

表3 発生部位ごとの診断カテゴリーの分布

	胸膜		腹膜		心膜		精巣鞘膜		部位不明	
	症例数	(%)	症例数	(%)	症例数	(%)	症例数	(%)	症例数	(%)
1	23	(8)	11	(22)	1	(25)	0	(0)	0	(0)
2	25	(8)	5	(10)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
3	24	(8)	2	(4)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
4	48	(16)	8	(16)	2	(50)	0	(0)	0	(0)
5	186	(61)	24	(48)	1	(25)	1	(100)	2	(100)
総計	306	(100)	50	(100)	4	(100)	1	(100)	2	(100)

表4 性別による診断カテゴリーの分布

	男性		女性	
	症例数	(%)	症例数	(%)
1	18	(6)	17	(27)
2	22	(7)	8	(13)
3	23	(8)	3	(5)
4	49	(16)	9	(14)
5	187	(63)	27	(42)
総計	299	(100)	64	(100)

表5 性別・部位別ごとの診断カテゴリーの分布

	男性				女性			
	胸膜	(%)	腹膜	(%)	胸膜	(%)	腹膜	(%)
1	18	(7)	0	(0)	5	(12)	11	(61)
2	19	(7)	3	(9)	6	(14)	2	(11)
3	22	(8)	1	(3)	2	(5)	1	(6)
4	43	(16)	5	(16)	5	(12)	3	(17)
5	162	(61)	23	(72)	24	(57)	1	(6)
総計	264	(100)	32	(100)	42	(100)	18	(100)

各カテゴリーにおいて、性別を比較したところ、カテゴリー4あるいは5では男女比が5以上であったのに対して、カテゴリー1あるいは2では3以下であった。

考察

中皮腫の鑑別診断を行う上で、注意を要する疾患は胸膜中皮腫と肺癌である。特に肺癌と診断しなければならない偽中皮腫様肺癌、Pleomorphic型肺癌が28例と最も多かった。また、腹膜中皮腫との鑑別上、最も重要な疾患は女性の卵巣癌である。偽中皮腫様肺癌と卵巣癌の診断については、病理診断の際に免疫組織化学染色を行うことが求められる。すなわち、上皮型中皮腫に陽性となるcalretinin, WT-1, cytokeratin5/6, D2-40などが有用であり、肺癌や卵巣癌では陽性となるCEA, TTF-1, MOC-31, Ber-EP4が陰性であることを確認すれば、中皮腫診断は比較的容易である。一方、Pleomorphic型肺癌については、画像上で腫瘍病変の首座が肺野にあるのか胸膜にあるのかに

ついて検討しておくことが重要であり、臨床および画像所見が大きなウエートを持つ。また、胸水や腹水を用いた細胞診では中皮腫細胞に対して、反応性中皮細胞が悪性腫瘍細胞に類似することから鑑別が難しいため、上述の腫瘍組織と同様に適切な免疫組織化学染色を行う必要がある。また、胸・腹水中ヒアルロン酸値も参考にして、慎重な診断を行うことが望まれる。

線維性胸膜炎(良性石綿胸水を含む)は炎症でありながら、中皮腫との鑑別(特にデスマブラスティック型中皮腫)が難しい疾患である。この鑑別には、組織を十分採取して、病理学的に線維性胸膜炎の際の特徴であるZonationなどの所見を見逃さないことである。線維性胸膜炎でも、高齢者の場合には呼吸不全を来して死亡することも稀ではないので、十分留意しておく。一方、腹膜中皮腫の鑑別では、女性の卵巣癌との鑑別には慎重さを要する。免疫組織化学染色でCEAは通常陰性のことが多いため、MOC-31やBer-EP4の陽性所見が鑑別に重要である。

以上の点に留意して、画像上の所見を十分検討し、腫瘍組織を確実に十分量生検して、免疫組織化学的な手法を使用すれば、診断を大きく誤ることはないと思われる。

まとめ

過去の中皮腫の診断においては、その17%は肺癌や卵巣癌等であり中皮腫ではなかった。中皮腫か否か鑑別できない例や判定困難例も中皮腫であるとは診断できなかったことを考慮すると最大26%の誤診の可能性がある。また、悪性腫瘍のみならず、良性疾患である線維性胸膜炎との鑑別も必要なことがわかった。特に女性の腹膜中皮腫の診断には慎重さを要することが示唆された。

【参考文献】

- 1) 井内康輝, 武島幸男, 岸本卓巳, 玄馬顕一, 青江啓介, 藤本伸一, 加藤勝也: 臨床病理学的検討による中皮腫死亡例(平成15~17年)の診断精度の解析—382例の解析結果, 厚生労働科学研究 中皮腫発生に関わる職業性石綿ばく露の研究報告, 50-59, 2008.
- 2) 岸本卓巳, 加藤勝也, 武島幸男, 井内康輝: 胸膜中皮腫の臨床診断の現状と鑑別診断及びその問題点, 胸膜中皮腫 診療ハンドブック, 岸本卓巳 編集, 119-130, 中外医学社, 東京, 2007.
- 3) Kushitani K, Takeshima Y, Amatya VJ, Furonaka O, Sakatani A and Inai K: Immunohistochemical marker panels for distinguishing between

epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Pathol Int* 57: 190-199, 2007.

- 4) Kushitani K, Takeshima Y, Amatya VJ, Furonaka O, Sakatani A and Inai K: Differential diagnosis of sarcomatoid mesothelioma from true sarcoma and sarcomatoid carcinoma using immunohistochemistry. *Pathol Int* 58: 75-83, 2008.

きしもと たくみ	・独立行政法人労働者健康福祉機構 岡山労災病院 内科
いない こうき	・広島大学大学院医歯薬学総合研究科 病態情報医科学講座病理学
たけしま ゆきお	・同上
げんば けんいち	・独立行政法人労働者健康福祉機構 岡山労災病院 呼吸器科
あおえ けいすけ	・独立行政法人国立病院機構 山陽病院第2腫瘍内科
かとう かつや	・岡山大学医学部・歯学部 附属病院放射線科
ふじもと のぶかず	・独立行政法人労働者健康福祉機構 岡山労災病院 呼吸器科

胸膜中皮腫および良性石綿胸水

岸本卓巳

胸膜中皮腫および良性石綿胸水

岸本卓巳*

要 旨

石綿曝露によって発生する胸膜病変である胸膜中皮腫と良性石綿胸水は慎重な鑑別診断が必要である。胸水はともに血性で、細胞成分ではリンパ球有意となる症例が多い。細胞診での鑑別診断率が低いので、胸部単純 X 線画像上腫瘍性胸膜肥厚がない症例には組織学的な確定が必要となる。その際には、胸腔鏡下胸膜生検が有用である。たとえ生検結果で悪性所見が得られなくても、胸膜中皮腫の可能性を否定せず、慎重な経過観察が必要である。

Key words：胸膜中皮腫, 良性石綿胸水, ヒアルロン酸, 可溶性メソテリン, 胸腔鏡下胸膜生検/pleural mesothelioma, benign asbestos pleurisy, hyaluronic acid, soluble mesothelin-related peptides, thoracoscopic pleural biopsy

1 はじめに

胸膜中皮腫の発生が兵庫県尼崎のクボタ周辺の近隣曝露によって発生していることが社会問題化して、中皮腫に対しては労災補償されない症例に対しても救済されることになった。一方、中皮腫と同様に石綿曝露によって発症する良性石綿胸水は同地区からの報告は少ない。そこで、本稿では、胸膜中皮腫と良性石綿胸水の鑑別診断について解説する。

2 胸膜中皮腫

約 80%が職業性石綿曝露によって発生し、家庭内曝露や近隣曝露でも発生しうるが、低

濃度の環境曝露では極めて発症リスクは低い。発生までの潜伏期間は初回曝露から平均 40 年以上を要することが報告されている。

1) 臨床検査データによる鑑別診断

現在、日本には中皮腫診断あるいは臨床経過の指標となる血清マーカーはない。また、胸水中ヒアルロン酸は、100,000 ng/ml 以上を示す症例では診断価値はあるが¹⁾、陽性率は約 40%である。

a. Soluble mesothelin-related peptides (SMRP)

Mesothelin は正常中皮細胞の膜表面に存在する 40 KD の糖蛋白であるが²⁾、その可溶性蛋白のモノクローナル抗体である SMRP¹⁾は中皮腫患者で 87%が陽性を示し、中皮腫以外

Pleural Mesothelioma and Benign Asbestos Pleurisy

Takumi KISHIMOTO*

* Research Center for Asbestos-Related Diseases, Okayama Rosai Hospital, Okayama

* 岡山労災病院石綿関連疾患研究センター (〒702-8055 岡山県岡山市築港緑町 1-10-25)

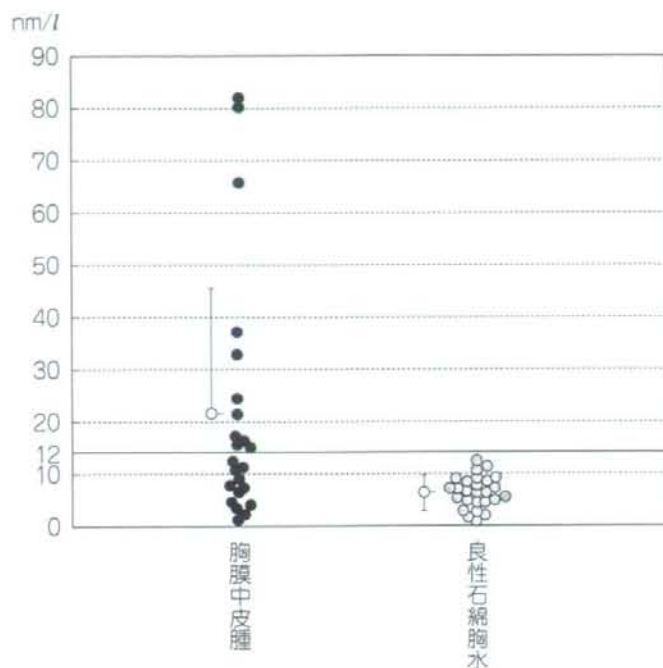


図 1 胸膜中皮腫症例 (23 例) と良性石綿胸水症例 (26 例) における胸水中 SMRP の比較

胸膜中皮腫症例では 20.96 ± 23.99 nm/l, 良性石綿胸水症例では 6.36 ± 2.83 nm/l であった。良性石綿胸水では 12.0 nm/l を超える症例はなかった。

の胸膜疾患, 胸膜以外の肺悪性腫瘍, 胸膜以外の炎症性呼吸器疾患での陽性率は低く, 中皮腫での特異性が高い。Scherpereel ら²⁾は中皮腫, 転移性胸膜炎, 良性石綿胸水を対象として, 血清 SMRP を測定し, 中皮腫では平均 2.05 nm/l で, 転移性胸膜炎や良性石綿胸水に比べて高値を示し, 転移性胸膜炎では 1.85 nm/l, 良性石綿胸水では 0.93 nm/l をカットオフ値にすると, 感度および特異度がよいと報告している。しかし, 組織型別では上皮型では高値を示すが, 肉腫型や II 相型の一部では高値を示さず, 診断的価値が低く, 卵巣癌や膵臓癌でも高値となり, 特異性に乏しいとする報告³⁾もある。

一方, 胸水中 SMRP については, カットオフ値を 10.4 nm/l にすると, 転移性胸膜炎あるいは良性石綿胸水との鑑別の指標となると報告⁴⁾されている。われわれも胸水中 SMRP を測定したが, カットオフ値を 12.0 nm/l にすると, 良性石綿胸水 26 例ではすべて陰性であるが, 中皮腫では 23 例中 11 例 (47.8%) が陽性を示し鑑別に有用であると思われた (図 1)。

b. オステオポンチン

Pass ら⁵⁾は血清オステオポンチンが胸膜中皮腫の場合には 133 ng/ml と石綿曝露者あるいは石綿曝露のない健常者より有意に高く, 48.3 ng/ml をカットオフ値にすると感度が

77.6%, 特異度が 85.5%であったと報告している。しかし, 卵巣癌, 大腸癌, 乳癌などの多数の癌腫に陽性を示すことから転移性胸膜炎との鑑別にはならない³⁾。Hiraki ら⁶⁾は胸膜中皮腫 7 例の胸水中オステオポンチンが 22,692 ng/ml と高値を示し, 11,436 ng/ml をカットオフ値とした場合に非悪性疾患の胸水に比較して, 感度が 100.0%, 特異度が 77.8% であり, 鑑別診断に有用な検査方法であると報告している。しかし, 反応中皮細胞にも発現しており, 良性石綿胸水との鑑別にはならないとの報告もある⁷⁾。

c. ヒアルロン酸

胸水中ヒアルロン酸の場合カットオフ値を 100,000 ng/ml とした場合, 三浦⁸⁾は感度 62%, 特異度 98% と診断価値が高いと報告している。著者⁹⁾の検査結果では, 胸膜中皮腫であると診断した 50 例中 19 例 (38.0%) が 100,000 ng/ml 以上であった。一方, 癌性胸膜炎では 30 例中 1 例 (3.3%) のみであった。その他良性石綿胸水 20 例, 非悪性の胸膜炎 16 例ではすべて 100,000 ng/ml 以下であった。

d. CEA

胸水中あるいは血清 CEA は上昇しないのが悪性中皮腫の特徴であり, また, CEA のカットオフ値を 5.0 ng/ml とした場合は 3.1%の感度で陰性になると報告されており, CEA が 10 ng/ml 以上を呈する場合には腺癌を考慮すべきである。

2) 画像診断

胸膜中皮腫の場合には, 約 80%の症例では胸水貯留を伴う。典型例では胸部 CT 上, 胸腔内に突出する腫瘤陰影, あるいは厚さ 1

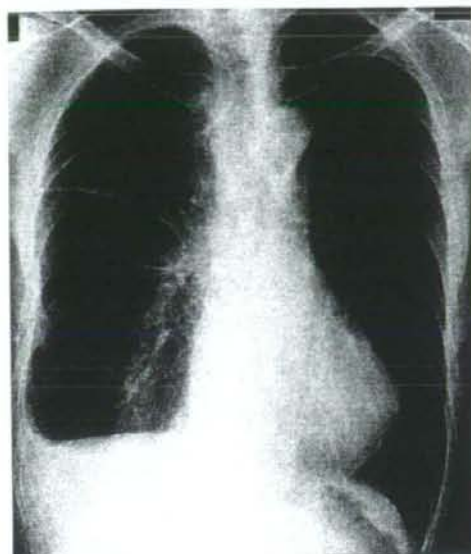
cm 以上のびまん性胸膜肥厚像 (pleural rind) を呈する。しかし, 早期病変の場合には, 腫瘍性胸膜肥厚所見を呈さないこともあるため, 原因不明の胸膜炎あるいは結核性胸膜炎と診断され, 経過観察あるいは抗結核薬の治療をされている症例もある。造影 CT は葉間胸膜の造影効果と腫瘍の横隔膜, 縦隔の軟部組織, 胸壁への浸潤の有無の検索に有用である。一方 MRI では, 腫瘍は T1 強調像で低信号, T2 強調像で中等度信号を示す。早期病変の場合には葉間裂の限局性肥厚あるいは造影効果が認められる。また, 造影 CT に比較して胸壁, 横隔膜への浸潤の詳細な検出効果に優れている。最も鑑別を要する肺癌との鑑別には, 肺野に原発となる腫瘍性病変があるかどうかについて詳細に検討しておく必要がある。

3) 病理診断

胸膜中皮腫は上皮型, 肉腫型, II 相型の 3 型に大別される。線維形成型 (desmoplastic type) は肉腫型の亜型と分類されるが, 50% 程度の組織で, 著明な膠原線維の増生が存在する。そのため, 良性石綿胸水 (線維性胸膜炎) との鑑別が重要である。

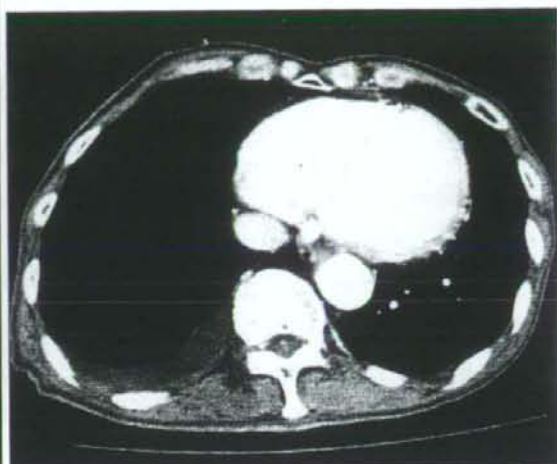
組織型別頻度では, 上皮型が最も多く, 肉腫型が最も少ないが, 腫瘍組織の顕微鏡下で観察する範囲が広くなるにつれて, II 相型の頻度が増加する。

上皮型胸膜中皮腫と鑑別が必要な腫瘍として, 肺腺癌が問題となるため, 免疫組織化学的な手法を用いた方法で染色性を検討し, 総合的な評価の下で鑑別を行うことが推奨されている。陽性マーカーとしてはカルレチニン, サイトケラチン 5/6, WT-1, D2-40 陰性マ-



(a) 胸部単純X線写真正面像

右胸水とともに気胸像を認めるが、腫瘍性胸膜肥厚像は認められない。



(b) 胸部CT縦隔条件

右胸水と背側および心膜側の胸膜肥厚を認めるが、腫瘍性肥厚であるとは診断できない。

図2 胸膜中皮腫早期病期症例

胸腔鏡下胸膜生検で、上皮型胸膜中皮腫と診断された。

カーとして、CEA、TTF-1を検査しておく。また、肉腫型中皮腫では低分子ケラチンであるAE1/AE3あるいはCAM5.2が有用であり、真の肉腫で陽性になるsmooth muscle actin (SMA) やデスミン、s-100などが陰性であることを確認することが必要である。II相型悪性中皮腫では、少なくともいずれかの成分が10%以上存在することを定義とする。鑑別すべき疾患としては、滑膜肉腫、肺癌肉腫、肺芽腫などII相性の増殖を示す腫瘍が問題となるが、免疫組織化学や遺伝子診断が鑑別に有用である。

4) 鑑別診断

胸膜中皮腫の鑑別診断で最も重要な疾患は原発性肺癌である。肺癌のうちでも画像上、pseudomesotheliomatous adenocarcinoma は鑑

別できないので、病理組織学的な診断が必要である。一方、pleomorphic型肺癌(肺癌肉腫)との鑑別は病理診断が困難なことも多いので、画像上の主病変部位が肺実質にあるのか胸膜にあるのかが重要である。しかし、石棉曝露歴のある症例で腫瘍性胸膜肥厚が存在しない症例では、良性石棉胸水との鑑別が最も重要である。すなわち、胸膜中皮腫早期病変(図2)あるいはdesmoplastic型中皮腫が問題となる。病理組織学的に強い炎症所見を伴う胸膜炎の場合には、反応性中皮細胞の増殖が強く、腫瘍のようにみえることがある。また、desmoplastic型中皮腫は病理組織上、炎症性変化に類似することがある。この際には、免疫組織学的にEMA、デスミン、p-53の所見が有用である。EMA、p-53が陽性でデスミンが陰性の場合には中皮腫である可能性

が高い¹⁰⁾。胸水貯留があり炎症が強い壁側胸膜側に細胞成分が多く、肺側に近いほど浸潤細胞数が少なくなるという zonation を認める際には炎症である可能性が高く、鑑別点になる。

3 良性石綿胸水

良性石綿胸水は石綿胸膜炎ともいい、通常は片側で少量の胸水を認める疾患であり、1964年に Eisenstadt¹¹⁾が初めて報告した。診断基準としては Epler ら¹²⁾の4項目が有名である。すなわち、①石綿曝露歴があること、②胸部単純X線写真あるいは胸水穿刺で胸水の存在が確認されること、③石綿曝露以外に胸水の原因がないこと、④胸水確認後3年以内に悪性腫瘍を認めないことの4項目を満たす場合であり、良性とは悪性でないという意味で、臨床経過は必ずしも良性であるということではない。Hillerdal ら¹³⁾は胸部CT等の画像診断で詳細な臨床経過を観察した場合には発症後1年の経過観察でよいと述べているが、現在までに新たな診断基準は提唱されていない。

発生機序は不明であるが、石綿の機械的刺激や胸膜の線維化による壁側胸膜のリンパ排出孔の閉塞説と石綿繊維のアジュバント効果による自己免疫機序などが推測されている。

1) 臨床所見

性別では圧倒的に男性が多い。発生年齢では石綿高濃度曝露が示唆される石綿工場での症例は平均51.5歳と比較的若い症例が多く¹⁴⁾、造船業者や建設業者のように石綿中等度曝露を受けた症例では平均66歳と比較的

高齢者が多い¹⁵⁾。この原因としては石綿曝露濃度によって発生年齢が異なり、高濃度曝露では発生までの潜伏期間が短いことが示唆されている。臨床症状としては、半数は自覚症状がなく、検診等で偶然発見される。自覚症状としては胸痛、発熱、咳嗽、呼吸困難等が挙げられるが、これらは胸膜中皮腫の初発症状と同様である。自覚症状の頻度では労作時呼吸困難が最も高く、胸痛、発熱の順である¹⁵⁾。また、臨床検査所見として、胸水の量は通常わずかであるが、500 ml以上の大量胸水を約10%に認める。胸水の性状は滲出液で、半数以上が血性あるいは淡血性である。細胞成分ではリンパ球優位あるいは好酸球増多であり、リウマチ性胸膜炎あるいは結核性胸膜炎等との鑑別が必要である。胸水中のヒアルロン酸値は100,000 ng/ml以下の場合が大半である。また、adenine deaminase (ADA)、CEAも高値を示すことはない。

2) 診断

除外診断であるので、胸水を来すあらゆる疾患を除外する必要がある。すなわち、リウマチ、SLE等の膠原病、結核性あるいは癌性胸膜炎等を否定しなければならない。胸水の量はごくわずかな貯留から500 mlを超えて穿刺を繰り返さなければならないほど大量貯留を認める症例もあるので、胸水の貯留量からの鑑別はできない¹⁶⁾。胸部画像所見では、胸水貯留のみで軽度胸膜肥厚を伴う症例もあるため、胸膜中皮腫早期病変との鑑別が必要であるため、胸腔鏡検査が必須となる(図3)。

胸腔鏡による肉眼所見で壁側胸膜は、表面が平滑な胸膜肥厚の頻度が高く、次いでややびまん性に発赤色調を呈する症例が多く、胸

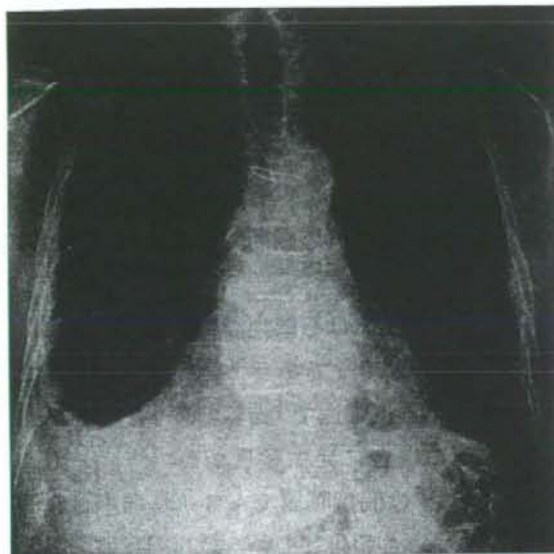


図 3 石綿肺に良性石綿胸水を合併した症例

(a) 胸部単純 X 線写真正面像

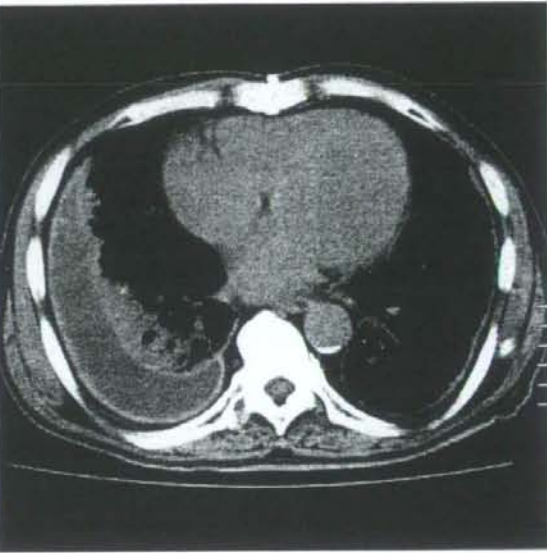
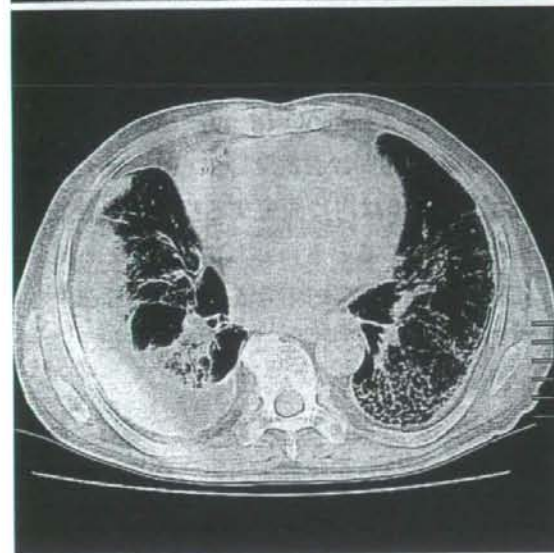
PR2 型の石綿肺と右胸水を認める。

(b) 胸部 CT 肺野条件

左肺野には小さな蜂巣肺を伴う肺の線維化所見を認める。

(c) 胸部 CT 縦隔条件

右胸水貯留と両側胸膜肥厚像が認められる。右胸膜肥厚は平滑で肥厚の程度も軽く、腫瘍性変化であるとは診断できない。



a |
b | c

膜中皮腫の症例のような隆起性病変は認められない。難治性胸水で石綿曝露が明らかな症例では積極的に胸腔鏡を行い、上述の病理学的な検査によっても、胸膜中皮腫ではないと診断した場合には良性石綿胸水として、慎重な経過観察をする。そして、中皮腫の発生のみならずびまん性胸膜肥厚への移行についても経過観察することが求められる。

3) 治療と臨床経過

無治療で約半数が自然軽快する¹²⁾。胸水の持続期間は 1~10 カ月である。最近のわれわれ¹⁷⁾の調査結果によれば、良性石綿胸水 45 症例のうち 33 例 (73%) では、胸水ドレナージのみで胸水がコントロールされていた。ドレナージの回数は 1 回のみから多い症例では 5 回のドレナージが行われ、胸水のドレ

ナージ量は 200~3,500 ml であったが、うち 6 例では 1,000 ml 以上の大量の胸水をドレナージしていた。一方、副腎ステロイドで奏効する症例もある。上述の 45 例中 8 例ではプレドニソロン 20 mg が投与されており、5 例では奏効していた¹⁷⁾。

しかし、治療効果がない場合には胸水が残存する。その際には胸膜中皮腫との鑑別が重要である。特に画像上胸膜肥厚を認める症例にはその程度が軽微であっても、早期に胸腔鏡による壁側胸膜の観察とともに生検が必要である。良性石綿胸水 22 例を 23 年にわたって経過観察したが、悪性中皮腫を 1 例も認めなかったという報告がある¹⁶⁾。一方、良性石綿胸水として診断されて経過観察中、3 年以上を経過して悪性胸膜中皮腫を発生したとの報告¹⁸⁾もある。また、良性石綿胸水 77 例を 6 年以上経過観察中にその 10 例 (13%) に悪性胸膜中皮腫が発生したとの報告¹⁹⁾もあり、良性であることに固執せず、中皮腫が発生する可能性を想定して経過観察を行うべきである。

一方、良性石綿胸水は再発率が高く、25~40%と報告されている²⁰⁾。短期間に 3 度胸水を繰り返したとの報告²¹⁾もある。また、再貯留率が 5 年間で 58%であったとする報告もある。上述の 45 例中でも 12 例 (26.6%) では胸水の再貯留を来しており、再貯留までの期間の中央値は 37.2 カ月であった¹⁷⁾。胸水が長い間残存する症例あるいは胸水が軽快した後、約半数にびまん性胸膜肥厚を残す²²⁾。その際には組織学的に慢性胸膜線維症を起こし、壁側胸膜との癒着が起こり、横隔膜の運動範囲が制限されるため、肺活量の低下を来す症例がある。びまん性胸膜肥厚を合併した

症例では通常肺拡散能は正常であるが、肺活量および全肺気量の低下を主体とする拘束性呼吸機能障害を来し、慢性呼吸不全等により死亡する症例も少なくない²³⁾。

4) 石綿曝露 (曝露期間と潜伏期間) と労災補償

良性石綿胸水は石綿高濃度曝露の場合には発生率が約 9% であるが、中等度曝露で 3.7%、低濃度曝露で 0.2% であり、石綿高濃度曝露の場合に発生頻度が高い²⁴⁾。一方、Epler ら¹²⁾は間接曝露でも 1,000 例中 3.7 例は発生すると報告している。石綿曝露期間は 20 年以上の場合が多いため、石綿肺を合併することもありますが、石綿低濃度曝露を示唆する胸膜ブランクを伴う症例の方が多¹³⁾。発症までの潜伏期間は石綿関連疾患中一番短く、曝露後 10 年以内に発生する疾患は良性石綿胸水のみであるともいわれている。しかし、実際には平均潜伏期間は 28.7~34.5 年¹⁴⁾¹⁵⁾と報告されており、上述の調査¹⁷⁾では、平均 50.5 年であった。

良性石綿胸水は労災補償の対象疾患であるため、職業性石綿曝露とともに臨床経過と治療の必要性を詳細に記載して、各労働基準監督署に申請を行う。現在、労災認定は厚生労働省に協議したうえで決定されている。

文 献

- 1) Robinson BWS, Creaney J, Lake R, et al. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 2003; 362: 1612-6.
- 2) Scherpereel A, Grigoriu B, Conti M, et al. Soluble mesothelin-related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir*

- Crit Care Med 2006 ; 173 : 1155-60.
- 3) Onda M, Willingham M, Nagata S, et al. New monoclonal antibodies to mesothelin useful for immunohistochemistry, fluorescence-activated cell sorting western blotting and ELISA. Clin Cancer Res 2005 ; 11 : 5840-6.
 - 4) Scherpereel A, Lee YCG. Biomarkers for mesothelioma. Curr Opin Pulm Med 2007 ; 13 : 339-43.
 - 5) Pass H, Lott D, Harbut M, et al. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum Osteopontin levels. New Engl J Med 2005 ; 353 : 1546-73.
 - 6) Hiraki A, Aoe K, Ueoka H. Asbestos exposure and serum osteopontin. New Engl J Med 2006 ; 354 : 304-5.
 - 7) Tigrani DY, Weydert JA. Immunohistochemical expression of osteopontin in epithelioid mesotheliomas and reactive mesothelial proliferations. Anat Pathol 2007 ; 127 : 580-4.
 - 8) 三浦博太郎, 中皮腫, 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—, 東京 : 三信図書, 2005 : p184-8.
 - 9) 岸本卓巳, 悪性中皮腫の診断・治療に関する現状と将来, 産業医レビュー 2007 ; 20 : 135-50.
 - 10) Sakuraba M, Natsuda K, Hebisawa A, et al. Diagnostic value of thoracoscopic pleural biopsy for pleurisy under local anesthesia. ANZ J Surg 2006 ; 76 : 722-4.
 - 11) Eisenstadt HB. Asbestos pleurisy. Dis Chest 1964 ; 46 : 78-81.
 - 12) Epler GR, McLoud TC, Gaensler EA. Prevalence and incidence of benign asbestos pleural effusions in a working population. J Am Med Assoc 1982 ; 247 : 617-22.
 - 13) Hillerdal G, Ozesmi M. Benign asbestos pleural effusion : 73 exdates in 60 patients. Eur J Respir Dis 1987 ; 71 : 113-21.
 - 14) 田村猛夏, 春日宏友, 堅田 均, ほか, 石綿性胸膜炎の臨床的ならびに文献的考察, 日胸疾会誌 1990 ; 28 : 1182-94.
 - 15) 岸本卓巳, 岡原正幸, 近森研一, ほか, 良性石綿胸水の臨床的検討, 日呼吸会誌 1998 ; 36 : 18-22.
 - 16) Robinson BWS, Musk AW. Benign asbestos pleural effusion : diagnosis and course. Thorax 1981 ; 36 : 9-18.
 - 17) 岸本卓巳, 玄馬顕一, 藤本伸一, ほか, 良性石綿胸水の診断と治療に関する調査研究 労働者健康福祉機構 13 疾病研究 中間報告書, 2007.
 - 18) 平野国美, 佐藤浩昭, 井上雅樹, ほか, 石綿胸膜炎の経過中に発症した悪性胸膜中皮腫の 1 例, 日胸疾会誌 1996 ; 34 : 1390-4.
 - 19) D-Lajartre M, D-Lajartre AY. Mesothelioma on the coast of Brittany, France. Ann New York Acad Sci 1979 ; 330 : 323-32.
 - 20) 三浦博太郎, 赤羽久昌, 木村雄二, ほか, 石綿胸膜炎, Medizina 1992 ; 29 : 1465-7.
 - 21) 岸本卓巳, 岡原正幸, 小崎晋司, ほか, 4 年間に 3 回再発を繰り返した良性石綿胸水の若年例, 日災医誌 1998 ; 46 : 491-5.
 - 22) Stephans M, Gibbs AR, Pooley FD, et al. Asbestos induced diffuse pleural fibrosis. Thorax 1987 ; 42 : 583-8.
 - 23) Miller A, Teirstein AS, Selikoff IJ. Ventilatory failure due to asbestos pleurisy. Am J Med 1983 ; 75 : 911-9.
 - 24) Miller A. Pulmonary function in asbestos and asbestos-related pleural disease. Environ Res 1993 ; 61 : 1-18.

The aberrant promoter methylation of *BMP3b* and *BMP6* in malignant pleural mesotheliomas

KENTARO KIMURA¹, SHINICHI TOYOOKA¹, KAZUNORI TSUKUDA¹, HIROMASA YAMAMOTO¹, HIROSHI SUEHISA¹, JUNICHI SOH¹, HIROKI OTANI¹, TAKAFUMI KUBO¹, KEISUKE AOE², NOBUKAZU FUJIMOTO³, TAKUMI KISHIMOTO³, YOSHIFUMI SANO¹, HARVERY I. PASS⁴ and HIROSHI DATE⁵

¹Department of Cancer and Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University; ²Department of Respiratory Medicine, NHO Sanyo National Hospital, Yamaguchi; ³Department of Internal Medicine, Okayama Rousai Hospital, Okayama; ⁴Division of Thoracic Surgery and Thoracic Oncology, Department of Cardiothoracic Surgery, NYU School of Medicine and NCI Cancer Center, New York, NY, USA; ⁵Department of Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

Received April 22, 2008; Accepted June 26, 2008

DOI: 10.3892/or.00000139

Abstract. Bone morphogenetic proteins (BMPs) belong to the transforming growth factor- β superfamily. Recent studies have showed that aberrant methylation of *BMP* genes is present in several types of human cancer. We examined the expression and methylation status of *BMP3b* and *BMP6* in malignant pleural mesotheliomas (MPMs). The expression status of *BMP3b*, and *BMP6* mRNAs were examined in seven MPM cell lines by RT-PCR assay. The expression of *BMP3b* was completely suppressed in 2 and partially suppressed in 2 of 7 cell lines and expression of *BMP6* was partially suppressed in 2 cell lines. Methylation status of *BMP3b* in cell lines was determined by methylation-specific assay to find aberrant methylation in 6 cell lines which include 4 cell lines with suppressed *BMP3b* expression. Partial methylation of *BMP6* was found in 2 cell lines whose expression was partially suppressed. Treatment with 5-Aza-dC restored *BMP3b* expression in methylated cell lines. Next, we examined the methylation status in 57 surgically resected MPM cases and found aberrant methylation of *BMP3b* in 9 (53%) out of 17 cases from Japan and 3 (8%) of 40 cases from USA and that of *BMP6* in 4 (24%) cases from Japan and 12 (30%) cases from USA, showing significant difference in frequency of *BMP3b* methylation between MPMs of the two countries ($P=0.0004$). Our study indicated that *BMP3b* and *BMP6* genes were suppressed by DNA methylation and methylation of *BMP3b* is significantly frequent in Japanese

MPMs, suggesting its pathogenic role and the ethnic difference in MPMs.

Introduction

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are multifunctional cytokines involved in skeletal development and bone formation (1,2). They are members of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily and critical mediators of early embryonic patterning. BMPs have been shown to inhibit cellular proliferation and be involved in organogenesis, particularly of the lung, heart and kidney. Inactivation of *BMP* genes has been implicated as important in several cancer types (3-8). Recent studies have shown that *BMP* genes including *BMP3*, *BMP3b* and *BMP6* are epigenetically inactivated in various kinds of cancers, suggesting that inactivation of BMPs may play an important role in carcinogenesis. *BMP3b* is methylated in colorectal neoplasms and non-small cell lung cancers (NSCLCs), while *BMP6* is methylated in breast cancer and NSCLCs.

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive tumor that develops from the pleural surface. The strong association with exposure to asbestos is known and implication of SV40 infection has been revealed recently (9,10). Regarding molecular alteration of MPM, homozygous deletion of *p16* gene and mutation of neurofibromatosis type 2 gene are well known as genetic alteration of MPM. DNA methylations of several tumor suppressor genes are also known as epigenetic alteration of MPMs (11-13).

In this study, we examined the methylation and expression status of *BMP3b* and *BMP6* genes in primary MPMs and MPM cell lines to investigate the implication of *BMP* genes in MPMs.

Materials and methods

Tumor samples and cell lines. Seven MPM cell lines (NCI-H2452, NCI-H2373, NCI-H2058, NCI-H2052, NCI-H290,

Correspondence to: Dr Shinichi Toyooka, Department of Cancer and Thoracic Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan
E-mail: toyooka@md.okayama-u.ac.jp

Key words: DNA methylation, bone morphogenetic proteins, mesothelioma

NCI-H28, HP1) were kindly gifted from Ad.F. Gazdar (Department of Pathology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX) or Harvery I. Pass (Department of Cardiothoracic Surgery, NYU School of Medicine). All these cell line samples were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum. Surgically resected specimens of 57 MPMs were obtained after informed consent from each patient. Tumor tissues were obtained from 40 patients with MPMs resected at Karmanos Cancer Center, MI, 6 patients resected at Okayama Rousai Hospital (Okayama, Japan), 5 patients at NHO Sanyo National Hospital, Yamaguchi Japan, and 6 patients at Okayama University Hospital, Okayama Japan. The study was approved by the Institutional Review Board of each institution and informed consent was obtained from the patients.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression status of *BMP3b* and *BMP6* mRNAs were examined in seven MPM cell lines by RT-PCR assay. Total-RNA was isolated using RNeasy mini kit™ (Qiagen, Valencia, CA). cDNA was synthesized from the RNA using the SuperScript II kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). RT-PCR amplification of *BMP3b* and *BMP6* cDNA was performed using primers designed with Primer 3. *BMP3b* primers used were: 5'-GGTGGACTTCGCAGACATCG-3' (sense) and 5'-GATGGTGGCATGGTTGGATG-3' (antisense). *BMP6* primers were: 5'-ACAGCATAACATGGGGCTTC-3' (sense) and 5'-CTCGGGGTTTCATAAGGTGAA-3' (antisense). *GAPDH* was used as an internal control to confirm the success of the RT reaction (sense primer, 5'-ACAGTCCATGCCA TCACTGCC-3' and antisense primer, 5'-GCCTGCTTCA CCACCTTCTTG-3') (14). The PCR mixture contained 10X PCR buffer, dNTPs (200 μM of each), primers (1 μM of each) and 0.25 μl TaqGold. cDNA was amplified using an annealing temperature at 60°C and two different cycles of 17 and 35 cycles. PCR product was separated by electrophoresis and visualized on an ethidium bromide-stained agarose gel.

DNA extraction and bisulfite treatment. Genomic DNA was isolated from cell lines and frozen tissues of primary tumors by homogenization by digestion with 100 μg/ml, SDS/proteinase K followed by standard phenol-chloroform (1:1) extraction, and ethanol precipitation. One microgram of extracted DNA was modified with bisulfite treatment using the EZ DNA Methylation kit™ (Zymo Research, Orange, CA) according to the manufacturer's instructions.

Methylation-specific PCR assay. Aberrant methylation of *BMP3b* and *BMP6* genes was determined by MSP assay using DNAs treated with sodium bisulfite as described previously. The primer sets for both methylated and unmethylated forms of each gene were prepared. The primers to *BMP3b* promoter region were: 5'-CGGCGTCGATATATAGGAGTC-3' (sense) and 5'-AAATCGTCCCTAACCCGACT-3' (antisense) for methylated form and 5'-TGGTGTGATATA TAGGAGTT-3' (sense) and 5'-AAATCATCCCTAACCCA ACT-3' (antisense) for unmethylated form. The primers for *BMP6* were: 5'-GGTTTGTGGGTAGTCGGG-3' (sense) and 5'-GCCCCCTCCCAAATCG-3' (antisense) for

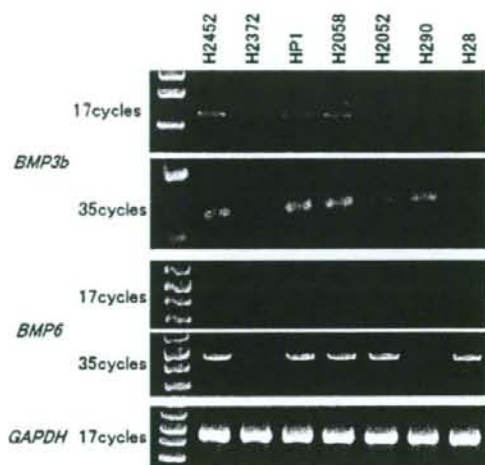


Figure 1. mRNA expression of *BMP3b* and *BMP6* in MPM cell lines. RT-PCR for each gene was carried out using two cycles, 17 and 35. The expression of *BMP3b* was completely suppressed in NCI-H2372 and NCI-H28. But in two weak expressing cell lines, NCI-H2052 and H290, *BMP3b* amplicon was not detected using 17 cycles but observed using 35 cycles. *BMP6* amplicon in NCI-H2372 and NCI-H290 was not detected using 17-cycle amplification. *GAPDH* was used as internal control.

methylated form and 5'-TTGGGTAGTTGGGTGATTGTT-3' (sense) and 5'-ACACCCCTCCCAAATCA-3' (antisense) for unmethylated form. Bisulfite-modified DNAs were mixed with 10X PCR Buffer, 150 μM of deoxynucleotide triphosphates, 0.4 μM of primers and 1 unit of HotStar Taq (Qiagen). The PCR condition for methylated alleles of *BMP3b* consisted of 12 min at 95°C, 40 cycles of 30 sec of 95°C, 60 sec of 61°C and 60 sec of 72°C followed 7 min elongation. The PCR condition for unmethylated alleles of *BMP3b* was similar to that for methylated allele: 12 min at 95°C, 40 cycles of 30 sec of 95°C, 60 sec of 56°C and 60 sec of 72°C followed 7 min elongation. The PCR condition for methylated alleles of *BMP6* consisted of 12 min at 95°C, 40 cycles of 30 sec of 95°C, 60 sec of 62°C and 60 sec of 72°C, followed 7 min elongation. The PCR condition for unmethylated alleles of *BMP6* was 12 min at 95°C, 40 cycles of 30 sec of 95°C, 60 sec of 60°C and 60 sec of 72°C, followed 7 min elongation. PCR products were separated by electrophoresis and visualized on an ethidium bromide-stained 2.5% agarose gel. DNA from non-malignant lung tissue was treated with SssI methyltransferase (New England BioLabs, Beverly, MA) and then subjected to bisulfite treatment was used as a positive control for methylated alleles.

5-Aza-2'-deoxycytidine treatment. Cell lines were treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at a concentration of 1-2 μg/ml for 6 days with medium changes on days 1, 3 and 5. Treated or untreated cell from individual triplicate flasks were harvested to detect expression level using RT-PCR as described earlier. Two MPM cell lines (NCI-H290, NCI-H28) with weak and negative *BMP3b* expression were used for this assay.

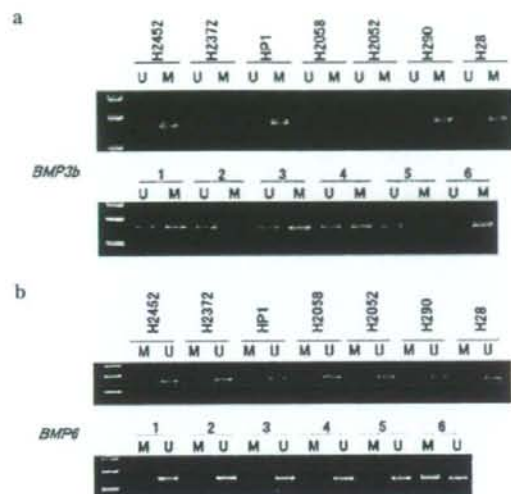


Figure 2. Methylation specific PCR for *BMP3b* (a) and *BMP6* (b) in MPM cell lines and representative examples of primary tumors. Result of testing for the methylated (M) and unmethylated (U) forms for each sample are illustrated. Samples from 1 to 7 are primary MPMs.

Data analysis. A comparison of the proportion of gene methylation was done using Fisher's exact test. A P-value <0.05 was defined as being statistically significant. All data were analyzed with the use of Survival Tools for StatView (Adept Scientific Inc., Acton, MA).

Results

The expression of *BMP3b* and *BMP6* was examined in 7 MPM cell lines by RT-PCR (Fig. 1). RT-PCR is not a quantitative assay for expression, but 2 different amplification cycles, 17 and 35 cycles; of PCR distinguished complete suppression or partial suppression of these genes. The expression of *BMP3b* was completely suppressed in 2 cell lines; NCI-H2372 and NCI-H28; and partially suppressed in 2 cell lines; NCI-H2052 and NCI-H290, while expression of *BMP6* was partially suppressed only in 2 cell lines. Methylation status of *BMP3b* in cell lines was determined by MSP assay (Fig. 2). DNAs which were amplified with primers for methylated alleles but not with primers with unmethylated alleles were determined to be heavily methylated. DNAs which were amplified with both methylated and unmethylated primer sets were

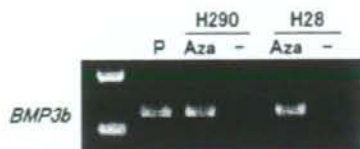


Figure 3. The restoration of *BMP3b* expression by 5-Aza-CdR in MPM cell lines. *BMP3b* amplicon was detected using 17 cycles in both H290 and H28 treated with 5-Aza-CdR. Aza, 5-Aza-CdR treated; -, untreated; P, positive control.

considered to be partially methylated. In 7 MPM cell lines, 2 cell lines (NCI-H290 and NCI-H28) were strongly methylated and 4 cell lines (NCI-H2452, HP1, NCI-H2058 and NCI-H2052) were partially methylated in the *BMP3b* gene. NCI-H28 in which *BMP3b* expression was not present was strongly methylated, but NCI-H2372 with negative expression was not methylated. Two cell lines with weak expression of *BMP3b* were heavily (H290) and partially methylated (H2052). By contrast, expression of *BMP3b* was not suppressed in 3 cell lines with partial methylation (NCI-H2452, HP1 and NCI-H2058). In the *BMP6* gene, only two cell lines (NCI-H2373 and NCI-H290) were partially methylated and no cell lines were heavily methylated. The expression of these two cell lines was partially suppressed.

Next, methylation status in 57 surgically resected MPM cases was tested by MSP assay (Fig. 2). Because non-malignant cells were contained in surgically resected samples, all primary samples were amplified with primers for unmethylated alleles. Aberrant methylation of *BMP3b* were found in 9 (53%) out of 17 cases from Japan and 3 (8%) of 40 cases from USA and that of *BMP6* were in 4 (24%) cases from Japan and 12 (30%) cases from USA (Table I). While the frequency of *BMP6* methylation was similar in MPMs in Japan and USA, but *BMP3b* methylation was significantly frequent in Japanese patients ($P=0.0004$).

To confirm the responsibility of DNA methylation for *BMP3b* silencing, we treated two methylated cell lines (NCI-H290, NCI-H28) with 5-Aza-CdR. *BMP3b* expression was significantly up-regulated by 5-Aza-CdR treatment in methylated cell lines (Fig. 3).

Discussion

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are multifunctional cytokines involved in skeletal development and bone

Table I. The frequency of *BMP3b* and *BMP6* methylation in MPM cell lines and tumors.

	<i>BMP3b</i> methylation (%)	P-value	<i>BMP6</i> methylation (%)	P-value
Cell line (n=7)	6 (86)		2 (29)	
Primary tumor				
USA (n=40)	3 (8)	0.0004	12 (30)	0.75
Japan (n=17)	9 (53)		4 (24)	

formation. They are members of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily and critical mediators of early embryonic patterning. BMPs have shown to inhibit cellular proliferation and involved in organogenesis, particularly of the lung, heart and kidney. Recent work has shown that *BMP3b* and *BMP6* are epigenetically inactivated in several malignancies. *BMP3b* has been demonstrated to be methylated in NSCLCs, and colorectal cancer, and *BMP6* gene in NSCLCs, prostate cancer, malignant lymphomas and breast cancer (9-13).

We have screened for aberrant methylation of *BMP* genes in MPMs. In spite of the limitation of the number of cell lines and primary samples, we showed the suppression of *BMP3b* and *BMP6* expression in MPM cell lines and DNA methylation was one of the mechanisms of gene suppression. Aberrant methylation of *BMP3b* and *BMP6* was also detected in primary MPMs. The frequency of methylation of *BMP6* was quite similar in cell lines, primary tumors in USA and those in Japan, but methylation of *BMP3b* gene was significantly more frequent in MPMs of Japan than those of USA. These results indicate that the methylation of *BMP3b* may be influenced by ethnic or pathogenic differences. Of note, we have reported that the methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 was significantly more frequent in Japanese MPMs than in those of USA (15).

As shown in Fig. 1, methylated and unmethylated bands were observed in 4 cell lines, indicating partial methylation. In addition, even partial methylated cell lines, expression status was not identical. These findings suggest heterogeneity of methylation among individual cells even in the same cell lines. The importance of partial methylation of *BMP3b* is not clear and further study is necessary. Of note, the seven cell lines examined were established in USA, but the frequency of methylation in primary tumors in USA is not frequent. Thus, partial methylation in cell lines might be artificial phenomenon in the process of establishing cell lines. Furthermore, there must be other mechanisms for gene suppression of *BMP3b* because it was completely suppressed in NCI-H2372, in which DNA methylation was absent.

Recent work of others and our study strongly support that *BMP3b* and *BMP6* have a role as tumor suppressor genes in several malignancies. Other members of BMPs are shown to be involved in malignancies but their roles in carcinogenesis are still controversial. Methylation and loss of expression of *BMP2* was observed in gastric carcinomas, but it was also shown to promote tumor growth in A549, NSCLC cell lines (16). The roles of BMP proteins in carcinogenesis may be different according to the organ and further studies are necessary.

In conclusion, we showed that DNA methylation cause the suppression of *BMP3b* and *BMP6* expression in MPMs. In addition, there was an ethnic difference of frequency of the methylation in *BMP3b*, suggesting the etiology of MPM may be different between Japanese and USA.

References

- Xiao YT, Xiang LX and Shao JZ: Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 550-553, 2007.
- Hino J, Kangawa K, Matsuo H, Nohno T and Nishimatsu S: Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions. *Front Biosci* 9: 1520-1529, 2004.
- Tamada H, Kitazawa R, Gohji K and Kitazawa S: Epigenetic regulation of human bone morphogenetic protein 6 gene expression in prostate cancer. *J Bone Miner Res* 16: 487-496, 2001.
- Dai Z, Popkie AP, Zhu WG, *et al.*: Bone morphogenetic protein 3B silencing in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 23: 3521-3529, 2004.
- Kraunz KS, Nelson HH, Liu M, Wiencke JK and Kelsey KT: Interaction between the bone morphogenetic proteins and Ras/ MAP-kinase signalling pathways in lung cancer. *Br J Cancer* 93: 949-952, 2005.
- Zou H, Harrington JJ, Shire AM, *et al.*: Highly methylated genes in colorectal neoplasia: implications for screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 2686-2696, 2007.
- Zhang M, Wang Q, Yuan W, *et al.*: Epigenetic regulation of bone morphogenetic protein-6 gene expression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 105: 91-97, 2007.
- Daibata M, Nemoto Y, Bandobashi K, *et al.*: Promoter hypermethylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in malignant lymphoma. *Clin Cancer Res* 13: 3528-3535, 2007.
- Carbone M, Rizzo P, Grimley PM, *et al.*: Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nat Med* 3: 908-912, 1997.
- Shivapurkar N, Wiethage T, Wistuba II, *et al.*: Presence of simian virus 40 sequences in malignant mesotheliomas and mesothelial cell proliferations. *J Cell Biochem* 76: 181-188, 1999.
- 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.
- 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.
- Toyooka S, Kishimoto T and Date H: Advances in the molecular biology of malignant mesothelioma. *Acta Med Okayama* 62: 1-7, 2008.
- Mollerup S, Ryberg D, Hewer A, Phillips DH and Haugen A: Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Res* 59: 3317-3320, 1999.
- 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.
- Langenfeld EM, Kong Y and Langenfeld J: Bone morphogenetic protein 2 stimulation of tumor growth involves the activation of Smad-1/5. *Oncogene* 25: 685-692, 2006.



話題

アスベスト曝露と悪性中皮腫*

岸本卓巳**

Key Words : malignant mesothelioma, occupational asbestos exposure, latency, calretinin, pemetrexed

はじめに

悪性中皮腫の約80%が職業性アスベスト曝露によって発生し、家庭内曝露や近隣曝露でも発生しうるが、低濃度の環境曝露ではきわめて発症リスクは低いと考えられている。発生までの潜伏期間は初回曝露から最低でも10年、平均30~50年を要する。また、喫煙は悪性中皮腫発生のリスクとはならないことが指摘されている¹⁾。

アスベストとは、アスベクト比が3以上の繊維性珪酸塩の総称であり、蛇紋石族のクリソタイルと角閃石系のクロシドライト、アモサイト、アンソフィライト、トレモライト、アクチノライトがある。そのうち、クロシドライトの発がん性ももっとも強く、クリソタイルの500倍であるといわれている。日本では良質なアスベスト鉱山がなかったことから、南アフリカ、カナダ、ロシア等海外からの輸入に頼ってきた。戦前には軍需用に軍艦などに使用されていたが、戦後経済の高度成長とともに1975年頃まで、輸入量が増加したが、以降は発がん性が問題となり減少傾向を示した。そして、2004年には建材、ブレーキ、クラッチなどへの使用が原則禁止、2006年9月からは輸入、生産、譲渡等が完全禁止となった。

過去の使用用途としては、アスベスト吹きつけ、アスベストセメント管、スレートや化粧板などの建材、ブレーキ、クラッチ等自動車製品などに使用された。もっとも発がん性の強いク

ロシドライトは主に吹きつけとアスベストセメント管に使用されていたが、日本で使用禁止となったのは1995年であり²⁾、悪性中皮腫発生までの長い潜伏期間から、今後の増加が問題となっている。

アスベスト曝露と悪性中皮腫の発生頻度

アスベストと悪性中皮腫の関連が疫学的に示されたのは、1960年にWagnerらが、南アフリカのクロシドライト鉱山労働者および家族、近隣の住民などに胸膜中皮腫が発生したことを報告したことに端を発する³⁾。現在の世界の悪性中皮腫の発生率は人口100万人あたり男性が10~30人、女性が2人といわれている⁴⁾。しかし、曝露するアスベストの種類で異なり、クロシドライトでは100万人あたり30.1人であるが、クリソタイルのコホート研究では3.8人であり、大きく異なる。また、曝露濃度でも異なり、アスベスト高濃度曝露者では100万人あたり366人⁵⁾、中等度から低濃度曝露者では67人である⁶⁾。もっとも発生頻度が高い職業は、アフリカとオーストラリアのクロシドライト鉱山労働者、イギリスとカナダのガスマスク製造業者、アメリカのたばこフィルター製造業者、断熱作業や造船所で主にクロシドライトに曝露された人々である。

日本においては、これまで悪性中皮腫とアスベスト曝露の関係が明らかにされなかった。しかし、われわれが2005年に行った、2003年に全国で死亡した878例の追跡調査では、職業歴を調

* Relationship between asbestos exposure and malignant mesothelioma.

** Takumi KISHIMOTO, M.D., Ph.D.: 岡山労災病院アスベスト疾患ブロックセンター [〒702-8055 岡山市築港緑町1-10-25]; Block Center for Asbestos-related Diseases of Okayama Rosai Hospital, Okayama 702-8055, JAPAN

表1 職業性アスベスト曝露が疑われる症例における職種別頻度

	胸膜	腹膜	心膜	計
建設作業	24	2		26
造船所内での作業	15	1		16
鉄鋼製品等製造業	12			12
電気工事業	11	1		12
配管作業	7	2	1	10
自動車製造または補修作業	9			9
アスベスト製品製造業	5	4		9
解体作業	8			8
セメント・セメント製品製造業	4			4
機械器具製品製造業	3	1		4
金属製品製造業	3			3
ガラス・ガラス製品製造業	2			2
レンガ・陶磁器製品製造業	2			2
倉庫内の作業	1	1		2
化学工場内での作業	1			1
その他アスベスト関連作業	7	1		8
計	114	13	1	128

(平成17年度厚生労働科学特別研究中皮腫と職業性石綿ばく露に関する研究報告書より引用)

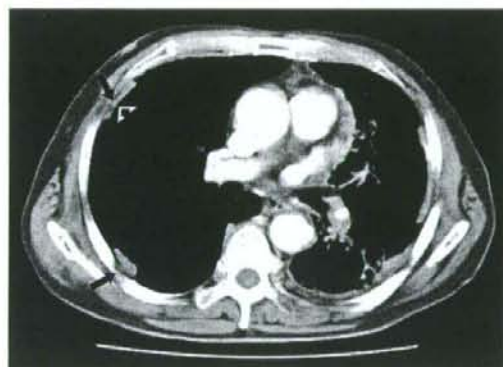


図 1-A 胸部CTにおける画像所見

悪性胸膜中皮腫は当初は胸膜の肥厚像として認められる場合が多く、とくに縦隔側胸膜肥厚像は早期の場合にも認められる。反対側(右)にはアスベスト曝露を示唆する胸膜ブランク(矢印)を認める。



図 1-B 進展した腫瘍病変は肺を取り囲むような不整形胸膜腫瘤像を示す

43年で、平均値が44年と40年を超える潜伏期間であった⁷⁾。

アスベストによる悪性中皮腫の画像診断

胸膜中皮腫の場合には、約80%の症例では胸水貯留を伴う。典型例では胸部CT上、胸腔内に突出する腫瘤陰影あるいは厚さ1 cm以上のびまん性胸膜肥厚像を呈し、肺を取り囲むように進展して、含気が減少する(図 1-A, B)。しかし、早期病変の場合には、腫瘍性胸膜肥厚所見を呈さない場合もあるため、原因不明の胸膜炎あるいは結核性胸膜炎と診断されて、経過観察ある

査できた173例中128例が職業性アスベスト曝露によって発生していたことが判明した。そのうちでも、建設業や造船所内での作業、鉄鋼製品等製造業、電気工事業、自動車製造または補修作業、アスベスト製品製造業、解体作業者の頻度が高かった(表 1)。一方、アスベスト曝露期間は0.3~55年で、中央値が30年で、平均値が27.6年であった。また、アスベスト初回曝露から中皮腫発生までの潜伏期間は27~73年、中央値が

表2 胸膜中皮腫の臨床病期分類(IMIG, 1995)

stage	Ia	T1a	N0	M0
	Ib	T1b	N0	M0
stage	II	T2	N0	M0
stage	III	any T3		M0
			any N1, N2	M0
stage	IV	any T4	any N3	any M1

いは治療されている場合もある。そして、上述のような典型的像を呈して、はじめて悪性中皮腫と確定診断されている場合も少なくない。

造影CTは葉間胸膜の造影効果と腫瘍の横隔膜、縦隔の軟部組織、胸壁への浸潤の有無の検索に有用である。また、胸膜プラークとの鑑別には造影効果で、胸膜肥厚が造影される場合に悪性中皮腫と診断される場合が多い。

一方、MRIでは腫瘍はT1強調像で低信号、T2強調像で中等度信号を示す。早期病変の場合には葉間裂の限局性肥厚あるいは造影効果が認められる。また、造影CTに比較して胸壁、横隔膜への浸潤の詳細な検出効果に優れている⁹⁾。もっとも鑑別を要する肺がんとの鑑別には、肺野に原発となる腫瘍病変があるかどうかについて詳細に検討しておく必要がある。ただし、肺がんが胸膜に浸潤して、中皮腫と同様の進展を示す場合があり、このような症例をpseudomesotheliomatous adenocarcinoma⁹⁾と呼ぶ。この場合、画像では悪性中皮腫とは鑑別できないので、病理診断が必要である。胸膜中皮腫のstaging分類では手術適応を基本とした1995年のInternational Mesothelioma Interest Group(IMIG)の分類が標準である¹⁰⁾(表2,3)。この分類は以下の点で特徴がある。T因子では壁側胸膜に限局していればT1aで、一部の臓側胸膜に病変が及ぶ場合をT1bとする。病変範囲が広くても手術可能であればT3、そうでなければT4である。また、リンパ節転移が重要視され、たとえ同側のリンパ節転移のあるN1であってもStage IIIということになる。すなわち、T3あるいはN1であってもStage IIIである。

腹膜中皮腫では腹水の有無で画像所見が異なる。腹水を伴わない型では充実性の腫瘍形成を

表3 胸膜中皮腫のTNM分類(IMIG, 1995)

T 原発腫瘍	
T1: 臓側胸膜腫瘍の有無により亜分類	
T1a:	同側の壁側胸膜(縦隔胸膜、横隔胸膜を含む)に腫瘍が限局しているもの
T1b:	同側の壁側胸膜に腫瘍があり、同側の臓側胸膜にも腫瘍の散布巣が認められるもの
T2:	同側胸膜(壁側および臓側)に腫瘍があり、浸潤範囲が下記のもの
	・横隔膜筋層浸潤
	・臓側胸膜全体(葉間胸膜を含む)
	・胸膜直下肺実質
T3:	局所進行状態であるが切除可能なもので、すべての臓側胸膜に腫瘍が進展し、以下のいずれかが認められるもの
	・胸内筋層浸潤
	・縦隔脂肪層浸潤
	・完全に切除可能な胸壁軟部組織の孤在性進展腫瘍巣
	・非貫通性心膜浸潤
T4:	切除不能局所進行状態であり、すべての臓側胸膜に腫瘍が進展し、以下のいずれかが認められるもの
	・胸壁へのびまん性浸潤または胸壁の多発性腫瘍巣(肋骨破綻の有無は問わない)
	・経横隔膜の腹腔浸潤
	・対側胸膜への直接浸潤
	・縦隔臓器浸潤
	・脊髄浸潤
	・心膜腔内への浸潤または臓側心膜浸潤(心嚢液の有無は問わない)
N 所属リンパ節	
NX:	所属リンパ節が判定できない
N0:	所属リンパ節に転移がない
N1:	同側気管支周囲または同側肺門リンパ節転移
N2:	気管分岐部、同側縦隔、または同側内胸リンパ節転移
N3:	対側縦隔、対側内胸リンパ節、同側または対側鎖骨上リンパ節転移
M 遠隔転移	
MX:	遠隔転移が判定できない
M0:	遠隔転移がない
M1:	遠隔転移がある

認める場合が多い(図2)。一方、腹水を伴う型では腫瘍形成は少なく、びまん性の腹膜の肥厚像と壁側腹膜側に小結節を認める。

心膜中皮腫では心外膜のびまん性肥厚と心嚢液の貯留が特徴である。

アスベスト曝露によって発生したかどうかについては、アスベストによるその他の関連病変であるアスベスト肺や胸膜プラークの存在を画像上確認することでも検討可能である。2003年の死亡例では検討可能であった158例中画像上アスベスト肺を認めた症例が9例(5.7%)で、胸膜プラークを認めた症例が69例(43.7%)であった(表4)。ア

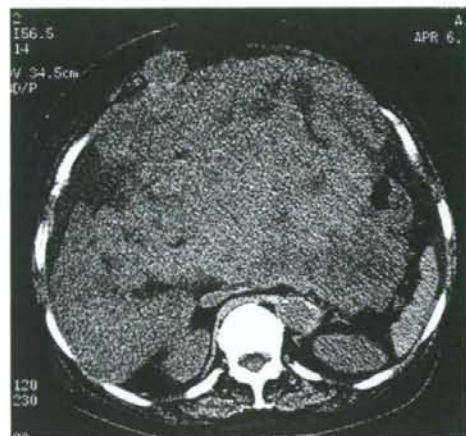


図2 腹部CTにおける画像所見
腫瘍形成型腹膜中皮腫は巨大な腹腔内腫瘍として認められる場合もある。

スベスト曝露の指標として用いられるこれら病変の頻度が意外に少ないことが判明した⁷⁾。

悪性中皮腫の病理診断

悪性中皮腫は肉眼的には限局型とびまん型に分類される。限局型は有茎あるいは無茎性に突出し、肺に浸潤する場合があるが、比較的稀である。大半はびまん型で、胸膜、腹膜に沿って増殖し、周辺臓器に浸潤する特徴をもつ。腹膜中皮腫の場合には、腸管漿膜が結節状に肥厚して癒着する場合、大網が一塊となって腫瘍を形成する場合、腸間膜が板状に肥厚する場合があるが、胸膜中皮腫の特徴とは異なる。

WHO分類では、良性の中皮腫関連腫瘍はアデノマトイド腫瘍(adenomatoid tumor)だけであり、悪性中皮腫は上皮型、肉腫型、二相型の3型に大別される。線維形成型(desmoplastic type)は肉腫型の亜型と分類されるが、50%程度の組織で、著明な膠原線維の増生が存在する。線維性胸膜炎との鑑別が重要である。

井内¹¹⁾は2004年の中皮腫研究班全国アンケートでは上皮型が47.9%、肉腫型が18.2%、二相型が21.4%であると報告している。どの報告をみても、頻度では上皮型がもっとも多く、肉腫型がもっとも少ないが、腫瘍組織の顕微鏡下で観察する範囲が広がるにつれて、二相型の頻度が増加する。

表4 悪性中皮腫(部位別)とアスベスト曝露に関連する画像所見

	胸膜	腹膜	心膜	計
症例数	158	23	1	182
画像検討例	135	22	1	158
アスベスト肺	9	0	0	9
胸膜プラーク	61	8	0	69
石灰化あり	27	4	0	31
石灰化なし	34	4	0	38
円形無気肺	0	0	0	0
びまん性胸膜肥厚	0	0	0	0
胸水貯留	118	6	1	125

(平成17年度厚生労働科学特別研究中皮腫と職業性石棉ばく露に関する研究報告書より引用)

上皮型中皮腫と鑑別が必要な腫瘍として、肺腺がんや卵巣がんが問題となるため、最近では免疫組織化学的手法を用いた方法で染色性を検討し、総合的な評価の下で鑑別を行うことが推奨されている。Ordonezら¹²⁾は悪性中皮腫の陽性マーカーとしてはcalretinin, cytokeratin, WT-1, 陰性マーカーとして、CEA, MOC-31, Ber-EP4, BG-8をあげている。一方、武島ら¹³⁾は追加として陽性マーカーではcytokeratin 5/6, また陰性マーカーとしてTTF-1, CA19-9をあげている。

また、肉腫型中皮腫と真の肉腫の鑑別では、肉腫型中皮腫ではcalretininの陽性率が60%程度と低いため、低分子ケラチンであるAE1/AE3あるいはCAM5.2が有用であり(図3)、真の肉腫で陽性になるsmooth muscle actinやdesmin, s-100などが陰性であることを確認することが必要であると報告されている。二相型悪性中皮腫では少なくともいずれかの成分が10%以上存在することを定義としている。鑑別すべき疾患としては、滑膜肉腫、肺がん肉腫、肺芽腫など二相性の増殖を示す腫瘍が問題となるが、免疫組織化学染色が鑑別に有用である¹⁴⁾。

2003年の死亡例で病理組織等が得られた111例について、病理組織学的に再検討したところ14例(12.6%)については、肺腺がん、胸膜炎、悪性リンパ腫、横紋筋肉腫、反応性中皮細胞過形成、solitary fibrous tumorであった。組織診断を行っても約10%の誤った診断が行われているのが現状である¹⁵⁾。

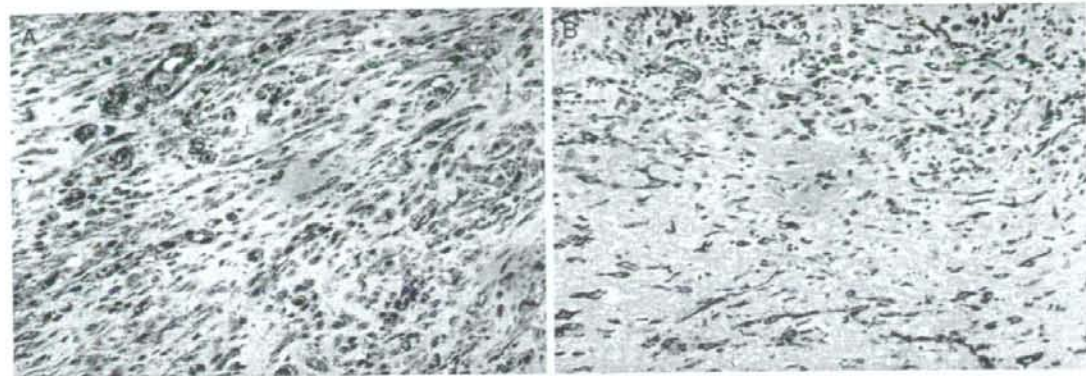


図3 肉腫型胸膜中皮腫の免疫組織学的所見
カルレチニン(A), CAM5.2(B)がともに陽性所見を示す。

悪性中皮腫の治療

1. 化学療法

悪性中皮腫は化学療法剤耐性の悪性腫瘍であり、単剤で効果があるといわれる薬剤でも奏効率は10~30%程度にすぎない。現在化学療法剤で効果があると認められているのは、アンストラサイクリン、プラチナ誘導体(シスプラチン)、代謝拮抗剤(ペメトレキセド)、ゲムシタピンとピノレルピンである。1999年にオーストラリアのByrneら¹⁶⁾はシスプラチン+ゲムシタピンの併用療法で奏効率が47.6%であったと報告した。しかし、追試では奏効率は9~33%とそれほど良いとはいえなかった。

一方、ペメトレキセドは葉酸拮抗剤の中でも、5-FUやメトトレキサートが1つの酵素を阻害するのみであるのに対して、チミジン合成阻害作用のみならず、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、ホルミルトランスフェラーゼなど複数の酵素を同時に阻害することにより抗腫瘍活性を示す薬剤である。胸膜中皮腫を対象とした第III相試験で、ペメトレキセド500mg/m²とシスプラチン75mg/m²を第1日目に併用した226例とシスプラチン75mg/m²単独投与した222例の比較試験が行われた。ペメトレキセドとシスプラチン併用療法では奏効率が41.6%で、生存期間が12.1か月とシスプラチン単剤の場合の奏効率16.7%、生存期間が9.3か月であるのに対してともに有意な効果が報告されている¹⁷⁾。わが国でも臨床試験が行われ、19例中7例(36.8%)に効果が得られており、平

成19年からペメトレキセドの使用が認められた。

腹膜中皮腫では手術可能である腫瘍形成型の場合には腫瘍摘出後、腹腔内にバクリタキセルを注入する方法が推奨されている¹⁸⁾。腹水貯留型の場合にはシスプラチン+アドリマイシンの注入あるいは41℃の温熱療法を用いる方法がとられる場合がある。従来腹膜中皮腫の生存期間の中央値は7~13.5か月であると報告されているが、この方法で治療すれば生存期間の中央値は56か月であったとする報告もある。標準治療として、epidermal growth factor receptor (EGFR) 阻害剤であるゲフィチニブ(イレッサ[®])は悪性中皮腫の97%の患者にEGFRが発現すると報告され、その効果が期待される場所であるが、第II相試験では効果はありとは認められていない¹⁹⁾。一方、platelet-derived growth factor阻害剤であるイマチニブ(グリベック[®])の効果も認められていない。

2. 放射線療法

放射線量として、最低でも50~60Gyが必要であるといわれるが、単独では予後延長の効果がないと報告されている。一方、胸腔内チューブ挿入部や胸腔鏡下生検部位からの腫瘍の進展を阻止するための局所照射には有用である。また、腫瘍の局所浸潤によって発生する痛みに対する緩和作用としての放射線療法は有効であり、対症療法として、使用する場合がある。

3. 胸膜癒着術

胸水の増加を防ぐために、タルク、アドリマイシン、ミノマイシン、ビシパニールを注入