

7. 中皮腫の病理

Pathology of mesothelioma

広島大学大学院医歯薬学総合研究科病理学

井内 康輝

Kouki Inai

(教授)

Summary

アスベストへの曝露によって中皮腫に罹患した患者に対する補償・救済制度の運用の面から、中皮腫の病理診断の精度向上が求められている。中皮腫は正常で中皮細胞が存在する胸膜、腹膜、心膜、精巣鞘膜に発生するが、その中でも胸膜発生例が80～90%と圧倒的に多い。肉眼的には漿膜に沿ってびまん性の進展を示す例が特徴的であるが、限局型も存在する。組織学的には、上皮型、肉腫型、線維形成型、二相型に分けられるが、これら以外に特殊型があり、組織像は多彩である。したがって病理学的には多くの疾患との鑑別診断が必要であり、組織型別に選択された複数の抗体を用いた免疫組織化学的染色が有用となる。鑑別診断の中では特に良悪性の判断が臨床的には最も重要である。診断のための生検においては、浸潤の有無の判断が可能となる十分な組織採取が必要であり、また迅速診断による良悪性の判断は避けるべきである。

Key Words

アスベスト曝露、免疫組織化学、上皮型中皮腫、肉腫型中皮腫、線維形成型中皮腫、二相型中皮腫

はじめに

中皮腫とは、胸膜、腹膜、心膜、精巣鞘膜に存在する中皮細胞・組織に由来する腫瘍である。その成因としては、アスベスト(石綿)への曝露が重視され、中皮腫患者の80%以上に職業上あるいは一般生活環境下(例えば尼崎のアスベストを扱う工場付近に住居がある)におけるアスベストへの曝露が証明される。従来は、職業上の曝露による発生例が大半で、中皮腫患者の多くが職業癌として労災補償を受けてきたが、近年、一般生活環境下での曝露による中皮腫

例の増加が著しく、それらの患者に対する救済制度もつくられるに至った¹⁾。

こうした補償や救済制度では、中皮腫の大半がアスベストへの曝露によるという事実から、中皮腫であるという診断が確かであれば補償・救済が受けられる。中皮腫の診断については、画像診断、血液診断などの臨床診断に不確実な要素が多いことから、病理診断が最終判断として重視される。しかしながら、中皮腫の病理診断にも問題がないとはいえない¹⁾。そこで本稿では、中皮腫の病理診断の実際を紹介し、その問題点を指摘したい。

◆メモランダム◆

免疫組織化学

免疫組織化学は組織標本などにおいて腫瘍細胞の示す分化を把握するために用いられるが、近年、ホルマリン固定パラフィン包埋された通常の病理検査用の組織に利用可能な抗体が数多く開発され、これらの適切な組み合わせは、的確な病理診断を可能にしている。抗体の認識する抗原は多岐にわたり、ケラチンなどの細胞骨格蛋白、細胞膜に発現するホルモンレセプター、p53蛋白に代表される癌関連遺伝子蛋白などがあり、特に分子標的治療の対象となる蛋白の発現の有無は治療効果の予測に直結する。

中皮腫の性別と発生部位

1995年から2006年までの12年間における中皮腫の死亡統計を性別、発生部位別にまとめると表1のようになる²⁾。これによれば、胸膜が65%、腹膜10%、心膜1%ということになるが、部位不明が23%と多い。この不明部位の多くは胸膜、一部は心膜と推測されるので、これらを含めて発生部位を考えると、胸膜は80~90%、心膜は2~3%となると思われる。腹膜は10%程度とみるのが妥当であり、精巣鞘膜については、文献では世界中でこれまで70例程度が報告されているにすぎない³⁾。

肉眼所見

中皮腫はびまん型と限局型に分けられるが、前者が圧倒的に多い。最も多い胸膜例についてその発生・進展様式をみると、まず壁側胸膜に小顆粒状ないし小結節状の病変が出現するが、すぐに播種性に臓側胸膜へ広がり、胸膜に沿って進展して、壁側・臓側胸膜の癒着を起し、肺を取り囲む形態をとる。これが中皮腫の肉眼像の代表的所見とされているが、すでにこの時期は進行期と考えられる。できれば腫瘍の進展が壁側胸膜に留まる間に、あるいは臓側に広がっても胸膜癒着が生じる前に診断できれば切除可能例が増え、患者の予後の改善につながると思われる⁴⁾。

限局型はその数は少ない⁵⁾。従来、限局型とよばれてきた例の多くは、現在、solitary (localized) fibrous tumor (SFT)とよぶ別の腫瘍に属する。この

腫瘍は後述する肉腫型中皮腫と組織像が類似する紡錘形細胞腫瘍であるが、免疫組織化学的染色によって腫瘍細胞にCD34(未分化間葉系細胞のマーカー)が陽性であることで中皮腫とは区別される⁶⁾。肉眼的にも肺内の腫瘍として存在するか、あるいは臓側胸膜から有茎性に胸腔内へ突出する腫瘍をつくることが多い。中皮腫の大半が壁側胸膜から生じることから、SFTは肉眼的にも鑑別が可能である。このSFTを除いて限局型中皮腫の報告をみると、びまん型中皮腫と比べて予後はやや良好である⁷⁾。この増殖態度の違いが何によるものかはいまだ明らかではない。

組織所見

中皮腫の組織分類およびそれぞれが占める割合を表2に示す。中皮組織は本来、上皮細胞様の形態を示す一層の中皮細胞の被覆と、その下の疎な紡錘形細胞の増殖からなり、これら2種類の細胞は起源は同じと考えられる。したがって、中皮腫には上皮型(図1)、肉腫型(図2)、線維形成型(図3)の他に、この両者の混在からなる二相型(少なくとも一方が10%以上混在する例と定義する)が存在するが、二相型は発生学的にみて中皮細胞が本来もつ性格を具現する腫瘍かもしれない。特殊型としては、さまざま

表1 わが国における中皮腫死亡例(1995~2006年)

発生部位	男性(%)	女性(%)	死亡総数(%)
胸 膜	4,636 (79.1)	1,224 (20.9)	5,860 (65.3)
腹 膜	474 (60.9)	304 (39.1)	778 (8.7)
心 膜	41 (62.1)	25 (37.9)	66 (0.7)
その他	135 (73.4)	49 (26.6)	184 (2.1)
部位不明	1,487 (71.3)	599 (28.7)	2,086 (23.2)
計	6,773 (75.5)	2,201 (24.5)	8,974 (100)

表2 中皮腫の組織分類と各組織型の占める割合

組織型	割合
上皮型(epithelioid type)	約60%
肉腫型(sarcomatoid type)	約20%
線維形成型(desmoplastic type)	
二相型(biphasic type)	約15%
特殊型(variants)	数%
脱落膜型(deciduoid type)	
リンパ組織球様型(lymphohistiocytoid type)	
高分化乳頭状型(well differentiated papillary type)	
小細胞型(small cell type)	

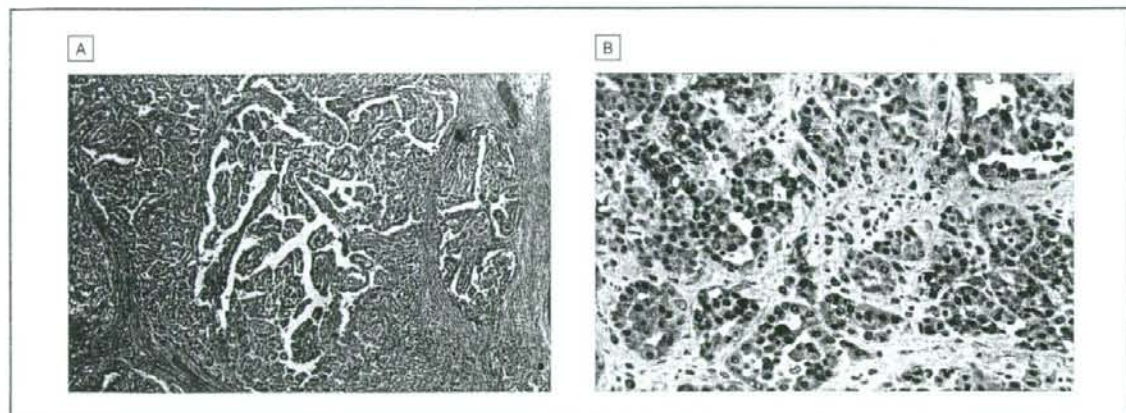


図1 上皮型中皮腫の組織像

- A : 上皮様細胞の乳頭腺管様構造をとる増殖を示す(H&E 染色, 中拡大)。
 B : 図1-A の calretinin の免疫組織化学的染色像。腫瘍細胞の核に強陽性, 細胞質に弱陽性を示す(強拡大)。

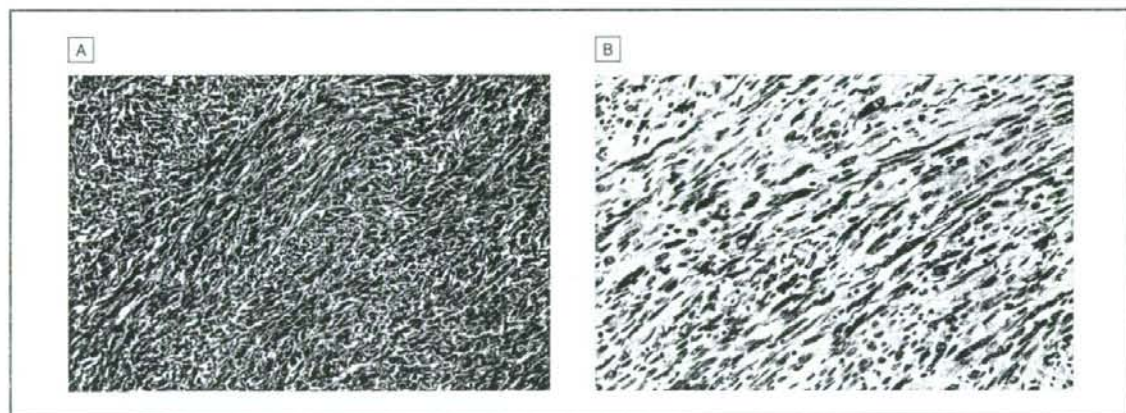


図2 肉腫型中皮腫の組織像

- A : 紡錘形細胞肉腫様の所見を示す(H&E 染色, 中拡大)。
 B : 図2-A の CAM 5.2 の免疫組織化学的染色像。腫瘍細胞の細胞質は強陽性を示す(強拡大)。

な組織像を示す例が報告されているが、これらについては中皮腫としての診断をより慎重に検討する必要がある症例が多い。

病理学的鑑別診断

前述のように、中皮腫の組織像は極めて多彩なので、H&E 染色組織標本のみでは鑑別すべき疾患あるいは病変

は表3のようにあげられる。これらについて、画像所見を中心とした臨床診断を参考にしながら鑑別をすすめていく必要があるが、現状では表4にあげている抗体を用いた免疫組織化学

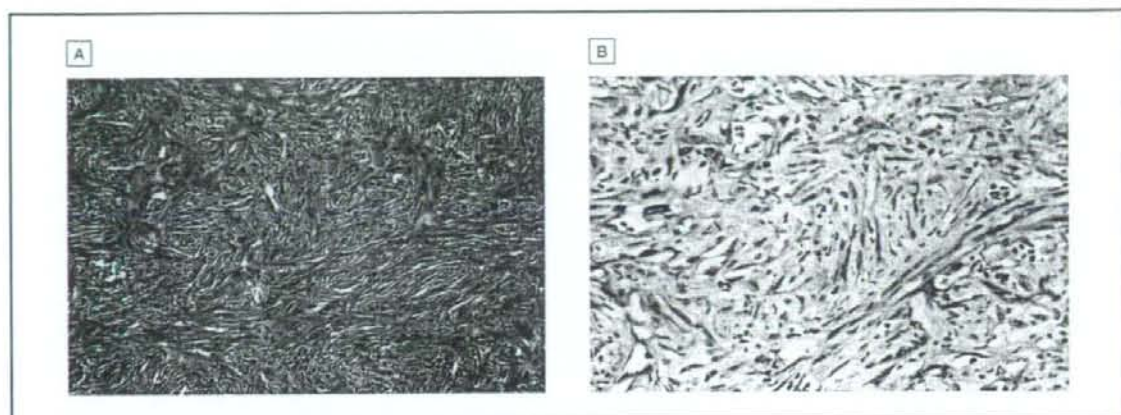


図3 線維形成型中皮腫の組織像

A: 肉芽様の線維性結合組織の増殖内に異型の低い紡錘形細胞をみる(H&E染色, 中拡大)。
 B: 図3-AのCAM 5.2の免疫組織化学的染色像。紡錘形細胞の細胞質は陽性を示す(強拡大)。

表3 中皮腫と鑑別すべき疾患・病変

組織型	発生部位	鑑別すべき疾患・病変
上皮型	胸膜	肺腺癌の浸潤 転移性腺癌 反応性中皮細胞過形成
	腹膜	卵巣の漿液性乳頭状腺癌, 淡明細胞癌 腹膜の漿液性癌
肉腫型	胸膜	胸膜・胸壁の肉腫 肺肉腫様癌の浸潤
	腹膜	腹膜・腸管・子宮・付属器等の肉腫
線維形成型	胸膜	線維性胸膜炎
二相型	胸膜	滑膜肉腫 肺癌肉腫・肺芽腫
	腹膜	子宮・卵巣の癌肉腫

表4 中皮腫と他の悪性腫瘍の鑑別診断に必要な免疫組織化学的染色の抗体

組織型	発生部位	用いる抗体
上皮型	胸膜	calretinin (+), WT-1 (+), D2-40 (+), thrombomodulin (+) CEA (-), TTF-1 (-), SPA (-), Napsin A (-)
	腹膜	calretinin (+), D2-40 (+), ER (+) Ber EP 4 (-), MOC 31 (-)
肉腫型	胸膜・腹膜	CAM 5.2 (+), AE 1/AE 3 (+), WT-1 (+), D2-40 (+) desmin (-), S-100 (-), CD 34 (-), MyoD 1 (-)

的染色による鑑別が必須である⁷⁾⁸⁾。

特に鑑別の困難な例として、肉腫型中皮腫と肺の肉腫様癌(sarcomatoid carcinoma)がある。肉腫型中皮腫と他の肉腫との鑑別では cytokeratin (抗体名 CAM 5.2 あるいは AE 1/AE 3) の陽性所見が有用であるが、肺原発の肉腫様癌が胸膜に進展した場合は cytokeratin 陽性となり、鑑別には使えない。陽性率において明確な差異のある他の抗体も見出されておらず、この両者については、画像所見において肺内の腫瘤があるか否かを決め手とすることが多い⁹⁾。

病理診断において最も重要な鑑別は、中皮腫と良性病変との鑑別である⁹⁾。浸潤がない、あるいは早期浸潤に留まる中皮細胞の増殖を上皮型中皮腫と診断できれば、患者の救命につながる可能性が大きい。臨床医が胸膜の肥厚が目立たない段階での早期例の発見に

表5 上皮型中皮腫と中皮細胞過形成の鑑別に用いる免疫組織化学的染色

抗体	上皮型中皮腫	反応性中皮細胞過形成
EMA	+ (97.2%)	-
desmin	-	+ (73%)
p53 蛋白	+ (52.9%)	-

表6 線維形成型中皮腫と線維性胸膜炎の鑑別に用いる所見

線維形成型中皮腫	線維性胸膜炎
(-)	zonation (胸膜表面近くで細胞密度が高い)あり
(-)	胸膜表面に垂直な毛細血管の増生
(-)	細胞の異型性あり
間質への浸潤	(-)
壊死	(-)
肉腫様増殖	(-)

努力している現状では、早期の中皮腫であるか否かの判断が病理医の重大な責務となる。

良悪性の判断については、脂肪組織等への浸潤のない例は中皮腫とよぶべきではなく「atypical mesothelial proliferation」と診断するという立場もあるが¹⁰⁾、一方、免疫組織化学的染色もあわせて良悪の判断は可能とする立場もある。われわれは後者の立場に立つが、その鑑別において有用となる免疫組織化学的染色に用いる抗体を表5に示す。すなわち、EMAとp53蛋白が陽性でdesminが陰性であれば中皮腫である確率は高い¹¹⁾。

一方、線維形成型あるいは肉腫型中皮腫と線維性胸膜炎の間の鑑別については、しばしば誤った判断がなされている。その鑑別点は表6のようにあげられているが¹⁰⁾、zonation (胸膜表面近くで細胞密度が高い)をみるため

には、胸膜生検に際して胸膜表面から垂直に脂肪組織に達するような組織採取が求められる。表層のみの材料では、しばしば紡錘形細胞に異型があるという理由で中皮腫とされやすい。また、免疫組織化学的染色を行った場合、その解釈を誤っている場合も多い。胸膜炎に出現する紡錘形細胞はkeratin陽性、calretinin陽性である。さらにdesmin、 α -SMAも陽性となり、中皮腫細胞ではdesminが陰性になることが多いという事実のみが鑑別に用いることができる⁹⁾。

おわりに

中皮腫の病理診断は難しい。これまで多くの医療機関では中皮腫の診断を下す機会は少なく、1人ひとりの病理医の経験も限られてきたことが難しさを助長している。中皮腫への関心の高まりとともに病理診断講習会などに

よって少しずつ病理診断の精度は向上しつつあるが、判断に困る場合は適切なコンサルテーションが必要と思われる。

また、術中の迅速診断による中皮腫の判断は避けるべきである。前述のように、多種類の免疫組織化学的染色の組み合わせによって診断している現状では、迅速に判断できるのは明らかな浸潤性増殖を示す高分化な上皮型に限られる。迅速標本によるあいまいな診断より、前述した適切な生検材料を永久標本で可能な限り早く回答することを心掛けることが肝要であろう。

文献

- 1) 井内康輝：中皮腫の病理診断の精度向上：現状と将来。肺病 47：945-950, 2007
- 2) 厚生労働省：人口動態統計。平成7年～平成18年
- 3) Hatzinger M, Häcker A, Langbein S, et al：Malignant mesothelioma of the testis. Aktuelle Urol 37：281-283, 2006
- 4) 井内康輝, 武島幸男, 柳谷 桂：中皮腫の病理。肺病 47：223-232, 2007
- 5) Allen TC, Cagle PT, Churg AM, et al：Localized malignant mesothelioma. Am J Surg Pathol 29：866-873, 2005
- 6) 武島幸男, 井内康輝：胸膜のLocalized (Solitary) fibrous tumorの病理。病理と臨床 22：708-712, 2004
- 7) Kushitani K, Takeshima Y, Amatya VJ, et al：Immunohistochemical marker panels for distinguishing between epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. Pathol Inter 57：190-199, 2007
- 8) Kushitani K, Takeshima Y, Amatya VJ, et al：Differential diagnosis of

sarcomatoid mesothelioma from true sarcoma and sarcomatoid carcinoma using immunohistochemistry. *Pathol Inter* 58 : 75-83, 2008

9) 柳谷 桂, 武島幸男, 井内康輝: 中皮細胞増殖の良・悪性の病理組織学的鑑別診断. MOOK 肺癌の臨床 2008-2009, 篠原出版社, 東京 (in press)

10) Churg A, Cagle PT, Roggli VL : Separation of benign and malignant mesothelial proliferations : Tumors of the Serous Membrane, AFIP Atlas of Tumor Pathology : Fourth Series : Fascicle 3. pp 83-101, ARP press, Maryland, 2006

11) King J, Thatcher N, Pickering C, et

al : Sensitivity and specificity of immunohistochemical antibodies used to distinguish between benign and malignant pleural disease : a systemic review of published reports. *Histopathology* 49 : 561-568, 2006

最新医学・第62巻・第1号 (2007年1月号 別刷)

特集 アスベストによる健康障害

中皮腫の病理診断のストラテジー

—免疫組織化学的染色の有用性—

井内康輝 武島幸男 櫛谷 桂

最新医学社

● アスベスト関連疾患の診断

中皮腫の病理診断のストラテジー

—免疫組織化学的染色の有用性—

井内康輝*** 武島幸男** 櫛谷 桂*

要 旨

中皮腫の病理診断は難しいが、その理由としては組織像が多彩であることや個々の医療機関での経験数が少ないことなどが挙げられる。上皮型、肉腫型、二相型、線維形成型のそれぞれに多くの鑑別すべき疾患や病変があるが、これらの鑑別のためには免疫組織化学的染色が有用である。しかし単一の抗体で診断できるものはなく、幾つかの抗体の組み合わせによる総合的判断が必要である。

はじめに

中皮腫の病理診断は難しい。その理由としては、組織像が多彩であり、鑑別すべき疾患や病変が数多くあることが挙げられる。また、本邦においては1990年頃までは中皮腫はまれな腫瘍であり、個々の医療機関別に見ると1年に1例程度の診断にとどまることから、診断を下す病理医に経験が乏しいこともある。しかし近年の中皮腫発生の急速な増加と、労災補償制度とは別に一般生活環境下でのアスベストばく露による健康被害に対する新たな救済制度が発足したことによって、中皮腫の診断が正確に行われることが強く求められることになった。そこで本稿においては、中皮腫の病理学的な確定診断に至るための方法

を紹介し、全国的に統一した基準によって中皮腫の診断がなされるための一助としたい。

中皮腫の鑑別診断

中皮腫の診断に当たってはまず、その発生部位が胸膜、腹膜、心膜、精巣鞘膜に限定されること、肉眼的にはその大半が漿膜に沿ってびまん性に進展するという特徴を持つことを念頭に置く必要がある。例えば胸膜発生例では、初期には壁側胸膜に小結節を散布性に認めるのみであっても、早晩、肺を圍繞するような進展を示し、中皮腫として特徴的な肉眼像を示す(図1)。

一方、中皮腫の組織像は多彩である。基本的には上皮様細胞が乳頭腺管状を示す上皮型(図2)、紡錘形あるいは多角形細胞が特有の配列構造を示さずに増殖する肉腫型(図3)、これらが互いに10%以上混在する二相型、さらに肉腫型の亜型として細胞成分の低い瘢痕様の線維性結合組織が大半を占める線維形

* 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 病理学

** 同 助教授 *** 同 教授

キーワード：中皮腫、病理診断、免疫組織化学、抗体

図1 胸膜中皮腫の肉眼像



肺を圍繞するようなびまん性の進展を示す。

成型に分けられるが、これら以外にも多くの特殊型がある(表1)¹⁾。こうした組織像の多彩性からは、鑑別すべき疾患や病変が数多く挙げられることになるが(表2)、これらはいずれをとっても HE 染色の組織所見のみでは鑑別が難しいと言える。

従来の中皮腫の診断

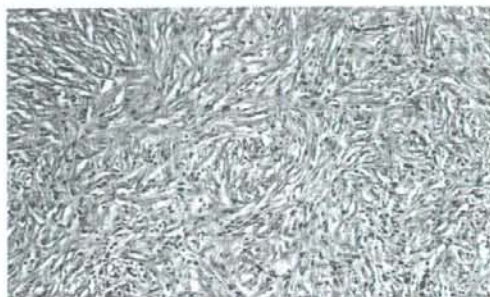
上皮型中皮腫で分化度の高い例ではヒアルロン酸の産生が見られるので、これが中皮腫とする根拠として従来広く用いられてきた。すなわち、腫瘍細胞の細胞質内の小空胞および細胞膜表面あるいは腫瘍細胞の作る腺腔や囊胞内に貯留する内容物が、アルシンプルー染色やコロイド鉄染色などによって陽性となる。さらにこの陽性所見はヒアルロナーゼによる消化後には減弱ないし消失すること

図2 上皮型中皮腫の組織像



上皮様細胞の乳頭腺管状の増殖をみる。

図3 肉腫型中皮腫の組織像



紡錘形細胞肉腫と類似した所見を示し、この像のみで中皮腫とは診断できない。

で、これが酸性粘液多糖類の中でも特にヒアルロン酸を多く含む粘液であることが証明されれば中皮腫の診断の根拠となる。しかし上皮型でも、腺腔構造が明瞭でなく充実性増殖が主体となる低分化型の場合は、ヒアルロン酸の産生は少ない。一方肉腫型では、他の肉腫においても間質にはしばしばヒアルロン酸を含む酸性粘液多糖類を見るので、この所見のみに頼って診断することは誤った結論を招きかねない。

また、従来は電子顕微鏡による観察が中皮腫の診断に有用とされてきた。すなわち、中皮腫の腫瘍細胞ではその細胞表面に細く長い微絨毛(microvilli)が密在するが、この微絨毛の長さとの幅の比(length-width ratio)は、肺の腺癌のみならず他臓器からの転移性腺癌と比べて中皮腫では有意に大きいことが示さ

表1 中皮腫の組織分類

1. 上皮型	Epithelioid mesothelioma
2. 肉腫型	Sarcomatoid mesothelioma
線維形成型	Desmoplastic mesothelioma
3. 二相型	Biphasic mesothelioma
4. 特殊型	Variants
1) リンバ組織球様	Lymphohistiocytoid mesothelioma
2) 脱落膜様	Deciduoid mesothelioma
3) 退形成性	Anaplastic mesothelioma
4) その他	Others

表2 中皮腫と鑑別すべき代表的な疾患

上皮型	←→ 腺癌 (肺, 卵巣などの原発) 反応性中皮細胞過形成
肉腫型	←→ 肉腫 (平滑筋肉腫, 横紋筋肉腫, 悪性線維性組織球腫など) 肺の肉腫様癌 (紡錘細胞型, 多形細胞型など)
二相型	←→ 癌肉腫 (肺, 卵巣などの原発) 肺芽腫 滑膜肉腫
線維形成型	←→ 線維性胸膜炎

れている²⁾。この所見も、上皮型中皮腫でしかも分化の良い中皮腫では容易に見いださる所見であるが、分化度の低い場合や肉腫型中皮腫では見いだしにくい。さらに電子顕微鏡観察は、材料の固定、包埋に通常の光顕観察標本の作成とは全く異なる作業が必要であり、また薄切、染色、観察の作業にも多くの時間を要することから、どの医療機関でもルーチンに行えるものではないという欠点がある。

鑑別診断における免疫組織化学的染色の有用性

近年、中皮腫の確定診断のためには免疫組織化学的染色を行うべきであるという認識が定着しつつある。鑑別に用いることのできる多くの抗体があるが、単一で診断できるほど優れた抗体があるのではなく、中皮腫で陽性

となる抗体と陰性となる抗体を組み合わせると総合的に判断することが必須である。さらに前述した中皮腫の組織型によって用いるべき抗体の選別が必要であり、HE染色標本によって組織型を決め、それに合わせて免疫組織化学的染色を行うことが肝要である。染色標本の陽性・陰性の判断も難しい。すなわち、腫瘍細胞がびまん性に陽性あるいは陰性の所見を示す場合は判断は容易であるが、数%の腫瘍細胞が陽性を示すのみの場合にどう判断するかは難しく、またその陽性部位が本来陽性となるはずの部位(核, 細胞質, 細胞膜など)であるのか否かも重要な判断材料となる。こうした点は、中皮腫に限らず他の腫瘍の診断においても共通する免疫組織化学的染色による診断の pitfall と言えよう。

上皮型中皮腫と肺腺癌との鑑別のための免疫組織化学的染色結果の比較を表3に示す³⁾。

表3 上皮型中皮腫と肺腺癌の免疫組織化学的染色の比較

抗体	陽性例 (%)		p-value
	上皮型中皮腫	肺腺癌	
calretinin	83/87 (95.4)	17/51 (33.3)	<0.001
WT1	82/84 (97.6)	8/51 (15.7)	<0.001
AE1/AE3	88/88 (100)	51/51 (100)	—
CAM5.2	84/87 (96.6)	51/51 (100)	0.18
cytokeratin 5/6	54/78 (69.2)	21/51 (41.2)	0.0016
vimentin	80/88 (90.9)	24/51 (47.1)	<0.001
EMA	84/88 (95.5)	51/51 (100)	0.12
thrombomodulin	57/84 (67.9)	10/51 (19.6)	<0.001
mesothelin	64/83 (77.1)	36/51 (68.6)	0.40
CEA	6/86 (7.0)	50/51 (98.0)	<0.001
CA19-9	7/40 (17.5)	37/51 (72.5)	<0.001
CA125	34/40 (85)	41/51 (80.4)	0.57

表4 肉腫型中皮腫と肉腫の免疫組織化学的染色の比較

抗体	陽性例 (%)		p-value
	肉腫型中皮腫	肉腫	
calretinin	39/44 (88.6)	14/47 (29.8)	<0.001
WT1	39/44 (88.6)	20/47 (42.6)	<0.001
AE1/AE3	38/44 (86.4)	2/47 (4.3)	<0.001
CAM5.2	41/44 (93.2)	3/47 (6.4)	<0.001
EMA	22/44 (50)	5/47 (10.6)	0.001
desmin	5/44 (11.4)	25/47 (53.2)	<0.001
α -SMA	24/42 (57.1)	28/47 (59.6)	0.81
S-100p	18/41 (43.9)	17/47 (36.2)	0.46
CD34	2/37 (5.4)	20/47 (42.6)	0.0001
KP-1	27/41 (65.9)	38/47 (80.9)	0.11

カルレチニンの中皮腫の腫瘍細胞の核に強く、細胞質に弱く陽性であり(図4), WT1 もほぼ同様である。サイトケラチンの抗体であるCAM5.2, AE1/AE3 はともに細胞質に強く陽性であり、ビメンチンも同様に細胞質に強く陽性である。EMA, トロンボモジュリンは細胞膜に陽性となる。D2-40 も細胞膜に陽性である(図5)。一方、CEA, TTF-1, Naspin A は肺腺癌で陽性となり、中皮腫では陰性である。これらの結果を感度、特異度の

面から検討して鑑別に必要な抗体の組み合わせを考えてみると、中皮腫と診断するためには、陽性マーカーとして核に陽性となるカルレチニンあるいはWT1, および細胞膜に陽性となるトロンボモジュリンあるいはD2-40を用い、陰性マーカーとしてCEAあるいはTTF-1を用いることが勧められる。

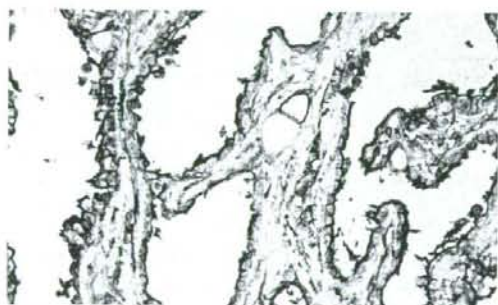
肉腫型中皮腫と肉腫との鑑別のための免疫組織化学的染色結果の比較を表4に示す⁴⁾。上皮型中皮腫の良いマーカーであったカルレ

図4 上皮型中皮腫のカルレチニンの免疫組織化学的所見



核に強く、細胞質に弱く陽性である。

図5 上皮型中皮腫のD2-40の免疫組織化学的所見



細胞膜に陽性所見をみる。

図6 肉腫型中皮腫のCAM5.2の免疫組織化学的所見



細胞質に陽性所見をみる。

チニンは80%以上に陽性ではあるが、肉腫型では限局性で陽性度も弱い例が多い。EMAなどの上皮型中皮腫で細胞膜に陽性となる抗体も、陽性率は低く陽性度も弱い。一方、真の肉腫ではサイトケラチンの陽性率は低く、

感度、特異度の面から選択するとCAM5.2(図6)あるいはAE1/AE3が陽性マーカーとして勧められる。一方、HE染色像から予想される肉腫のそれぞれに特異的に陽性となる抗体を、肉腫型中皮腫としては陰性マーカーとして用いるのが良い。例えば、平滑筋肉腫であればデスミン、h-カルデスモン、横紋筋肉腫であればミオグロビン、myoDI, localized (solitary) fibrous tumorであればCD34などである。なおS100タンパク質は神経鞘腫瘍の良いマーカーであるが、肉腫型中皮腫例でも50%近くが陽性となる。

肉腫型中皮腫では、肺原発の肉腫様癌(紡錘形細胞肉腫、多形細胞肉腫など)との鑑別が必要である。HE染色所見および上記の免疫組織化学的所見では鑑別ができない。すなわち、ともにCAM5.2あるいはAE1/AE3は陽性であり、肉腫のマーカーは陰性である。したがって、この鑑別には肉眼所見が極めて大切である。肺内に腫瘤のある例は肉腫様癌であり、肺内に腫瘤が認められず胸膜に沿って肺を囲繞するように広がる場合は中皮腫であるという判断が合理的と言えよう。

線維形成型中皮腫と線維性胸膜炎との鑑別では、まずHE染色にて胸膜炎では層状構造(zonation)を見ることが重要な点である⁵⁾。すなわち、胸腔側で細胞密度が高く、胸腔面に垂直で細長い毛細血管を数多く認め、一方胸壁側深部では次第に細胞成分が乏しくなるという所見は胸膜炎を示唆する。免疫組織化学的染色では中皮腫でも胸膜炎でも紡錘形細胞にサイトケラチン、カルレチニンが陽性となるが、デスミンについては胸膜炎では陽性、中皮腫では陰性であることが多く、この点は鑑別に際して参考となる。

ブラの周囲などで反応性の過形成を示す中皮と上皮型中皮腫の鑑別も必要となる。過形成ではデスミンが陽性、EMA, p53が陰性となり、中皮腫ではデスミンが陰性、EMA

と p53 が陽性となることが多い点は鑑別に参考となる⁶⁾。

おわりに

中皮腫の病理診断は、現時点では免疫組織化学的染色の結果を重視することが勧められる。より一層の精度の向上を図るためには今後、中皮腫に特異的な分子・遺伝子レベルの変化が見いだされ、これを診断に応用することが可能になることが必要であろう。

文 献

- 1) 井内康輝, 他: 中皮腫の病理. 病理と臨床 22 (7): 681-686, 2004.
- 2) 小武家俊博, 他: 悪性中皮腫, とくに肉腫型の診断ならびに上皮型中皮腫と腺癌との鑑別. 病理と臨床 5 (12): 1290-1299, 1987.
- 3) Kushitani K, et al: Immunohistochemical panels for distinguishing between epithelioid mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma. Pathol Int. (in press)
- 4) Kushitani K, et al: Differential diagnosis between sarcomatoid mesothelioma and sarcoma-usefulness of immunohistochemistry. (in submitted)
- 5) US-Canadian Mesothelioma Reference Panel: The separation of benign and malignant mesothelial proliferations. Am J Surg Pathol 24 (9): 1183-1200, 2000.
- 6) Cury P M, et al: The use of histological and immunohistochemical markers to distinguish pleural malignant mesothelioma and *in situ* mesothelioma from reactive mesothelial hyperplasia and reactive pleural fibrosis. J Pathol 189 (2): 251-257, 1999.

Strategy of Pathological Diagnosis on Mesothelioma -Usefulness of Immunohistochemical Stainings-

Kouki Inai, Yukio Takeshima, Kei Kushitani

Department of Pathology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

Original Article

Immunohistochemical marker panels for distinguishing between epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma

Kei Kushitani, Yukio Takeshima, Vishwa Jeet Amatya, Osamu Furonaka, Akio Sakatani and Kouki Inai

Department of Pathology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

The distinction between epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma remains an important diagnostic challenge for surgical pathologists. The aim of the present study was to select a limited and appropriate panel of antibodies that can differentiate between epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. Specimens of 90 epithelioid mesotheliomas and 51 lung adenocarcinomas obtained from Japanese cases were examined using calretinin, WT1, AE1/AE3, CAM5.2, cytokeratin (CK) 5/6, vimentin, epithelial membrane antigen (EMA), thrombomodulin, CEA, CA19-9, and CA125. Ninety-six percent of epithelioid mesotheliomas were positive for calretinin; 99% for WT1; 100% for AE1/AE3; 97% for CAM5.2; 70% for CK 5/6; 91% for vimentin; 96% for EMA; 71% for thrombomodulin; 77% for mesothelin; 7% for CEA; 17% for CA19-9; and 85% for CA125. In contrast, 33% of lung adenocarcinomas were positive for calretinin; 16% for WT1; 100% for AE1/AE3, CAM5.2, and EMA; 41% for CK 5/6; 47% for vimentin; 20% for thrombomodulin; 69% for mesothelin; 98% for CEA; 73% for CA19-9; and 80% for CA125. For distinguishing between epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma, the combination of CEA, calretinin and each WT1 or thrombomodulin was suggested to be the best panel of immunohistochemical markers.

Key words: adenocarcinoma, calretinin, CEA, immunohistochemistry, mesothelioma, thrombomodulin, WT1

The differential diagnosis between epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma is a well-known diagnostic challenge in surgical pathology, and it is of critical importance for proper clinical management and in view of the increasing

number of claims involving job-related asbestos exposure. Both the tumors may involve the pleural surfaces and, in some instances, their overlapping histological features preclude a firm diagnosis based on conventional light microscopic observations. Several ancillary diagnostic techniques, including histochemistry, electron microscopy, and immunohistochemistry (IHC), have been proposed to assist in the diagnosis of epithelioid mesothelioma. The diagnostic utility of conventional histochemical stains is limited. Lung adenocarcinomas are not consistently positive for intracytoplasmic mucicarmine and PAS after diastase digestion. Furthermore, this reaction has been observed in a few epithelioid mesotheliomas.¹ The alcian blue-positive, hyaluronidase-sensitive reaction has also been reported in lung adenocarcinomas.¹ Electron microscopy has proven to be useful and is often considered as the gold standard in the diagnosis of epithelioid mesothelioma.^{2,3} However, electron microscopic study generally requires great expense and a lot of time compared with the other diagnostic techniques, and the morphological ultrastructural features of mesothelial differentiation may not be apparent in the less-differentiated tumors.

Since the last decade, various immunohistochemical markers that can facilitate the diagnosis of epithelioid mesothelioma have become available.^{4,5} A particular issue is the lack of reliable positive markers for mesothelial cells in formalin-fixed, paraffin-embedded sections, although several reports have claimed variable results.^{4,5} To date, many of the routinely used probes such as CEA, BerEP4, B72.3, and CD15 stain the carcinoma cells in adenocarcinomas but not those in mesotheliomas. Over the past few years, a number of markers that react with epithelioid mesotheliomas but not with adenocarcinomas have become commercially available; but the number of studies that have evaluated the practical use of these antibodies is limited, and the results are controversial.⁵

In the present study, 12 of the most promising commercially available antibodies were examined on routine histological specimens of epithelioid mesotheliomas and lung adenocarcinomas obtained from Japanese cases. These

Correspondence: Kouki Inai, MD, PhD, Department of Pathology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan. Email: koinai@hiroshima-u.ac.jp

Received 11 July 2006. Accepted for publication 27 November 2006.

© 2007 The Authors

Journal compilation © 2007 Japanese Society of Pathology

Table 1 Antibodies used in this study

Antibody to	Clone	Source	Dilution	Retrieval†
Calretinin	Poly	Zymed, San Francisco, CA, USA	1:100	MW, 5 min
WT1	6F-H12	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:400	AC, 120°C, 20 min
Cytokeratin-multi	AE1/AE3	Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK	1:100	MW, 5 min
Cytokeratin (CAM5.2)	2A4	Becton-Dickinson, Mountainview, CA, USA	Pre-diluted	MW, 5 min
CK 5/6	D5/16B4	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:50	MW, 5 min
Vimentin	V9	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:100	MW, 5 min
EMA	E29	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:100	MW, 5 min
Thrombomodulin	1009	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:1600	No retrieval
Mesothelin	5B2	Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK	1:20	MW, 5 min
CEA	Poly	Immuno-Biomedical Laboratories, Takasaki, Japan	1:40	MW, 5 min
CA19-9	OV185:1	TFB, Tokyo, Japan	1:1	MW, 5 min
CA125	116NS19-9	TFB, Tokyo, Japan	Pre-diluted	MW, 5 min

†In citrate buffer (pH 6.0).

AC, autoclave; CK, cytokeratin; EMA, epithelial membrane antigen; MW, microwave; WT1, Wilms' tumor gene product.

antibodies were tested to clarify the contribution of IHC in the differential diagnosis of these two tumor types and to confirm a specific type of battery of antibodies that can be used in any pathological department or laboratory.

MATERIALS AND METHODS

Patients and histological samples

We used paraffin-embedded specimens from 90 patients with a definite histological diagnosis of mesothelioma who had undergone thoracoscopic pleural biopsy, percutaneous needle biopsy, surgical decortication, or autopsy conducted between 1995 and 2005. These specimens were retrieved from the archives of the Department of Pathology at Hiroshima University and from 36 other institutes. These 90 cases were divided into 71 cases of epithelioid mesotheliomas and 19 cases of biphasic mesotheliomas. In the present study, immunohistochemical evaluation for the sarcomatoid component of the biphasic mesotheliomas was excluded. Paraffin-embedded histological samples of the surgical specimens from 51 patients with a histological diagnosis of primary lung adenocarcinoma were obtained at segmentectomy, lobectomy, or pneumonectomy conducted between 2003 and 2005. These samples were retrieved from the archives of the Department of Pathology at Hiroshima University.

Each of the tumor specimens was reviewed by three pathologists (K. I., Y. T., and K. K.), and all mesothelioma cases were diagnosed using the currently accepted histological criteria combined with the immunohistochemical features.

Immunohistochemical procedures

Immunostaining was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections using the avidin-biotin-peroxidase method (ABC) with Histofine SAB-PO kit (Nichirei, Tokyo, Japan). The primary antibodies used in the present study are as follows: calretinin, WT1, pan-cytokeratin (AE1/AE3), CAM5.2, cytokeratin 5/6 (CK 5/6), vimentin, epithelial membrane antigen (EMA), thrombomodulin, mesothelin, CEA, CA19-9 and CA125. Dilution and incubation times of each marker are shown in Table 1.

Immunoreactivity was scored as negative (no immunostaining) or positive. The grade of the immunostained cells was recorded as follows: 1+, 1–25%; 2+, 26–50%; 3+, 51–100%. The scoring was performed based on the extent of positive cells, regardless of intensity. Several combinations of specific and sensitive immunohistochemical findings were analyzed in order to identify the most specific and sensitive combination that can be used for the differential diagnosis of these two tumor types.

Table 2 Immunohistochemical findings in mesothelioma

Markers	Positive cases		Grading of reactivity			
	<i>n</i>	%	0	1+	2+	3+
Calretinin	85/89	95.5	4	13	8	64
WT1	85/86	98.8	1	23	14	48
AE1/AE3	89/89	100	0	6	5	78
CAM5.2	85/88	96.6	3	3	6	76
CK 5/6	56/80	70	24	28	14	14
Vimentin	81/89	91.0	8	26	18	37
EMA	85/89	95.5	4	17	17	51
Thrombomodulin	60/85	70.6	25	38	13	9
Mesothelin	65/84	77.4	19	5	15	45
CEA	6/88	6.8	82	4	1	1
CA19-9	7/41	17.1	34	5	2	0
CA125	35/41	85.4	6	6	10	19

CK, cytokeratin; EMA, epithelial membrane antigen.

Table 3 Immunohistochemical findings in adenocarcinoma

Markers	Positive cases		Grading of reactivity			
	<i>n</i>	%	0	1+	2+	3+
Calretinin	17/51	33.3	34	12	3	2
WT1	8/51	15.7	43	8	0	0
AE1/AE3	51/51	100	0	1	0	50
CAM5.2	51/51	100	0	0	0	51
CK 5/6	21/51	41.2	30	17	4	0
Vimentin	24/51	47.1	27	10	11	3
EMA	51/51	100	0	1	0	50
Thrombomodulin	10/51	19.6	41	6	3	1
Mesothelin	35/51	68.6	17	19	8	7
CEA	50/51	98.0	1	3	6	41
CA19-9	37/51	72.5	14	22	5	10
CA125	41/51	80.4	10	12	10	19

CK, cytokeratin; EMA, epithelial membrane antigen.

RESULTS

Immunohistochemical profiles of epithelioid mesotheliomas and lung adenocarcinomas

The immunohistochemical results are summarized in Tables 2 and 3, and a brief description of the reactivity of each antibody is presented here.

Calretinin

In epithelioid mesotheliomas, the staining reaction was generally strong and diffuse, and a positive finding was observed in both the cytoplasm and the nucleus (Fig. 1a). In contrast, the staining reaction was limited to <10% of the carcinoma cells in most lung adenocarcinomas.

WT1

In the majority of epithelioid mesotheliomas, the staining reaction was strong and diffuse, and it was confined to the

nuclei (Fig. 1b). In all eight lung adenocarcinomas that had positive reactivity, the reaction was focal (1+) and weak.

AE1/AE3 and CAM5.2

All epithelioid mesotheliomas and most lung adenocarcinomas were positive for AE1/AE3 and CAM5.2. A cytoplasmic staining pattern was observed.

CK 5/6

The majority of epithelioid mesotheliomas had a staining reaction that was limited to <50% of the tumor cells. In most of the lung adenocarcinomas, the reaction was focal (1+).

Vimentin

In both epithelioid mesotheliomas and lung adenocarcinomas, vimentin was expressed throughout the cytoplasm.

EMA and thrombomodulin

In both epithelioid mesotheliomas and lung adenocarcinomas, a cytoplasmic staining pattern was observed with accentuation of the reaction along the cell membranes (Fig. 1c).

Mesothelin

In epithelioid mesotheliomas, the staining reaction was usually strong and diffuse, and it was characterized by thick membranous reactivity, particularly along the apical cell membrane (Fig. 2a). In lung adenocarcinomas, the reaction was focal and weak, and its pattern was less consistent; that is, in some cases the reaction was observed along the apical cell membrane, and in others it was cytoplasmic or mixed membranous and cytoplasmic (Fig. 2b).

CEA, CA19-9 and CA125

In lung adenocarcinomas, a cytoplasmic staining pattern was observed with accentuation of the reaction along the cell membrane (Fig. 3a). The grade was 1+ in a few epithelioid mesotheliomas that had a positive reaction.

Specificity and sensitivity of each immunohistochemical antibody for epithelioid mesothelioma

The comparison of the immunoreactivity between epithelioid mesotheliomas and lung adenocarcinomas is shown in Table 4. The results indicated that calretinin, CK 5/6, vimentin, and thrombomodulin are the positive markers for epithelioid mesothelioma, and CEA and CA19-9 are the negative markers.

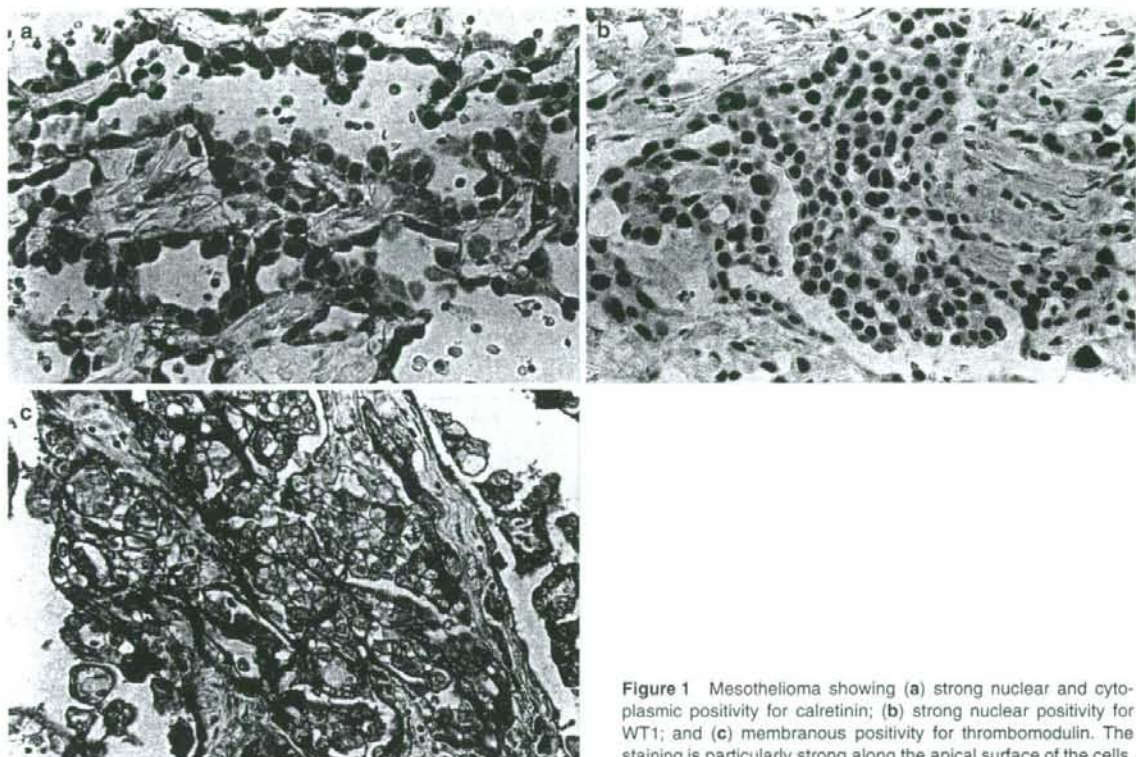


Figure 1 Mesothelioma showing (a) strong nuclear and cytoplasmic positivity for calretinin; (b) strong nuclear positivity for WT1; and (c) membranous positivity for thrombomodulin. The staining is particularly strong along the apical surface of the cells.

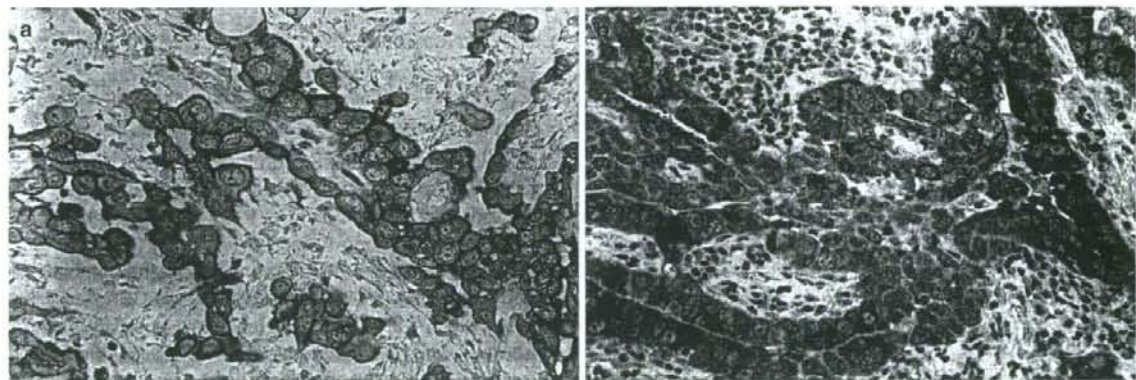


Figure 2 (a) Mesothelioma with strong positivity for mesothelin. The staining is particularly strong along the apical surface of the cells. (b) Adenocarcinoma with mesothelin positivity.

The sensitivity and specificity of one, two, or three antibodies for the diagnosis of epithelioid mesothelioma are indicated in Tables 5–7.

When each positive marker was observed, WT1 had the highest sensitivity and specificity in epithelioid mesotheliomas, and it was suggested to be the most useful positive

marker of epithelioid mesothelioma. The sensitivity of calretinin was as high as WT1, but it was inferior to WT1 with respect to specificity. Thrombomodulin followed WT1 with respect to high specificity but it was inferior to WT1 and calretinin. Among the positive markers of lung adenocarcinoma, CEA had the highest sensitivity and specificity.

Table 4 Comparison of immunohistochemical findings between mesotheliomas and adenocarcinomas

Markers	Positive cases				P (Fisher's exact test)
	Mesotheliomas		Adenocarcinomas		
	n	(%)	n	(%)	
Calretinin	85/89	95.5	17/51	33.3	<0.001
WT1	85/86	98.8	8/51	15.7	<0.001
AE1/AE3	89/89	100	51/51	100	-
CAM5.2	85/88	96.6	51/51	100	0.251
CK 5/6	56/80	70	21/51	41.2	0.001
Vimentin	81/89	91.0	24/51	47.1	<0.001
EMA	85/89	95.5	51/51	100	0.159
Thrombomodulin	60/85	70.6	10/51	19.6	<0.001
Mesothelin	65/84	77.4	35/51	68.6	0.907
CEA	6/88	6.8	50/51	98.0	<0.001
CA19-9	7/41	17.1	37/51	72.5	<0.001
CA125	35/41	85.4	41/51	80.4	0.366

CK, cytokeratin; EMA, epithelial membrane antigen.

Table 5 Sensitivity and specificity of immunohistochemistry in mesotheliomas by one marker

One marker	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Calretinin(+)	95.5	66.7
WT1(+)	98.8	84.3
CK 5/6(+)	70	58.8
Vimentin(+)	91.0	52.9
Thrombomodulin(+)	70.6	80.4
CEA(-)	93.2	98.0
CA19-9(-)	82.9	72.5

CK, cytokeratin.

Table 6 Sensitivity and specificity of immunohistochemistry in mesotheliomas by two markers

Two markers	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Calretinin(+) or WT1(+)	100	62.7
Calretinin(+) or TM(+)	98.8	54.9
Calretinin(+) or CEA(-)	97.7	64.7
WT1(+) or TM(+)	97.6	70.6
WT1(+) or CEA(-)	100	82.4
TM(+) or CEA(-)	97.6	78.4
Calretinin(+) and WT1(+)	95.3	88.2
Calretinin(+) and TM(+)	70.5	92.2
Calretinin(+) and CEA(-)	91.8	100
WT1(+) and TM(+)	73.1	94.1
WT1(+) and CEA(-)	90.4	100
TM(+) and CEA(-)	69.1	100

TM, thrombomodulin.

Among the combinations of two antibodies, the combination of WT1 and CEA (either WT1 positivity or CEA negativity) had the highest sensitivity, and the combination of calretinin and CEA (both calretinin positivity and CEA negativity) had the highest specificity (Table 6).

Among the combinations of three antibodies, the combination of WT1, calretinin, and thrombomodulin (WT1-positivity and (calretinin positivity or thrombomodulin positivity)) had

Table 7 Sensitivity and specificity of immunohistochemistry in mesotheliomas by three markers

Three markers	Sensitivity (%)	Specificity (%)
WT1(+) and (Cal(+) or CEA(-))	96.4	88.2
WT1(+) and (Cal(+) or TM(+))	97.6	86.3
WT1(+) and (TM(+) or CEA(-))	96.3	94.1
Cal(+) and (WT1(+) or CEA(-))	96.4	88.2
Cal(+) and (WT1(+) or TM(+))	95.2	84.3
Cal(+) and (TM(+) or CEA(-))	94.0	92.2
CEA(-) and (Cal(+) or WT1(+))	92.9	100
CEA(-) and (Cal(+) or TM(+))	92.9	100
CEA(-) and (WT1(+) or TM(+))	91.5	100

Cal, calretinin; TM, thrombomodulin.

the highest sensitivity, but it was inferior to the combination of WT1 and CEA. Both the combination of CEA, calretinin and WT1 (CEA negativity and (calretinin positivity or WT1 positivity)) and the combination of CEA, calretinin and thrombomodulin (CEA negativity and (calretinin positivity or thrombomodulin positivity)) had the highest specificity (Table 7).

In the present study, the proportion of epithelioid mesotheliomas that had partial reactivity to calretinin, WT1, and cytokeratin 5/6 (graded as 1+ or 2+) was higher than that recently reported by Ordóñez.⁶ Precisely, these markers generally had diffuse (graded as 3+) and dense positive findings in well-differentiated epithelioid mesotheliomas, which have a distinct papillary or tubulopapillary growth pattern (Fig. 4a). In contrast, in the poorly differentiated cases, which have a solid

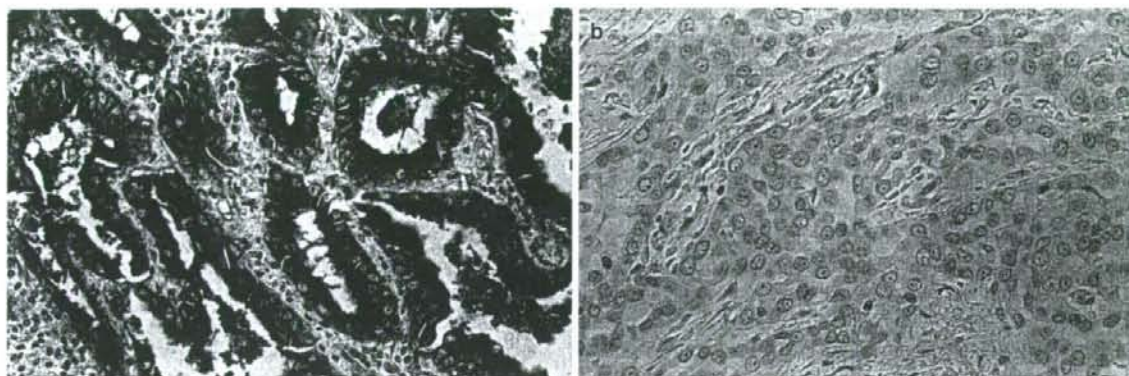


Figure 3 (a) Adenocarcinoma showing strong membranous and cytoplasmic positivity for CEA. (b) Mesothelioma cells are negative for CEA.

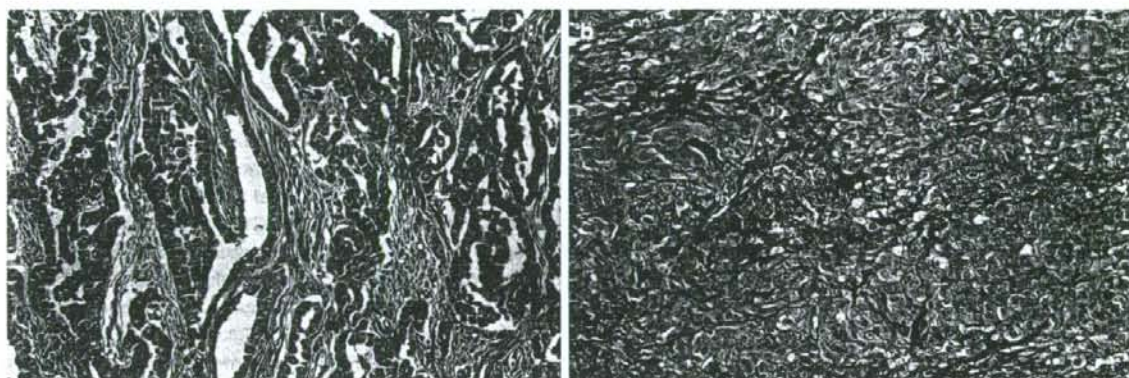


Figure 4 (a) Well-differentiated epithelioid mesothelioma showing distinct tubulopapillary growth pattern. (b) Poorly differentiated epithelioid mesothelioma showing solid and diffuse growth pattern and lack of papillary or tubulopapillary structure.

and diffuse growth pattern and lack papillary or tubulopapillary structure (Fig. 4b), these antibodies had weak and localized (graded as 1+ or 2+) reactions. In addition, calretinin and WT1 produced a nuclear-positive pattern in well-differentiated cases, whereas they produced a cytoplasmic pattern in the poorly differentiated cases. Based on the fact noted here, the discrepancy between the present results and that of the Ordóñez report may be due to the variation in the cases selected, that is, the proportion of the poorly differentiated cases included in the present study may be higher than that in the Ordóñez study. In addition, there might be some technical problems, for example, the time lapse after the sections were cut into thin sections, the vagaries of IHC or interlaboratory variability.

The comparison of the immunoreactivity between epithelioid mesotheliomas and epithelioid components of biphasic mesotheliomas is given in Table 8. CK 5/6 and mesothelin had wider reactivity in epithelioid mesothelioma. In contrast, vimentin had wider reactivity in the epithelioid component of

biphasic mesothelioma. These findings suggest that biphasic mesothelioma indicated the loss or decrease of mesothelial phenotypes along the progression.

In the present study we could not obtain complete data on asbestos exposure of each patient. With regard to the data we could obtain, there were no significant differences in expression patterns with the presence and absence of asbestos exposure.

DISCUSSION

Among the so-called 'positive' markers of mesothelioma, calretinin is one of the most frequently used markers for the diagnosis of epithelioid mesothelioma. The results of the present study confirm those of other investigations.^{6,7} However, the percentage of calretinin-positive lung adenocarcinoma cases in the present study was much higher than that previously reported.

Table 8 Comparison of immunoreactivity between epithelioid mesothelioma and epithelioid component of biphasic mesothelioma

Markers	Epithelioid mesothelioma						Epithelioid component of biphasic mesothelioma						P†
	Positive cases n	%	Grading of reactivity				Positive cases n	%	Grading of reactivity				
			0	1+	2+	3+			0	1+	2+	3+	
Calretinin	69/70	98.6	1	9	7	53	16/19	84.2	3	4	1	11	0.058
WT1	66/67	98.5	1	15	11	40	19/19	100	0	8	3	8	0.137
AE1/AE3	70/70	100	0	5	4	61	19/19	100	0	1	1	17	0.779
CAM5.2	66/69	95.7	3	3	3	60	19/19	95.7	0	0	3	16	0.878
CK 5/6	46/62	74.2	16	21	11	14	10/18	55.6	8	7	3	0	0.030
Vimentin	62/70	88.6	8	22	14	26	19/19	100	0	4	4	11	0.049
EMA	68/70	97.1	2	15	12	41	17/19	89.5	2	2	5	10	0.703
Thrombomodulin	47/66	71.2	19	30	10	7	13/19	68.4	6	8	3	2	0.902
Mesothelin	56/66	84.8	10	3	13	40	9/18	50	9	2	2	5	0.002
CEA	3/69	4.3	66	3	0	0	3/19	15.8	16	1	1	1	0.070
CA19-9	6/32	18.8	26	4	2	0	1/9	11.1	8	1	0	0	0.564
CA125	29/32	90.6	3	5	8	16	6/9	66.7	3	1	2	3	0.202

†Mann-Whitney U-test.

CK, cytokeratin; EMA, epithelial membrane antigen.

Recent studies have suggested that *WT1* suppressor gene plays an important role in both the development of the mesothelium and in the pathogenesis of mesothelioma.⁸⁻¹³ The present results are similar to those obtained in other investigations in which 6F-H2 anti-WT1 mAb used was the same as that used in the present study.⁸ Although the percentage of WT1-positive lung adenocarcinomas in the present study was higher than that previously reported, positive findings were observed only in a small area or a few cells (graded as 1+) in all the WT1-positive lung adenocarcinomas. In addition, WT1 had the highest sensitivity and specificity among all positive markers. Therefore, it is evident that WT1 is the most useful positive marker for the pathological diagnosis of epithelioid mesothelioma. However, when compared with calretinin, WT1 reactivity tends to be within a limited area (graded as 1+ or 2+). In addition, the density of WT1 reactivity tends to be weaker than calretinin reactivity. Therefore, it is possible that calretinin, rather than WT1, is more useful in distinguishing between these two malignancies, particularly in a small biopsy specimen.

In 1992 Collins *et al.* were the first to suggest that thrombomodulin (CD141) could be a useful positive immunohistochemical marker for the diagnosis of epithelioid mesothelioma.¹⁴ In their study, thrombomodulin reactivity was reported in all 31 epithelioid mesotheliomas, whereas only four of the 48 lung adenocarcinomas were positive and only one of the four cases exhibited strong positivity. Since then, many other reports have been published and although the majority of the reports have confirmed the usefulness of thrombomodulin in distinguishing epithelioid mesotheliomas from lung adenocarcinomas,¹⁴⁻¹⁸ others have not.^{5,19-21} The results of the present study including the grading of reactivity are in almost complete agreement with the observation reported by Ordóñez.⁸

In 1985, using gel electrophoresis, Blobel *et al.* were the first to demonstrate significant differences in the cytokeratin

expression pattern between epithelioid mesotheliomas and lung adenocarcinomas.²² These investigators demonstrated that although both these malignancies expressed simple epithelial-type CK peptides (CK 7, 8, 18, and 19), other CK, including CK 5 and CK 6, were present in epithelioid mesotheliomas but not in lung adenocarcinomas. In 1989, Moll *et al.* confirmed this observation by immunofluorescence methods using the AE14 anti-CK 5 antibody.²³ Additional comparative studies on the expression of CK peptide 5 and 6 in epithelioid mesotheliomas and lung adenocarcinomas have become possible only recently with the introduction of the commercially available D5/16B4 anti-CK 5/6 mAb. In the present study, 70% of epithelioid mesotheliomas had reactivity to CK 5/6. This finding is in agreement with the observation reported by Chu and Weiss,²⁴ but this value is lower than those reported in other investigations.^{6,7,16,25,26} In contrast, 41.2% of lung adenocarcinomas also expressed this marker. In the present study, the percentage of CK 5/6-positive lung adenocarcinomas was much higher than those previously reported. However, the reaction was focal (1+) and weak in most cases.

Although a large number of published reports have advocated the utility of CEA in the diagnosis of epithelioid mesotheliomas, some controversy still exists regarding the expression of this protein in epithelioid mesotheliomas.^{6,16,17,19,20,27-50} In some earlier studies, the percentage of CEA positivity in epithelioid mesothelioma was reported to be as high as one-third to nearly one half of the cases.^{30,36,42} At present, it is believed that these high values were due to the use of anti-CEA antibodies that cross-reacted with non-CEA antigens. However, in recent investigations, CEA expression has been consistently reported in epithelioid mesotheliomas, but in much lower percentages, ranging from 1% to 10% of the cases.^{16,20,27,29,34,44} In the present study only 6.8% of epithelioid mesotheliomas had reactivity for CEA. This finding confirms those of other recent