF1A (48% vs 16%: $p=0.007$)、RRAD (71% vs 41%: $p=0.02$)、HPP1 (52% vs 19%: $p=0.009$)、CyclinD2 (52% vs 19%: $p=0.009$)、TMS1 (13% vs 0%: $p=0.05$)のメチル化の頻度が有意に高く、SV40が中皮腫の発生に関与していると述べている。SV40と中皮腫発生との関連については、SV40T抗原は中皮腫細胞において、プロモーター領域のメチル化によりRASSF1Aの発現を抑制し、細胞膜の肝細胞増殖因子(HGF)の受容体であるc-Met、ヒト細胞の形質転換に関与すると考えられるNotch-1、さらにIGF-1R受容体を活性化する。これらの受容体チロシンキナーゼのリン酸化後に、共通のカスケードとしてERKがリン酸化を受けて活性化され、それに引き続き転写因子AP-1が活性化されることにより細胞分裂が促進されると考えられている^{29,30,31)}。

これら遺伝子のプロモーター領域のメチル化のプロファイルが、中皮腫と肺癌の鑑別を行う際に有用か否かの検討も行われている。Tsouら²⁰⁾は、6例の中皮腫と7例の肺腺癌の組織および10例の中皮腫の細胞株を用いてDNAプロモーター領域のメチル化のプロファイリングを行い、中皮腫組織と中皮腫細胞株では、それぞれ肺腺癌と比較して、CDH1 (80% vs 63%: $p=0.02$)、(83% vs 29%: $p=0.003$)のメチル化頻度の有意な増加、APC (40% vs 88%: $p=0.0003$)、(50% vs 100%: $p=0.0003$)のメチル化頻度の有意な減少がみられると報告している。同時に、11例の非腫瘍部肺組織との比較も行い、中皮腫では、RASSF1、PGR1、ESR1、CDH1のメチル化頻度の有意な増加とAPCのメチル化頻度の有意な減少があり、肺腺癌では、ESR1、PGR1、RASSF1のメチル化頻度の有意な増加がみられると報告し、APCとCDH1のメチル化の有無をみるのが中皮腫と肺腺癌の鑑別に有用であるとしている。また、中皮腫と非腫瘍部肺組織および肺腺癌と非腫瘍部肺組織の鑑別には、CDH1、APCに加えてRASSF1、ESR1、PGR1のメチル化の有無をみるのが重要であるとも述べている。さらに、Tsouら²⁷⁾は、52例の中皮腫と38例の非腫瘍部肺組織を対象にして28遺伝子のDNAプロモーター領域のメチル化のプロファイリングを行い、中皮腫では非腫瘍部肺組織と比べて、ESR1 (71% vs 32%: $p=0.0002$)、SLC6A20 (46% vs 10%: $p=0.0022$)、SYK (67% vs 22%: $p=0.0003$)のメチル化頻度の有意な増加がみられるとも報告している²⁷⁾。Tomiiら²³⁾は16例の日本人中皮腫組織と40例のアメリカ人中皮腫組織と比較すると、IGFBP-3 (75% vs 15%: $p<0.0001$)のメチル化は日本人に有意に多いことから、IGFBP-3のメチル化には人種差が関連している可能性があることを推測している。

中皮腫のepigeneticな異常に関する研究報告の多くは、凍結組織、パラフィン包埋組織および細胞株を使用しているが、Fischerら²³⁾は、がん由来のDNAを含むと考えられる中皮腫患者の血清(43例)を対象にして9遺伝子のDNAプロモーター領域のメチル化のプロファイリングを行い、RAR β 、DAPK、RASSF1Aの3遺伝子にメチル化を認めた症例は、9遺伝子のどれか一つあるいはメチル化のなかった症例と比較して、生存期間が有意に短いとし、これらの遺伝子のメチル化の検討は予後推測に役立つと報告している。

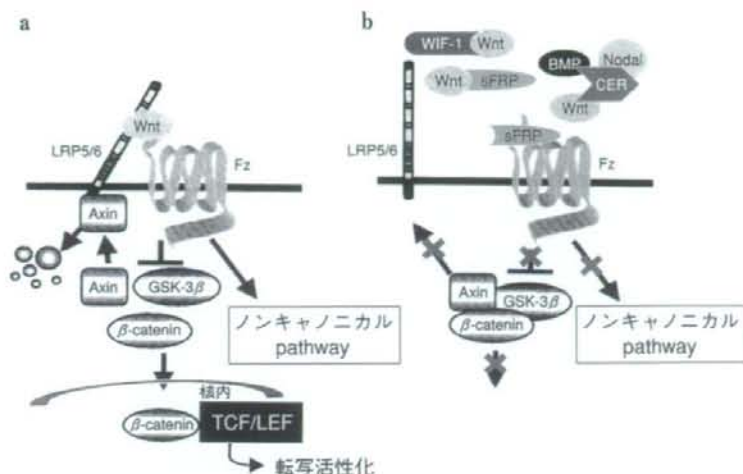


図2 中皮腫におけるWntシグナル経路の役割 (文献32より翻訳・改変)

- a : 中皮腫においては、 β -catenin自体のリン酸化を妨げる変異、あるいはAxinの変異などによって β -catenin蛋白が蓄積して核へ移行し、 β -catenin-TCF転写活性が高まる。
- b : 正常細胞において、増殖の必要がないときにはWntシグナルはSFRP, WIF-1によって制御されている。 β -cateninはAPC/Axin/GSK3 β 複合体によってリン酸化され、ユビキチン化を受ける。そのため β -cateninの核への移行は起きず、TCF転写活性は抑制されている。

5 中皮腫におけるWnt経路の異常

大腸癌などでしばしばみられるWnt経路の異常には、epigeneticな異常も関与している。Wntの負の調節因子であるSFRP (secreted frizzled-related protein), WIF-1 (wnt inhibitory factor-1)が、中皮腫において高率に、プロモーター領域のメチル化により不活性化されることが報告されている(図2)^{18,21,22,32)}。SFRPが発現していない中皮腫細胞は脱メチル化によりSFRPが発現されることにより、TCF/ β -cateninの転写活性を抑制できるだけでなく、アポトーシスが誘導される^{18,21)}。

われわれは、24例の中皮腫、12例の非腫瘍肺組織のパラフィン包埋組織よりMSPを用いたDNAのプロモーター領域のメチル化の検討を行った。その結果、中皮腫では非腫瘍部肺組織と比較して、WIF-1 (81% vs 25%; $p=0.0028$)のメチル化頻度の有意な増加がみられ、メチル化を認めた中皮腫の65%で免疫組織化学的にWIF-1蛋白の発現が低下していた。これらは、WIF-1のメチル化によりWIF-1がサイレンシングしている可能性を示唆した。

まとめ

中皮腫におけるDNAメチル化異常は、WIF-1, SFRP, RASSF1Aについて高頻度に認められることが報告され、さらに、APC, CDH1のメチル化は肺腺癌との鑑別に、RAR β , DAPK, RASSF1Aのメチル化は予後推測に有用であることが指摘されている。しかしこれらメチル化異常が発がんのどの過程で生じるかなど、今後検討すべきことは多い。われわれはWnt経路に注目し、中皮腫ではWIF-1のメチル化の異常の頻度が高いことを見出し出しているが、中皮腫の早い増殖・進展を説明できるか否かは今後の課題である。

文 献

- 1) Tajima S, Suetake I: Regulation and function of DNA methylation in vertebrates. *J Biochem* 123: 993-999, 1998
- 2) Bird A: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21, 2002
- 3) Jones PA, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet* 3: 415-428, 2002
- 4) 牛島俊和, 大河内江里子, 金田篤志: エピジェネティクス, (佐々木裕之・編), Springer, 東京, 191-201, 2004
- 5) Eden A, Gaudet F, Waghmare A, et al: Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300: 455, 2003
- 6) Cao XX, Mohuiddin I, Ece F, et al: Histone deacetylase inhibitor Down regulation of bcl-xl gene expression leads to apoptotic cell death in mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Bio* 125: 562-568, 2001
- 7) Neuzil J, Swettenham E, Gellert N: Sensitization of mesothelioma to TRAIL apoptosis by inhibition of histone deacetylase: role of Bcl-xL down-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 186-191, 2003
- 8) Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, et al: Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns. *Nature Genet* 24: 132-138, 2000
- 9) Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, et al: A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature Genet* 31: 141-149, 2002
- 10) Feinberg AP, Tycko B: The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2: 143-153, 2004
- 11) Feltus FA, Lee EK, Costello JF, et al: Predicting aberrant CpG island methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12253-12258, 2003
- 12) Frazier ML, Xi L, Zong J, et al: Association of the CpG island methylation phenotype with family history of cancer in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 63: 4805-4808, 2003
- 13) Murthy SS, Shen T, De Rienzo A, et al: Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma. *Oncogene* 19: 410-416, 2000
- 14) Toyooka S, Pass HI, Shivapurkar N, et al: Aberrant methylation and simian virus 40 tag sequences in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 61: 5727-5730, 2001
- 15) Toyooka S, Carbone M, Toyooka KO, et al: Progressive aberrant methylation of the RASSF1A gene in simian virus 40 infected human mesothelial cells. *Oncogene* 21: 4340-4344, 2002
- 16) Hirao T, Bueno R, Chen CJ, et al: Alterations of the p16INK4 locus in human malignant mesothelial tumors. *Carcinogenesis* 23: 1127-1130, 2002
- 17) Wong L, Zhou J, Anderson D, et al: Inactivation of p16INK4a expression in malignant mesothelioma by methylation. *Lung Cancer* 38: 131-136, 2002
- 18) Lee AY, He B, You L, et al: Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* 23: 6672-6676, 2004
- 19) Suzuki M, Toyooka S, Shivapurkar N, et al: Aberrant methylation profile of human malignant mesothelioma and its relationship to SV40 infection. *Oncogene* 24: 1302-1308, 2005
- 20) Tsou JA, Shen LY, Siegmund KD, et al: Distinct DNA methylation profiles in malignant mesothelioma, lung adenocarcinoma, and non-tumor lung. *Lung Cancer* 47: 193-204, 2005
- 21) He B, Lee AY, Dadfarman S, et al: Secreted frizzled-related protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in beta-catenin-deficient human mesothelioma cells. *Cancer Res* 65: 743-748, 2005
- 22) Batra S, Shi Y, Kuchenbecker KM, et al: Wnt inhibitory factor-1, a Wnt antagonist, is silenced by promoter hypermethylation in malignant pleural mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 1228-1232, 2006
- 23) Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, et al: Promoter methylation of RASSF1A, RARBeta and DAPK predict poor prognosis of patients with malignant mesothelioma. *Lung Cancer* 54: 109-116, 2006
- 24) Tomii K, Tsukuda K, Toyooka S, et al: Aberrant promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in human cancers. *Int J Cancer* 120: 566-573, 2007
- 25) Szlosarek PW, Klabatsa A, Pallaska A, et al: In vivo loss of expression of argininosuccinate synthetase in malignant pleural mesothelioma is a biomarker for susceptibility to arginine depletion. *Clin Cancer Res* 12: 7126-7131, 2006
- 26) Pu RT, Sheng ZM, Michael CW, et al: Methylation profiling of mesothelioma using real-time methylation-specific PCR: a pilot study. *Diagn Cytopathol* 135: 498-502, 2007
- 27) Tsou JA, Galler JS, Wali A, et al: DNA methylation profile of 28 potential marker loci in malignant mesothelioma. *Lung Cancer* 58: 220-230, 2007

- 28) Destro A, Ceresoli GL, Baryshnikova E, et al: Gene methylation in pleural mesothelioma: Correlations with clinicopathological features and patient's follow-up. *Lung Cancer*, 2007 (in press)
- 29) Mossman BT, Gruenert DC: SV40, growth factors, and mesothelioma: another piece of the puzzle. *Am J Respir Cell Mol Bio* 126: 167-170, 2002
- 30) Gazdar AF, Butel JS, Carbone M: SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* 2: 957-964
- 31) Carbone M, Kratzke RA, Testa JR: The pathogenesis of mesothelioma. *Semin Onco* 129: 2-17, 2002
- 32) Kawano Y, Kypta R: Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. *J Cell Sci* 6: 2627-2634, 2003

巻頭言

がんを見つけないのが理想のがん検診



日本がん検診・診断学会
 理事 金子 昌弘
 (国立がんセンター中央病院)

2年ほど前になりますが、朝日新聞の「私の視点」の欄に、「がん検診に予防の観点も盛り込め」と題して投稿し、昨年にはそれを更に解説する形で、日本CT検診学会の機関誌に「究極の肺がん検診」と題して拙文を發表しました。

簡単にこれらを要約致しますと、「がん検診は、後遺症の残る治療が行われる第一段階、低侵襲な治療で後遺症無く完治できる第二段階、軽い治療や指導などで発がんを予防できる第三段階へと進歩し、胃がんを例にとると、胃切除は第一段階、内視鏡治療は第二段階、PG法でのハイリスクの拾い上げとピロリ菌の除菌は第三段階になり、肺では未だ大半が第一段階だが、CTの導入で前がん状態の異形腺腫様過形成(AAH)の発見も可能になり、またCT画像を示しての禁煙指導の効果も大きく、禁煙治療が保険適応になったこともあり、第三段階への道が開けてきた。」という内容でした。

消化管の内視鏡治療、子宮頸部の円錐切除、乳房温存治療など多くの検診で第二段階に進みつつあり、子宮頸がんでのビールの関与の証明や、大腸でもポリープの切除でがん化が予防できるようになりましたし、乳がんや前立腺がんに対しても体内のホルモン環境の調整などで発がんの抑制が可能になるのではないかと考えられ、胃がん肺がんをはじめ各分野で第三段階が見えつつあります。

「私の視点」にも書きましたが、検診受診者の伸び悩みの理由の一つに「がんが見つかるとう手術を受けるのが怖くていやだ」という考えもあるように思われます。インフルエンザの予防注射のように、「検診を受けていればがんにならない」という時代が来れば、がん検診の受診者も飛躍的に増加するのでは無いでしょうか。

医療経済的にみても、がん患者そのものを減らす方が早期発見・治療よりメリットは大きいと思われれますので、完成したがんだけを発見するのではなく、ハイリスク症例や前癌状態を抽出し治療することにより、発がんを予防できる検診の確立を目指して、新たな検診技術や治療方法の開発を行うべきと考えます。

また、その場合には検診の効果も死亡数の減少で評価するのではなく、がんそのものの発生の減少で評価する時代が来るかも知れません。

がんの発見率の高さを誇るのではなく、低さを誇るがん検診の時代の来ることを願っております。

症例報告の書き方について

金子昌弘

国立がんセンター中央病院内視鏡部



The Journal of the Japan Society for Respiratory Endoscopy

気管支学

第30巻 第3号 2008年5月

症例報告の書き方について

国立がんセンター中央病院内視鏡部 金子昌弘

気管支学 30 巻 3 号の掲載論文に関する論評を依頼されました。一般に「論評」或いは「Editorial」と呼ばれるような記事は、原著論文に対して行われるのが通例と思われませんが、今回は該当する原著論文がなく、全て症例報告のみでした。症例報告に対する論評というのあまり例がないようですので、今回は本号に掲載の論文を中心に、過去に私が査読した症例報告の感想も含めて、よい症例報告の書き方を、いくつかの側面から検討してみたいと思います。

はじめに述べたいことは、「何のためにその症例を報告するのか」という点を十分に意識してから書き始めることが重要という点です。症例報告は単に珍しい症例を経験したと自慢するのが目的ではありません。その症例から学んだ経験を一人でも多くの医師に共有してもらい、次に同じような症例を経験した場合に、迅速に診断し適切な治療が行えるようにするためです。症例報告を書く場合、あるいはそれを指導する場合に、常にその点を念頭におくことが肝要と思われれます。

過去の症例報告を検討すると次の3種類ほどに分類できると思われますので、書こうとする症例がどの範疇に入るのかを意識することが必要です。

第一は、全く今までに誰も経験したことがないか、あっても非常に少ない疾患で、本号では橋詰らの気管支粘液腺腫の症例が該当すると思われれます。

第二は、複数の疾患が合併している場合で、本号では妻鹿らのサルコイド反応を伴った気管支内過誤腫の報告と佐藤らの扁平上皮癌と特発性肺線維症の報告が該当すると思われれます。

第三は、疾患自体は珍しくないが、特異な経過により診断や治療に難渋した例や、新たな診断方法や治療法を試みた例などで、本号では福元らの気管支カルチノイド、坂口らの咽頭後隙血腫、白田らの感染性肺嚢胞に対する内視鏡での観察と治療、柴田らの胸腔鏡によるサルコイドーシス胸膜炎の診断の報告が該当すると思われれます。

第一のグループの場合、実際にその疾患として良いのかどうかの判断が重要ですので、診断の決め手になる病理組織学的な記載や写真の提示が重要で、臨床経過や生活習慣、治療経過についても詳述する必要があります。考察はその疾患や類似疾患の過去の報告との比較を中心に、当該症例がその疾患で間違いのないのか、あるいは全く類似疾患の報告がないことを証明するとともに、今後同様の症例に遭遇した場合に、どのようにしたら迅速かつ適確に診断治療を行うことができるかが中心になります。

著者連絡先：金子昌弘，国立がんセンター中央病院内視鏡部，〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1 (tel: 03-3542-2511, fax: 03-3542-2628 (直), e-mail: mhkaneko@ncc.go.jp).

© 2008 The Japan Society for Respiratory Endoscopy

橋詰論文の場合、枚数の制限もありますが、この症例が、間違いなく Bronchial Mucous Gland Adenoma であることの考察が、もう少しあっても良かったかと思えます。

第二の場合は、単に偶然複数の疾患が併存していたと言うだけでは症例報告の対象にはならないと思われませんが、両者が共通の原因で起こったり、一方が他の原因であったり、あるいは両者の合併により診断や治療に苦慮した場合に報告の対象になると思われます。

妻鹿論文の場合、一読すると過誤腫自体が1カ月間で急速に増大しサルコイド反応も伴っていたように理解され、極めて希有な症例と思われませんが、詳細に読むと、増大した部分は必ずしも全て過誤腫ではなく、この間に針生検なども行われたことを考慮すると、何らかの外的な刺激も関与していたのではないかとも思われ、この点の考察が不足しているように思われました。

佐藤論文では扁平上皮癌も肺線維症もいずれも喫煙と密接な関連があり、両者の合併自体は珍しくはありませんが、化学療法後にインフルエンザに罹患し急激な転帰をたどった点で、今後類似疾患に遭遇した場合の啓発の意義は大きいものと思われました。最近では患者、家族の意思を尊重するという意識が高まってきており、それは非常に重要なことではありますが、いくら要望があっても「だめなものだめ」と説得することも必要と思われます。

第三の場合も、どの程度をもって特殊な経過とするか、あるいは新しい技術の導入とするかは、その時代の検査技術や、学会の構成メンバーによっても変わって来ることがあると思われ、他のグループでは珍しくなくても、本学会の会員にとっては新鮮な事例もありますので、本学会誌では類似例の報告が少なく、今後は本学会の会員の間でも普及すべき検査などであれば積極的に報告してもらいたいと思います。

福元論文では、気管支に顔を出すカルチノイド自体は珍しくありませんが、腫瘍全体が気管支の内腔のみに鑄型状に発育し、しかもその形態がPETでも証明でき、末梢の陰影も単なる粘液栓ではないことが十分に示唆された点は新しい知見と思われました。

坂口論文で紹介されている疾患は、一般的には耳鼻咽喉科の扱う疾患と思われ、呼吸器内科、外科との境界領域の疾患であり、本学会の会員も今後遭遇する機会も増えるかと思えます。耳鼻科、内科という枠に囚われることなく、周辺臓器の知識も積極的に取り入れることは非常に重要と思われます。

白田論文と柴田論文はいずれも胸腔鏡に関するもので、最近では胸腔鏡を診断目的で使用する呼吸器内科医師も増えてきておりますので、このような使い方のあることを積極的に紹介して頂くのは意義のあることと思われ、白田論文では嚢胞の内部を細径の内視鏡で観察し適確なドレナージを行い、治療を早めることができたと思われ、柴田論文においても所見の強い部分から適確に標本を採取することで正確な診断に結びつけることが可能になり、有効であったと思われ、

今回掲載の論文に関しては、いずれも共著者の協力や、複数の査読者による十分な指導が行われていると思われ問題はありますが、査読前の論文を拝見すると色々問題のある報告も見受けられます。

症例報告は、若い臨床医にとって初めての投稿論文であることも少なくありません。内容が良ければそれで充分という考えではなく、文章の書き方、論文の構成、文献の引用の仕方、参考文献の書き方に至るまで、隅々まで十分に注意の行き届いた論文の作成を心がけて頂きたいと思えます。

しばしば経験する問題を指摘しますので、今後症例報告を行う場合や指導する場合

に参考にして頂けると幸いです。

最もよくある問題は、本質的ではないと思われる部分が長々と書かれていたり、一般の読者が知りたいと思われる経過などが抜け落ちていたりする論文です。病気の診断とは直接関わりがないと思われる治療経過や術式が詳細に記載されている例も散見しますし、治療後数年が経過しているはずなのにその後の経過が記載されていない報告もありました。読者の立場に立って、重要な情報を見極めて過不足なく記載することが必要と思います。

次によくある問題は、考察の部分で関連する論文の紹介が多く、あたかもその疾患の総説かと思われる報告です。確かにいろいろ調べた結果を報告したい気持ちも分かりますが、他の論文の紹介は必要最小限にとどめ、今回の報告例との類似点、相違点を重点的に述べるべきと思います。

さらに、考察に関しての問題点としては、当該症例のどの点が最も報告に値するのかが絞り込めていない報告も見受けられます。この症例から何を学んだのか、新規な点或いは反省すべき点はどこなのか、他の読者に何を伝えたいのかを、一つずつの段落ごとにとまとめて明確に打ち出すことが必要です。

また、本質的な問題ではありませんがワープロでの変換ミス、あるいは参考文献の記載方法のミスが目立つ例も少なくありません。前者に関しては著者以外が目を通すことで防げる問題ですので、これが多い論文は共著者やシニアオーサーのチェックが充分でないと判断されます。後者に関しては事務的な問題ですが、これが守られていないのは投稿規定を十分に読んでいない証拠になります。これらが目立つ論文は、それだけで不採用になる可能性もありますので、このような部分にも注意する習慣をつけることが必要です。

本号の7編の症例報告を中心に、症例報告の目的、症例報告の分類、症例報告記載でのよくある問題点などをまとめてみました。はじめにも述べましたが、症例報告は学会誌投稿への登竜門でもありますので、はじめにきちんとした論文の書き方を身につけることが必要です。また、前述のように症例報告の目的は、同じ経験をできるだけ多くの医師と共有することにより、一人でも多くの患者さんに正しく迅速に診断治療が行えるようにするためです。貴重な症例を経験した医師にとって、症例報告は義務でもあると思いますので、優れた症例報告の積極的な投稿をお待ちしております。

総 説

診断機器の現状と将来の展望 気道領域

金子昌弘, 土田敬明

国立がんセンター中央病院内視鏡部

特集

気管食道領域の診断機器の進歩

総 説

診断機器の現状と将来の展望 気道領域

金子昌弘, 土田敬明

国立がんセンター中央病院内視鏡部

要旨 呼吸器は気管から呼吸細気管支に至る管腔臓器の部分と、肺胞を中心とした実質臓器の部分からなっている。

気管から肺門部までの気道の診断は、ほとんどが電子気管支鏡による肉眼的な観察であるが、自家蛍光 (AFI)、狭帯域観察 (NBI) や、超音波 (EBUS) による診断も一部では行われている。将来的には拡大観察や、光コヒーレント断層 (OCT) での観察などにより、内視鏡的に病理学的な診断が行えるようになることが期待されている。

肺門より末梢の気道の診断に以前は気管支造影が用いられていたが、被検者の負担も多く近年は行われていない。代わって高分解能 CT 画像からの気管支の 3 次元再構成や極細径気管支鏡の開発が行われており、今後の普及が期待されている。

末梢肺野病変の画像診断には高分解能 CT や FDG-PET が用いられ、確定診断には経気管支鏡的生検が行われることが多い。生検器具の誘導に一般には X 線透視が行われているが、最近では CT あるいは超音波ガイド下での生検も行われ、診断率の向上に役立っている。将来的には画像診断と内視鏡の誘導技術の更なる融合がはかられ、微小な異常部位からの確に標本の採取が可能なシステムの構築が望まれている。

キーワード：電子気管支鏡, 自家蛍光, 気管支超音波, バーチャル気管支鏡, CT ガイド気管支鏡

I. はじめに

気道領域の中でわれわれが取り扱うのは、気管から肺胞に至る部分で、この部分は気管から呼吸細気管支に至る気道部分と肺胞を中心とした実質臓器の部分からなっており、前者はさらにⅢ次気管支程度までの肺門部分と、それより末梢の末梢気道部分に分けることができる。

一方、診断機器の面から見ると、内腔を直接観察

する内視鏡と、放射線を中心とした画像診断の機器があり、前述の解剖学的な部位によりこれらが使い分けられ、また場合によっては両者が協力して診断が行われている。

本稿では肺がんの診断を中心に、これらの現状と将来の展望について考察する。

II. 肺門部の診断機器

一般にⅡ次気管支の内腔の太さは 5 mm 程度なので、この付近までは通常の軟性気管支鏡による肉眼での観察や病変部位からの直視下の生検による診断が行われている。

気管支鏡は 1970 年代になり軟性気管支鏡 (気管

別刷請求：〒 104-0045 東京都中央区築地 5-1-1
国立がんセンター中央病院内視鏡部
金子昌弘

支ファイバースコープ)が開発され普及することで、観察範囲も飛躍的に広がり、被験者の苦痛も軽減したことにより、全世界的な普及が始まった¹⁾。

当初はグラスファイバーを通じての観察であったが、最近では先端部分に極小の電荷結合素子 (charged coupled device: CCD) のカメラを組み込んだ電子気管支鏡が普及している²⁾。電子気管支鏡の画像はグラスファイバーを介さず直接内腔の所見を画像化しているため肉眼での観察に匹敵あるいはそれ以上の画像を得ることができるが、外部のプロセッサやモニターも大きく病室などで緊急に行うには適していない場合もある。したがってファイバースコープも光源を手元に組み込むことにより、より小型化し吸引機さえあれば病室でもどこでも手軽に使用できるポータブル気管支ファイバースコープ (多目的気管支鏡) も開発されている²⁾。

画像の電子化は肉眼を越えて観察を可能にしており、蛍光観察、狭帯域画像観察、拡大観察などの方法があり一部では普及し始めている。

蛍光観察は、当初は腫瘍内に多く取り込まれるヘマトポルフィリン誘導体の投与後に、一定の波長のレーザー光を照射し腫瘍から発する蛍光を検知する photodynamic diagnosis: PDD 方式であったが、その後正常気管支粘膜からの自家蛍光を観察する auto fluorescence image: AFI 方式に変わってきた。

PDD の場合、あらかじめ投与する光感受性物質により日光過敏症となることや、特殊な波長のレーザー光の発生装置を必要とするために、レーザー治療である photodynamic therapy: PDT の前に病巣の評価を行う以外にはほとんど用いられることはなくなった³⁾。

AFI の場合は光感受性物質を投与する必要もなく、肉眼では発見できない超早期の病変の検出が可能になってきている。当初は特殊な波長のレーザー光の照射が必要であったが、最新の装置では通常の白色光を、フィルターを通すだけで使用できるようになり、小型の装置で手軽に使用できることから、普及が始まっている⁴⁾。Fig. 1 は AFI の SAFE システムで見た気管分岐部の早期がんの所見で、白色光ではわずかな盛り上がりのように見える部分で、正常部分からの緑色の蛍光が消失しているのが観察できる。高度喫煙者で喀痰細胞診陽性、胸部 X 線および CT で所見を認めない場合などで肺門部の病変

を早期に発見するのに有効である。

狭帯域観察 narrow band image: NBI は、狭帯域光学フィルターを用いて、一部の波長の画像のみを取り出して観察する方式であり、これは粘膜下の微細な血管の描出を可能にするために、病変の深達性の変化の診断や質的な診断に有効と考えられている。消化管ではすでに普及しているが、気道の場合は正面視できる部分が少ないことや、軟骨があるために観察できる部分が限られることもあり、まだまだ普及していない⁵⁾。

拡大観察も消化器、特に大腸鏡の分野ではすでにかなり一般的に行われている。気道についても実験的に行っている施設もあるが、これも呼吸性移動のために密着が困難な点や正面視できる部分が限られるなどの問題点もあり、一般的な普及には至っていない。しかし、今後の機器の改良や生体での染色方法の開発などで普及が期待されている^{5,6)}。

一方気管支壁内の構造や壁外の病変の診断には超音波を利用した、endobronchial ultrasonography: EBUS やレーザー光の反射を利用した optical coherent tomography: OCT による観察も可能になってきている。

EBUS はラジアル型とコンベックス型があり、ラジアル型は通常の気管支鏡の鉗子孔からプローブを挿入して検査することができるが、水で満たしたバルーンを気管支壁に密着させる必要があり、一時的に気道を閉塞させなくてはならない問題があり、主に肺門部早期肺がんの気管支壁内への深達度診断に用いられている⁷⁾。Fig. 2 はラジアル型の装置で観察した気管の横断像で壁の層構造が認められる。

コンベックス型は専用のスコープを使用しなくてはならないが、同時に穿刺細胞診が可能なので気管支壁内に留まらず、気管および気管支壁外のリンパ節の生検も可能になってきた。縦隔内のリンパ節の組織学的な診断には、縦隔鏡や胸腔鏡による生検か気管支鏡または食道鏡を通じての穿刺が行われてきた。前者では大きな組織が採取できるので病理組織学的な検討が可能になるが全身麻酔を必要とし、後者は局所麻酔下に行うことができるが細胞診が中心で、主に X 線透視下に行われてきたが、リンパ節自身を描出することができないという問題があった。

EBUS では針先を確認しながら進めることができ、またリンパ節内や周囲の血管も描出できるの

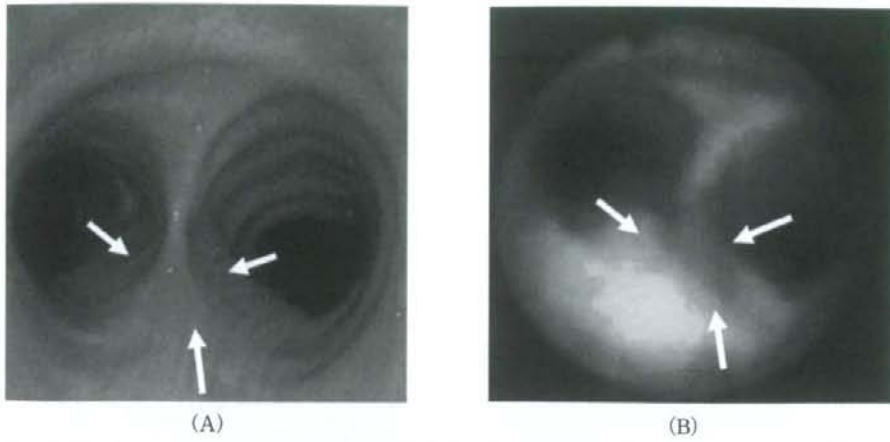


Fig. 1 Early hilar type lung cancer. (A) White light image, (B) Auto fluorescence image : AFI image.

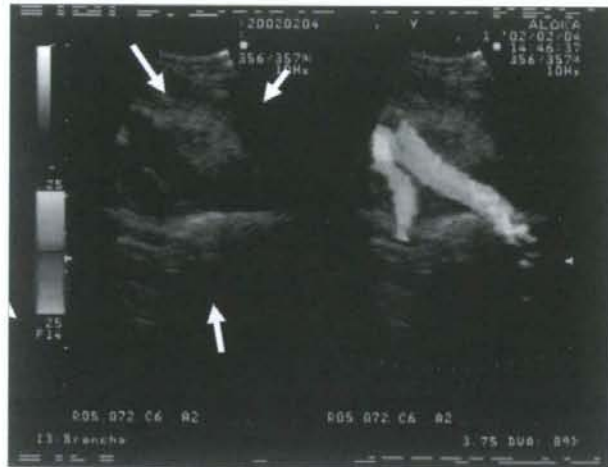


Fig. 3 Endobronchial ultrasonogram : EBUS image of hilar lymph node.

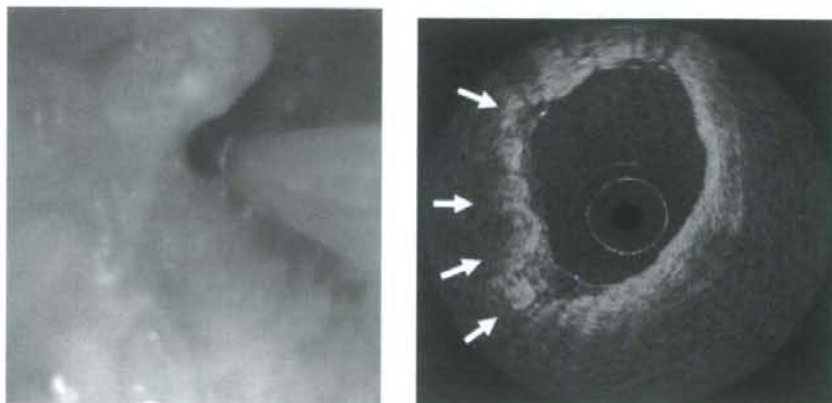


Fig. 4 Optical coherent tomography : OCT image of early hilar type lung cancer.

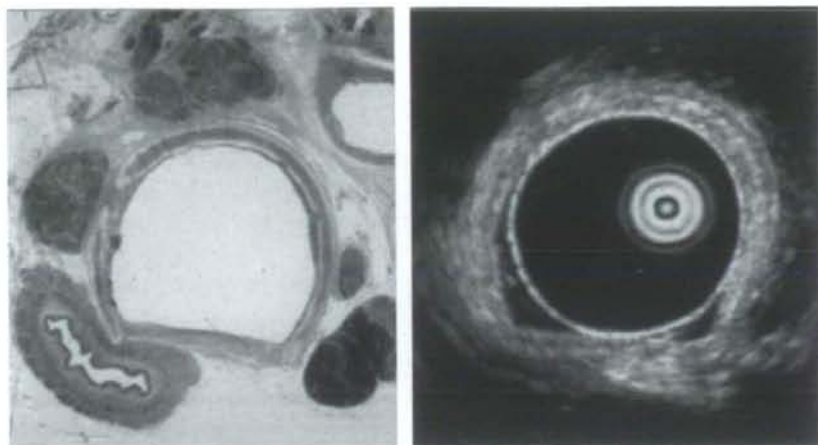


Fig. 2 Endobronchial ultrasonogram : EBUS image of normal trachea.

で、安全で確実な穿刺が可能になり現在急速に広まりつつある⁸⁾。Fig. 3はコンベックス型のEBUSで描出された気管支壁外のリンパ節で、節内の血管も観察可能である。

OCTはラジアル型の超音波の代わりにレーザー光線を用いるもので、超音波のように水の入った袋をふくらませる必要もなく、非接触性に検査でき、超音波より気管支壁内の構造を高解像度に分解して観察することが可能であるが、深達度が低いので気管支壁外の構造までは観察できず使用できる範囲は極めて限定されている。今後AFIとの組み合わせで肺門部早期がんの浸潤範囲の診断に有用になるものと期待されている⁹⁾。Fig. 4はOCTで観察された肺門部早期がんの像で、病変が気管支壁を越えていることが確認できる。

現在気管支内腔の観察方法には各種の方法が開発されそれぞれの利点欠点の分析が行われている。しかしこれらの装置は一般にかなり高価であり、それぞれが大型化している。したがって気管支鏡検査を行う各施設ですべてをそろえることは、物理的にも経済的にも不可能な状態になっている。したがって将来的にはこれらの機能を組み合わせたコンパクトで比較的安価な装置の開発が期待されている。このような装置が普及することで、将来的には疑わしい部分から生検を行わなくても、病変の質的な診断や正確な広がりや深達度の診断が可能になり、最も適切な治療方法が選択できるようになるとと思われる。

III. 末梢気道領域の診断

IV次気管支より末梢の気道の診断に関して、以前はディオノジール等の造影剤を注入しての気管支造影により診断が行われていた。しかしこの検査は被験者の負担が大きいことや、極細気管支鏡の開発で肉眼で確認できるようになったこと、CTの進歩で気管支内腔の拡張や狭窄の程度も測定できるようになってきたので、現在では全く行われなくなった。

CTでの気道の描出に関して一般的には横断像のみで分析が行われているが、最近のマルチスライスCTの進歩で広範囲に0.5 mm程度の薄切画像が得られるようになり、これらを重ね合わせることで、気管支造影あるいは気管支鏡に類似した画像も作成できるようになり、さらにこの部分の診断精度が高まっている。これらは単に形態的な診断だけではなく、末梢病巣の生検のための地図作りとしても極めて重要な役割を担っている¹⁰⁾。

現在CTによる肺がん検診の普及などで、極めて微小な肺野末梢病変が指摘できるようになっているが、その部分まで的確に気管支鏡の鉗子などを誘導し生検することが困難な場合が少なくない。将来は作成された立体的な地図に基づいて鉗子などの生検器具を自動的に病巣まで誘導するシステムの開発も望まれている¹¹⁾。Fig. 5は高精細CT画像から構成された気管支の3D画像で、IV～V次気管支程度までは全自動的に描出が可能になってきている。

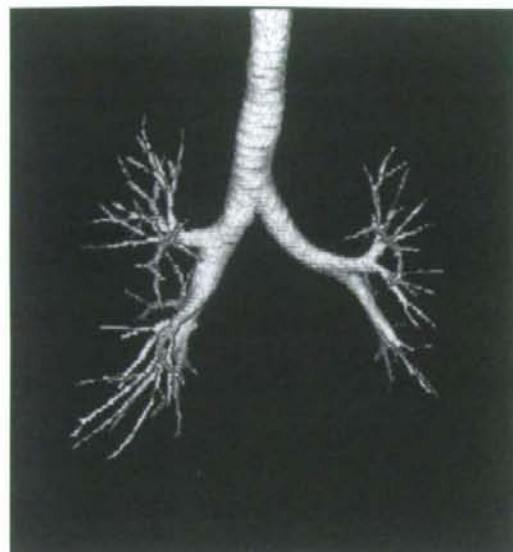


Fig. 5 3D image of bronchus reconstructed from multi-slice CT images.

IV. 肺野領域の診断

呼吸細気管支から肺胞に至る部分は、ガス交換を行う実質臓器の部分であり、肺の中で最も大きな容積をしめ、多くの疾患が存在する部分でもある。この部分の診断には画像的には単純X線写真や高分解能CTの画像が用いられ、最近ではFDG-PETによる分析も行われ、組織学的な診断には気管支鏡での生検や経皮的な針生検あるいは開胸生検が行われている。

しかし2 cm以下の結節に関して、一般には気管支鏡での生検の正診率は低く、針生検や開胸生検が行われることが多い。しかし前者は気胸の合併率が高く、胸壁への腫瘍の播種や空気塞栓などの致命的な合併症も皆無ではない。後者は悪性であった場合にそのまま根治的な治療に移行できるメリットはあるものの、良性であった場合の侵襲が大きすぎるように思われる。

したがって、前述のように経気道的に的確に生検を行うことのできるシステムの構築が望まれている。鉗子の誘導に以前はX線透視が用いられ、X線で見えない病巣に対してはCTでの誘導も行われているが、X線被曝の問題や長時間CT装置を専有してしまうので一般の施設では行いにくい欠点もあった^{10,11)}。

このような問題の解決のために、近年はラジアル型の超音波のプローブを末梢肺野に挿入し観察する方法も行われている。到達部位に制限はあるものの、確実に先端が病巣内に存在することを証明することができ、ある程度の画像診断も可能であることから今後の進歩が期待されている。またさらに部位を確認後にその部位から確実に標本を採取する方法も開発され、末梢部の病変の経気道的な診断率の向上に貢献している¹²⁾。

V. まとめ

診断の進歩は工学的な技術開発に負うところが大半であり、特に最近の電子工学や放射線機器、超音波機器の進歩はめざましいものがあり、さらにそれらのコンピュータ処理技術や組み合わせにより最新の技術が毎年のように生まれてきている。

このような最新の技術の一つの施設ですべてそろえることはあらゆる意味で困難になってきている。それぞれの施設で工学研究者やメーカーの研究者と協力して新たな装置を開発することが大切であるが、それらの装置の特徴を公開し、地域で共有することによりそれぞれの機能を十分に発揮させることが重要と思われる。

文 献

- 1) Ikeda, S.: Atlas of Flexible Bronchofiberscopy, pp.3-12, Igakushoin, Tokyo, 1974.
- 2) 小林寿光: 機器, 日本呼吸器内視鏡学会編, 気管支鏡 臨床医のためのテクニックと画像診断 第2版, pp.1-15, 医学書院, 東京, 2008.
- 3) 中西京子, 大崎能伸, 栗原真紀・他: 光線力学的治療時の蛍光気管支鏡併用の試み, 気管支学, 27: 576-579, 2005.
- 4) 中村治彦: 蛍光気管支鏡, 日本呼吸器内視鏡学会編, 気管支鏡 臨床医のためのテクニックと画像診断 第2版, pp.94-97, 医学書院, 東京, 2008.
- 5) 渋谷 潔, 藤澤武彦: Narrow Band Imaging (NBI) を組み合わせた拡大気管支ビデオスコープおよび高解像度気管支ビデオスコープによる気管支粘膜微小血管の解析, 気管支学, 28: 37-42, 2006.
- 6) 渋谷 潔, 千代雅子, 中島崇裕・他: 拡大気管支ビデオスコープを用いた squamous dysplasia における angiogenesis 解析, 気管支学, 27: 592-595, 2005.
- 7) Kurimoto, N., Murayama, N., Yoshioka, S., et al.: Assessment of usefulness of endobronchial ultrasonography in determination of depth of tracheo-

- bronchial tumor invasion. *Chest*, 115 : 1500-1506, 1999.
- 8) 安福和弘, 千代雅子, 山田義人・他: 肺門・縦隔病変に対する超音波気管支鏡生検法—コンベックス走査式超音波気管支鏡ガイド下生検法の有用性について—, *気管支学*, 27 : 114-120, 2005.
- 9) 長東美貴, 坪井正博, 林 和・他: 気管支切除断端に対する OCT の有用性. *気管支学*, 28 : 214, 2006.
- 10) 小林寿光, 土田敬明, 金子昌弘: CT ガイド下気管支鏡による末梢肺野病変の診断. *気管支学*, 27 : 302-306, 2005.
- 11) 浅野文祐, 松野祥彦, 竹市直子・他: Virtual Bronchoscopy—極細径気管支鏡ナビゲーションとして—. *気管支学*, 24 : 433-438, 2002.
- 12) 菊地英毅, 山崎浩一, 朝比奈肇・他: 肺末梢病変に対するガイドシース併用気管支腔内超音波断層法 (EBUS-GS) の応用. *気管支学*, 27 : 43-49, 2005.

J. Jpn. Bronchoesophagol. Soc., 59 : 439-444, 2008

Current Situation and Future Prospect of Diagnostic Devices Respiratory Field

Masahiro Kaneko, M.D., and Takaaki Tsuchida, M.D.

Department of Endoscopy, National Cancer Center Hospital, Tokyo

The respiratory system consists of the hollow organ from the trachea to the respiratory bronchiole and the parenchyma organ including the alveoli.

Generally, the respiratory tract from the trachea to the hilum of the lung can be macroscopically observed by diagnostic imaging with a video bronchoscope. Diagnoses are occasionally made according to auto fluorescence image (AFI), narrow band image (NBI) or endobronchial ultrasonogram (EBUS). We expect that in the future it will be possible to make pathological diagnoses using endoscopic techniques such as magnification observation and optical coherent tomography (OCT).

Bronchography was formerly used to observe the airways below the hilum of the lung. Recently, it is no longer used for this purpose because of considerable burden on the examinee. In place of this technique, three-dimensional reconstruction of the bronchi based on high-resolution CT imaging and ultra-thin bronchoscopy have been developed. Their widespread use are anticipated in the future.

High-resolution CT imaging and fluorodeoxyglucose positron-emission tomography (FDG-PET) are frequently used for diagnostic imaging of lesions in the peripheral lung field. Trans-bronchial biopsy is commonly adopted to make a definitive diagnosis of such lesions. A fluoroscope is usually used as a guide for the biopsy instrument. Recent introduction of CT and ultrasound guided biopsy has contributed to improvement in diagnostic yield. In the future, hopes focus on further integration of diagnostic imaging with endoscopic guidance technology and establishment of a system enabling adequate sampling from minimal abnormality.

Key words : video flexible bronchoscope, autofluorescence bronchoscopy, endobronchial ultrasonography, virtual bronchoscopy, CT-guided bronchoscopy

Original Article

Immunohistochemical expression of TTF-1 in various cytological subtypes of primary lung adenocarcinoma, with special reference to intratumoral heterogeneity

Akiko M. Maeshima,¹ Mutsuko Omatsu,¹ Koji Tsuta,¹ Hisao Asamura² and Yoshihiro Matsuno^{1*}

¹Clinical Laboratory Division and ²Thoracic Surgery Division, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan

The immunohistochemical expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) was investigated in various cytological subtypes of primary lung adenocarcinoma, with special reference to intratumoral heterogeneity. Three groups were categorized according to cytological subtype: group A, adenocarcinomas with either a Clara cell and/or type II epithelial cell component (Clara/type II) or a mixed Clara/type II and bronchial surface epithelial cell component (BSE) (mCB), in addition to other components; group B, adenocarcinomas with components including either BSE, a goblet cell component (GOB) or a mixed BSE and GOB component (mBG), and lacking Clara/type II or mCB; group C, adenocarcinomas with only a poorly differentiated component (POR). In group A all Clara/type II, mCB, BSE and the majority of POR were TTF-1 positive. In group B the majority of BSE, POR and all GOB were TTF-1 negative. BSE and POR in both groups had a different phenotype, possibly reflecting their different natural history. In group C 80% of cases were TTF-1 positive, suggesting that the majority were derived from group A tumors.

Key words: adenocarcinoma, immunohistochemistry, intratumoral heterogeneity, lung, TTF-1

Thyroid transcription factor (TTF) is a 38 kDa DNA-binding protein containing a homeodomain. It was originally identified in thyroid follicular cells as a regulator of thyroid-specific genes, such as those responsible for the production of thyroglobulin,^{1,2} thyroperoxidase,^{2,3} and thyrotropin receptor.⁴ In addition to thyroid epithelial cells, TTF-1 was subsequently

found in epithelial cells of the respiratory tract, and in areas of the developing brain.^{5,6} In adult lung, TTF-1 is expressed in type II pneumocytes, non-ciliated bronchiolar epithelial cells (Clara cells) and bronchiolar basal cells,⁷ and is responsible for transcriptional activation of surfactant proteins A, B, and C, as well as Clara cell secretory proteins by direct binding to the promoters of these molecules.^{8–11}

Neoplasms of pulmonary origin retain expression of TTF-1, although immunoreactivity varies according to histological tumor type. It has been reported that TTF-1 is expressed in 75–80% of adenocarcinomas^{12–23} and >90% of small cell carcinomas,^{24–26} whereas it is found at very low frequency in squamous cell carcinomas^{14–16,20,21} and large cell carcinomas.^{13,14,16} Previous reports have indicated that its expression does not seem to be closely related to the histological pattern of adenocarcinoma growth, because it has been found in tumors with acinar, papillary, and bronchioloalveolar morphology.^{13,14,16,17,19} However, there is growing evidence that adenocarcinomas with a predominantly mucinous component tend to be TTF-1 negative.^{13,27–29} Particularly, mucinous-type bronchioloalveolar carcinomas, in contrast to non-mucinous bronchioloalveolar carcinomas, tend to be uniformly negative.^{13,27,28} Yatabe *et al.* reported that adenocarcinomas with terminal respiratory unit (TRU) morphology, resembling type II pneumocytes, Clara cells, and/or bronchioles, were frequently (88%) TTF-1 positive, whereas only 25% of adenocarcinomas without TRU morphology expressed TTF-1.²² In contrast, it is noteworthy that there is significant morphological variation in lung adenocarcinoma, not only among tumors, but also within a single tumor. Thus, the relationship between cytological characteristics or histological patterns and TTF-1 expression in adenocarcinoma should be studied in more detail.

In the World Health Organization (WHO) classification, adenocarcinomas are subdivided into bronchioloalveolar carcinoma (non-mucinous type and mucinous type), papillary adenocarcinoma, acinar adenocarcinoma and solid

Correspondence: Yoshihiro Matsuno, MD, Clinical Laboratory Division, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan. Email: ymatsumo@med.hokudai.ac.jp

*Present address: Department of Surgical Pathology, Hokkaido University Hospital, Sapporo, Japan.

Received 16 May 2007. Accepted for publication 2 September 2007.

© 2008 The Authors

Journal compilation © 2008 Japanese Society of Pathology

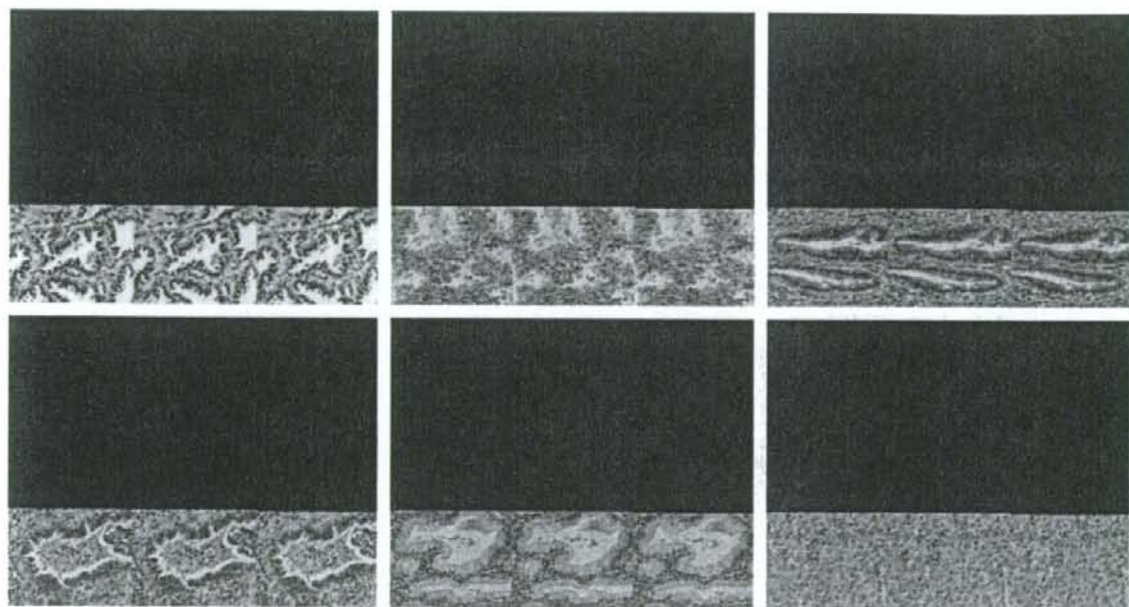


Figure 1 (a) Clara; (b) Type II; (c) bronchial surface epithelial component (BSE); (d) mixed Clara/type II and BSE component (mCB); (e) goblet cell component (GOB); (f) poorly differentiated component (POR) (HE).

adenocarcinoma with mucin, according to structural pattern.³⁰ For cytological types, Shimosato *et al.* followed the original proposal by Kimula³¹ and subclassified adenocarcinoma into six cytological types:³² Clara cell type, type II alveolar epithelial cell type, bronchial surface cell type with little or no mucus production, goblet cell type, bronchial gland cell type, and mixed cell type or intermediate cell type.

In the present study we subdivided adenocarcinomas into the following cytological components by modifying the cytological classification of Shimosato: Clara cell and/or type II alveolar epithelial component, bronchial surface epithelial component, goblet cell component, poorly differentiated component, and mixed types. We examined in more detail the relationship between various cytological subtypes of adenocarcinomas and TTF-1 expression, with special reference to intratumoral heterogeneity, in order to better understand the carcinogenesis and natural history of pulmonary adenocarcinoma.

MATERIALS AND METHODS

Patients and histological evaluation

A total of 779 patients with primary lung adenocarcinomas, who underwent lobectomy between 1998 and 2002 at

the National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan, were analyzed. Resected lung tissues were fixed with 10% formalin for 1 or 2 days, embedded in paraffin and sliced into 4 μ m-thick sections. Histological findings in each case were reviewed independently by at least two pulmonary pathologists (AMM, KT, YM).

Tumor cell morphology

Adding some modification to Kimula's and Shimosato's descriptions, cytological components in each adenocarcinoma were subdivided according to the morphological features of routinely prepared HE-stained paraffin sections as follows: Clara cell component and/or type II alveolar epithelial component (Clara/type II), bronchial surface epithelial component (BSE), goblet cell component (GOB), poorly differentiated component (POR) and mixed types. The Clara cell component was defined by the presence of hobnail-shaped or cuboidal cells with eosinophilic cytoplasm, or columnar cells with an apical snout (Fig. 1a). The type II alveolar epithelial component was defined by cuboidal or low-columnar cells with clear or vacuolated cytoplasm (Fig. 1b). Because these two components often appeared admixed, and could not be distinguished from each other, a single category of Clara/type II was established. BSE was

Table 1 Definition of three groups of lung adenocarcinomas

Group A: Adenocarcinomas with either Clara/type II or mCB, in addition to other components

Group B: Adenocarcinomas with components including either BSE, GOB or mBG, and lacking Clara/type II or mCB

Group C: Adenocarcinomas with only POR

BSE, bronchial surface epithelial component; GOB, goblet cell component; mCB, mixed Clara/type II and BSE component; mBG, mixed BSE and GOB component; POR, poorly differentiated component.

**Figure 2** (a) Clara (bottom), bronchial surface epithelial component (BSE) (left) and poorly differentiated component (POR) (right) in group A tumor. (b) BSE (left), GOB (middle) and POR (right) in group B tumor. (c) Group C tumor (HE).

defined by tall columnar cells with eosinophilic cytoplasm and a smooth luminal surface (Fig. 1c). When a tumor contained areas showing an intimate admixture of Clara/type II- and BSE-type cells, and also admixed with columnar cells indeterminate for Clara/type II- or BSE-type cells, it was judged as having a mixed Clara/type II and BSE component (mCB, Fig. 1d). GOB was defined by tall columnar cells with plump mucinous cytoplasm, a smooth surface and a basally displaced nucleus (Fig. 1e). A component showing a close admixture of BSE- and GOB-type cells, and/or showing cells indistinguishable from either BSE- or GOB-type cells, was described as a mixed BSE and GOB component (mBG). A cytological component composed of poorly differentiated polygonal cells with mucin was defined as POR (Fig. 1f). This component usually had a solid or scirrhous growth pattern.

In each tumor the presence of areas containing each component was described regardless of predominance. Although many adenocarcinomas contained an extensive variety of these components, adenocarcinomas were further categorized into three groups according to their similarities or shared components: group A, adenocarcinomas showing various proportions of areas of either Clara/type II or mCB, in addition to other components (representing tumors with Clara/type II morphology); group B, adenocarcinomas with components including either BSE, GOB or mBG, and lacking Clara/type II or mCB (representing differentiated tumors without Clara/type II morphology); group C, adenocarcinomas with only POR (Table 1, Fig. 2).

Immunohistochemistry

Representative tissue sections from each case were used for immunohistochemistry. TTF-1 antigen was retrieved by autoclave treatment (121°C, 10 min) with pH 6.0 citrate buffer. The standard avidin–biotin–peroxidase complex method was used for immunohistochemical detection after incubation with a monoclonal antibody against TTF-1 (8G7G3/1, NeoMarkers, Fremont, CA, USA). Immunostaining was performed within 1 week of preparation of the tissue slides. Positive nuclear staining of non-neoplastic type II pneumocytes served as an internal control for antigen preservation. The extent of tumor cells with positive nuclear staining was graded using five categories: 0, 0% (negative); 1+, 1–10%; 2+, 11–50%; 3+, 51–90%; 4+, 91–100%.

RESULTS

According to the categorization, the 779 cases analyzed comprised 689 group A adenocarcinomas, 80 group B adenocarcinomas and 10 group C adenocarcinomas. Among them, a sequential series of 147 cases consisting of 104 group A, 33 group B and 10 group C were used for further study. According to the WHO tumor classification,³⁰ 101 of the tumors were diagnosed as adenocarcinomas of mixed subtypes, 31 as bronchioloalveolar carcinomas, 10 as solid adenocarcinomas with mucin, and five as acinar adenocar-