

## 中皮腫の病理診断の精度向上

## —現状と将来—

井内康輝<sup>1</sup>

**要旨**——本邦では近年、1960～1990年代における膨大な量のアスベストの使用の結果として、中皮腫の増加が著しい。従来からの労災補償に加えて、石綿救済新法の成立によって、労災補償の対象とならない中皮腫患者の補償・救済が広く行われるようになったが、これらの制度においては中皮腫の診断が補償・救済の是非を決めることになり、特に病理診断の精度向上が求められている。中皮腫が従来まれな腫瘍であることに加え、その組織像が多彩であることから、現状の中皮腫の病理診断の精度には問題があるといわざるをえない。中皮細胞の陽性マーカー、陰性マーカーとなる多種類の抗体を用いた免疫組織化学的染色が大変有用であることが判明してきたので、今後は中皮腫の組織型別に適切な抗体の選択をして診断を行うことが奨められる。(肺癌, 2007;47:945-950)

**索引用語**——中皮腫, アスベスト曝露, 補償・救済, 免疫組織化学的染色, 抗体

## Improvement of Accuracy in Pathological Diagnosis of Mesothelioma —Present and Future—

Kouki Inai<sup>1</sup>

**ABSTRACT**——Recently in Japan, the incidence of mesothelioma has increased extremely, as a reflection of amounts of the use of asbestos in 1960's through 1990's. By the establishment of a new law for non-occupational asbestos-exposure in addition to the present system for occupational asbestos-exposure, the relief and compensation has been widely provided, and in these conditions, the diagnosis of mesothelioma is an important point, and in particular the accuracy of pathological diagnosis as mesothelioma is required. As mesothelioma is a rare tumor in the past and the histological type shows a wide variety, diagnostic accuracy needs to be improved. As immunohistochemical staining is very useful using various antibodies as positive or negative markers of mesothelial cells, it is recommended that the diagnosis should be made by selecting adequate antibodies according to the histological types of mesothelioma. (*JL.C.* 2007;47:945-950)

**KEY WORDS**——Mesothelioma, Asbestos-exposure, Relief and compensation, Immunohistochemical stainings, Antibody

### 1. 中皮腫患者の補償と救済

労災保険制度において職業上のアスベスト曝露による

健康被害を補償する場合は、アスベスト曝露による疾病を、1. アスベスト肺(石綿肺)、2. 肺がん、3. 中皮腫、4. 良性石綿胸水、5. びまん性胸膜肥厚と規定している。

<sup>1</sup>広島大学大学院医歯薬学総合研究科病理学。

別刷請求先: 井内康輝, 広島大学大学院医歯薬学総合研究科病理学, 〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3 (e-mail: koinai@hiroshima-u.ac.jp)。

<sup>1</sup>Department of Pathology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Japan.

Reprints: Kouki Inai, Department of Pathology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan (e-mail: koinai@hiroshima-u.ac.jp)。

© 2007 The Japan Lung Cancer Society

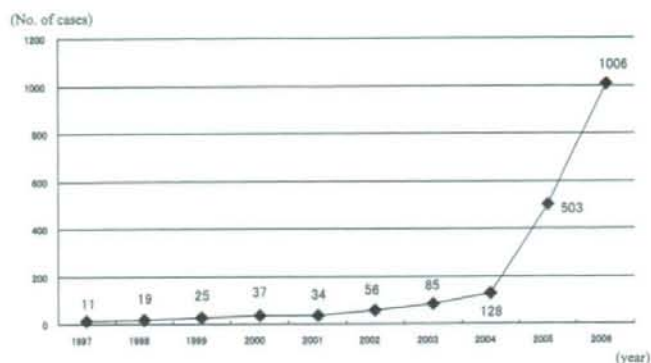


Figure 1. The number of mesothelioma in the occupational exposures to asbestos.

そのうち中皮腫については、胸膜、腹膜、心膜、精巣鞘膜のいずれに発生しても、胸部 X 線写真上、アスベスト肺（石綿肺）の所見があるか、または、アスベストへの曝露作業に従事した期間が 1 年以上あることを満足すれば、業務上の疾病として認められる。以前はより厳しい条件が付加されていたが、2006 年（平成 18 年）2 月の改正によって、中皮腫の診断の確からしさが担保されれば、中皮腫のほとんどはアスベスト曝露によると推測できることから条件が緩和された。これによって支給決定件数は平成 18 年度に倍増し、1,000 件を超えることになった（Figure 1）。

一方、2005 年（平成 17 年）夏、兵庫県尼崎市にあるクボタ旧神崎工場の周辺住民に集団的に中皮腫が発生していることが報道され、アスベストの中でも最も発がんの危険性の高いクロシドライトを大量に使用していたクボタは工場外へのアスベストの飛散の可能性を認め、患者に謝罪しその救済を始めた（いわゆるクボタショック）。この事態を受けて政府は労災補償の対象とならない人々を対象とする「石綿による健康被害の救済に関する法律」（いわゆる石綿救済新法）を提案し、国会の迅速な審議をへて、この法律は 2006 年（平成 18 年）3 月に施行された。石綿救済新法では、対象となる疾病は中皮腫と肺がんに限定されたが、中皮腫については労災補償と同じ条件で認定されることとなった。その結果、2006 年 3 月から 2007 年 3 月までの 1 年間に中皮腫として 800 件以上が救済申請され、その約 3/4 は救済対象として認定された（Table 1）。これらは必ずしもこの 1 年間に発症した例ではないが、労災事例と同様にここ数年間での中皮腫の急増を物語るといえる。

こうした中皮腫の急増は、本邦におけるアスベストの輸入量の推移の中で 1960 年代から 1975 年頃までの輸入

Table 1. Number of Cases with Mesothelioma in the Non-occupational Exposure to Asbestos Relieved by New Law (March 2006-March 2007)

The number of applicants	841 cases
Cases with confirmed diagnosis	628 cases (74.7%)
Cases with denied diagnosis	76 cases (9.0%)
Cases with deferred decision	137 cases (16.3%)

量の急増と並行している。<sup>1</sup> アスベスト曝露の開始から中皮腫の発症（発生）までの潜伏期間は約 40 年と推測されるので、中皮腫の急増は、この時期の輸入量（本邦ではアスベストの生産量は僅かであるので、輸入量＝使用量としてよい）が急増したことの反映であるとしてほぼ間違いない。また、国単位でアスベスト使用量と中皮腫の発生数を比較したデータによると、アスベスト使用量 200 トンにつき中皮腫 1 例が発生するとの指摘があり、これをあてはめるならば、本邦では 2010～2020 年の間に、1960～1975 年の間の約 30 万トンのアスベスト使用量を反映して約 1,500 例の中皮腫が発生することになる。使用されたアスベスト繊維の種類や使用された態様の詳細は不明であるので、こうした計算上の値が必ずあてはまるとの確証はないが、本邦では今後毎年 1,000 例から 1,500 例の中皮腫の発生を覚悟しておかなければならないと思われる。

## 2. 中皮腫の病理診断の精度

中皮腫の臨床診断の現状は、X 線写真や CT 写真などの画像に頼らざるをえないことから、その精度は高いとはいえない。従って細胞診や生検・手術あるいは病理解剖でえられた材料の病理組織診断が重視されることにな

**Table 2.** Materials of Diagnosis in the Death-certified Cases Diagnosed as Mesothelioma (2003)

Materials	No. of cases (%)
1. Cytology only	12 (11)
2. Histology (HE) only	63 (57)
3. Histology (HE) + cytology	8 (7)
4. Histology (HE) + cytology + immunohistochemistry (IHC)	3 (3)
5. Histology (HE) + IHC	25 (23)
Total	111 (100)

HE: Hematoxylin and eosin staining, IHC: Immunohistochemistry.

**Table 3.** Review of Death-certified Cases Diagnosed as Mesothelioma (2003)

Category of diagnosis	No. of cases (%)
5: Definite	62 (56)
4: Probable	23 (21)
3: Possible	12 (11)
2: Unlikely	6 (5)
1: Definitely not	8 (7)
Total	111 (100)

るが、この病理組織診断が前述した患者の補償や救済に直結するとすれば、その精度を高くすることが急務である。

日本における中皮腫の実態を調査する目的で、厚生労働科学特別研究費による研究班（岸本卓巳班長）のもとで、2003年（平成15年）に中皮腫として死亡届の出ている877例について、その臨床所見、画像所見および病理所見を再検討したことがある。<sup>2</sup> そのうち111例については、遺族および主治医の許諾をえて診断の根拠となった細胞診標本、組織標本あるいは組織ブロックを借用することができ、その診断の精度を検討することとなった。111例の診断根拠となった材料の内訳はTable 2のようになる。ここで判明したことは、細胞診のみあるいは免疫組織化学的染色を行わずHE染色のみで組織診断がつけられている例が、かなりの割合を占めていることである。これら111例について、我々が臨床医、放射線科医とともに診断の再検討を行った結果、その診断を5段階のカテゴリーに分けてみると、Table 3のようになった。すなわち、カテゴリー2（Unlikely、診断の妥当性が低い）あるいはカテゴリー1（Definitely not、診断は妥当でない）とされた例はあわせて14例（12.6%）となった。さらに、その訂正診断をみると（Table 4）、その多くは腺癌、胸膜炎あるいは反応性の中皮細胞過形成であった。こうした妥当性を欠く診断が多い理由を考えてみると、ひと

**Table 4.** Revised Diagnosis of Death-certified Cases (2003) with Unlikely Or Definitely Not Categories

Revised diagnosis	No. of cases (%)
Adenocarcinoma	5 (36)
Pleuritis	4 (29)
Reactive mesothelial hyperplasia	2 (14)
Solitary fibrous tumor	1 (7)
Malignant lymphoma	1 (7)
Rhabdomyosarcoma	1 (7)

**Table 5.** Histological Types of Mesothelioma (WHO Classification)

1. Epithelioid mesothelioma
2. Sarcomatoid mesothelioma
1) Desmoplastic mesothelioma
3. Biphasic mesothelioma
4. Others
1) With heterologous elements (chondroid, osteoblastic rhabdomyoblastic, neurogenic sarcoma-like)
2) Adenomatoid tumour-like
3) Lymphohistiocytoid
4) Myxoid stroma deciduoid
5) Multicystic
6) Clear cell
7) Small cell and poorly differentiated or anaplastic

つには中皮腫は肺がんにくらべるとかなりまれな腫瘍であり、877例中調査が可能であった848例中の501例（59.1%）が年に1例、176例（20.8%）が年に2例しか診断されていない医療機関から提出された例であり、臨床医も病理医も中皮腫の診断に慣れていないことがあげられる。二つ目には、後述するように中皮腫の組織像は多彩であり、病理学的なレベルでも多くの鑑別診断があげることがあげられよう。三つ目としては、これらの病理学的な鑑別を適切に行う方法、すなわち現在では多種類の抗体を用いた免疫組織化学的染色を行っているが、これまではそうした確診に至る客観的なエビデンスを示しうる染色が行われていなかったことによると考えられる。

### 3. 中皮腫の病理組織診断

中皮腫の組織型分類（Table 5）は多彩であることから、<sup>3</sup> その診断に際して鑑別すべき疾患が多く、特にその組織型毎に鑑別対象が異なることを念頭におくことが大切である（Table 6）。組織型別にみて最も頻度の高い上皮型中皮腫の場合、胸膜であれば肺の腺癌、腹膜であれば卵巣あるいは腹膜原発の漿液性癌あるいは卵巣の明細胞癌との鑑別が必要である。この場合は腫瘍細胞が中皮細胞の性格を保持しているか否かの判断を、中皮細胞で

Table 6. Differential Diagnosis in Mesothelioma

1. Epithelioid mesothelioma	Pleura:	Invasion of adenocarcinoma of lung Metastatic adenocarcinoma involving pleura Reactive mesothelial hyperplasia (pleuritis)
	Peritoneum:	Serous papillary adenocarcinoma or clear cell adenocarcinoma of ovary Peritoneal serous carcinoma Reactive mesothelial hyperplasia (peritonitis)
2. Sarcomatoid mesothelioma	Pleura:	Primary or metastatic sarcoma involving pleura Invasion of sarcomatoid carcinoma of lung
	Peritoneum:	Primary or metastatic sarcoma involving peritoneum
3. Desmoplastic mesothelioma	Pleura:	Fibrous or organizing pleuritis
4. Biphasic mesothelioma	Pleura:	Carcinosarcoma or pulmonary blastoma of lung Synovial sarcoma (biphasic) involving pleura
	Peritoneum:	Carcinosarcoma of female genital organs or others

陽性となる抗体と肺末梢上皮あるいは卵巣の表層上皮で陽性となるマーカーを組み合わせて免疫組織化学的染色を行い、その結果を総合的に判定することが必要である。すなわち、中皮細胞マーカーとして calretinin, WT1, thrombomodulin, mesothelin, D2-40 などがあげられ、肺の腺癌のマーカーとしては CEA, TTF-1, Napsin A, surfactant apoprotein などを用いる。<sup>4</sup> いずれも特異度は 100% でないことを忘れてはならないし、腫瘍の一部のみが陽性の場合、あるいは陽性所見の局在が異常である場合（例えば calretinin は正常中皮細胞では核に強陽性、細胞質に弱陽性であるが、calretinin が核で陰性で、細胞質のみに陽性である場合は中皮細胞のマーカーとしては疑わしい）、その判断は慎重にすべきである。卵巣の腺癌のマーカーとしては、CEA の他に Ber-EP4, MOC31 および ER (estrogen receptor) を用いることが奨められる。<sup>5</sup>

肉腫型中皮腫は上皮型中皮腫の場合と選択する抗体は大きく異なる。軟部組織に発生する紡錘形細胞肉腫あるいは多形細胞肉腫との鑑別では、cytokeratin (抗体としては AE1/AE3 あるいは CAM5.2) が特異度が高く最も有用である。<sup>6</sup> 上皮型中皮腫で中皮細胞マーカーとして用いた calretinin, WT1 は、真の肉腫の 30~40% で陽性となり、かつ肉腫型中皮腫での陽性所見としては弱陽性であり、上皮型中皮腫のような核に強い染色性を示さないことから、信頼性に欠ける。一方、真の肉腫については、その診断は腫瘍細胞の特異な分化にもとづいてつけられるものである。その分化を明らかにすることが中皮腫を否定する根拠となる。例えば、横紋筋肉腫であれば Myo D1, myogenin, desmin, myoglobin など、平滑筋肉腫であれば desmin, SMA (smooth muscle actin), h-caldesmon など、悪性神経鞘腫瘍であれば S-100p など、悪性線維性組織球腫であれば KP-1 など、solitary fibrous tumor であれば CD34 が腫瘍の診断に有用な抗体

として知られている。<sup>7</sup>

胸膜において肉腫型中皮腫と最も鑑別の難しい腫瘍は、肺の肉腫様癌 sarcomatoid carcinoma (紡錘細胞癌 spindle cell carcinoma, 多形細胞癌 pleomorphic carcinoma) である。この腫瘍が胸膜へ進展した場合、HE 染色では肉腫型中皮腫と鑑別は難しい。さらに免疫組織化学的染色でも、ともに cytokeratin 陽性であり区別できない。<sup>6</sup> 肺の肉腫様癌は組織学的にいずれかの部分に癌腫 (腺癌, 扁平上皮癌など) の所見がある例と定義されるので、広い範囲の組織像を検索できる場合は鑑別可能となるが、少量の生検材料などで診断をつける場合は組織所見のみで確定的な診断をつけることは不可能である。従って画像診断によって、肺内における原発巣とみなしうる腫瘍の有無、胸膜における拡がりの特徴などをみた上で、肺癌の可能性が強い例は除外する他はない。

線維形成型中皮腫は線維性胸膜炎と鑑別しなければならない。画像による特異的な拡がりや胸膜の肥厚が急速であることなどがみられれば中皮腫の診断は容易となるが、臨床的所見が確定的でない上に小さな生検材料で診断をつけることを求められた場合、しばしば鑑別に苦慮する。この場合、HE 染色の所見で Table 7 のような鑑別点を検討した上で、<sup>8</sup> Table 8 にみるような規準で免疫組織化学的染色の結果を参考にすることが奨められる。<sup>9</sup> 紡錘形細胞の細胞密度や異型性に頼ることは危険である。Overdiagnosis によって患者が肺胸膜全摘術などの過剰な治療を受けるような事態は避けるべきである。

胸膜炎に随伴する異型な上皮様中皮細胞の過形成も上皮型中皮腫と鑑別しなければならない。この場合はやはり細胞異型はあてにならず浸潤の有無の判断が決め手となる。従って小さな生検材料での判断を求められる場合は迷う例も多い。この際、Table 9 に示す免疫組織化学的染色は参考となる。<sup>10</sup>

**Table 7.** Separation of Desmoplastic Mesothelioma from Fibrous Or Organizing Pleuritis

Desmoplastic mesothelioma	Fibrous or organizing pleuritis
No zonation	Zonation (Cellularity greatest immediately under effusion, becomes more fibrotic away from effusion)
Capillaries inconspicuous	Capillaries perpendicular to pleural surface
Cytologic atypia often hard to discern	Cells immediately under effusion may be very atypical
Stromal invasion	No stromal invasion
Bland necrosis	No necrosis
Sarcomatous foci	No sarcomatous foci
Nodular expansions of stroma (sometimes present)	No nodular expansions of stroma

(Churg A, AFIP Atlas, 2006)

**Table 8.** Immunohistochemistry for Differential Diagnosis Between Desmoplastic Mesothelioma and Fibrous Or Organizing Pleuritis

Antibody	Desmoplastic mesothelioma (Tumor cell)	Fibrous or organizing pleuritis (Nonneoplastic mesenchymal cell)
Calretinin	+	+
Cytokeratin (CAM5.2 or AE1/AE3)	++	++
Desmin	-	+
$\alpha$ -SMA	+	++

**Table 9.** Immunohistochemistry for Differential Diagnosis Between Epithelioid Mesothelioma and Reactive Mesothelial Hyperplasia

Antibody	Epithelioid mesothelioma (Tumor cell)	Reactive mesothelial hyperplasia (Mesothelial cell)
Calretinin	++	++
Cytokeratin (CAM5.2 or AE1/AE3)	++	++
Desmin	-	+
EMA	++	- - +
p53 protein	+	-

#### 4. おわりに

中皮腫の病理診断については、これまでは適切でない診断がつけられていた可能性のある例が10~15%程度はであると推測される。この病理診断の精度を改善するためには、中皮腫の組織型別にいくつかの抗体を組み合わせた免疫組織化学的染色を行うことが奨められる。現状では、単一の抗体で中皮腫の診断を確定することはできていない。今後、遺伝子の網羅的な発現解析などの方法によって、特異度の高い抗体(マーカー)の開発に務め、より高い精度での中皮腫の診断が容易に行われるようにしなければならない。

#### REFERENCES

1. 神山直彦, アスベストとはなにか, 森永謙二, 編集, アスベスト汚染と健康被害, 第2版, 東京: 日本評論社: 2006:13-29.
2. 岸本卓巳, 青江啓介, 井内康輝, 大西一男, 加藤勝也, 城戸優光, 他, 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」, 2006.
3. WHO. Tumours of the pleura. In: Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, et al, eds. *Pathology and genetics, tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon: IARC Press: 2003:125-144.
4. Kushitani K, Takeshima Y, Amatya VJ, Furonaka O, Sakatani A, Inai K. Immunohistochemical marker panels for distinguishing between epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Pathol Int*. 2007;57:190-199.

5. Attanoos RL, Webb R, Dojcinov SD, Gibbs AR. Value of mesothelial and epithelial antibodies in distinguishing diffuse peritoneal mesothelioma in females from serous papillary carcinoma of the ovary and peritoneum. *Histopathology*. 2002;40:237-244.
6. Kushitani K, Takeshima Y, Amatya VJ, Furonaka O, Sakatani A, Inai K. Differential diagnosis of sarcomatoid mesothelioma from sarcoma and sarcomatoid carcinoma using immunohistochemistry. *Pathol Int*. (in press)
7. 武島幸男, 井内康輝. 胸膜のLocalized (Solitary) fibrous tumorの病理. 病理と臨床. 2004;22:708-712.
8. Churg A, Colby TV, Cagle P, Corson J, Gibbs AR, Gilks B, et al (US-Canadian Mesothelioma Reference Panel). The separation of benign and malignant mesothelial proliferations. *Am J Surg Pathol*. 2000;24:1183-1200.
9. Attanoos RL, Griffin A, Gibbs AR. The use of immunohistochemistry in distinguishing reactive from neoplastic mesothelium. A novel use for desmin and comparative evaluation with epithelial membrane antigen, p53, platelet-derived growth factor-receptor, P-glycoprotein and Bcl-2. *Histopathology*. 2003;43:231-238.
10. King JE, Thatcher N, Pickering CA, Hasleton PS. Sensitivity and specificity of immunohistochemical markers used in the diagnosis of epithelioid mesothelioma: a detailed systematic analysis using published data. *Histopathology*. 2006;48:223-232.

## Original Article

## Differential diagnosis of sarcomatoid mesothelioma from true sarcoma and sarcomatoid carcinoma using immunohistochemistry

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

Differentiation of sarcomatoid mesothelioma from other sarcomatoid tumors involving the pleura and other structures by light microscopy remains an important diagnostic challenge for surgical pathologists. The purpose of the present study was to investigate the utility of diagnostic immunohistochemistry for differentiating sarcomatoid mesothelioma from its histological mimics: true sarcoma and pulmonary sarcomatoid carcinoma. A total of 39 specimens of mesotheliomas with sarcomatoid components, 43 specimens of true sarcomas, and nine specimens of pulmonary sarcomatoid carcinomas were obtained from Japanese patients and examined using a 10-antibody panel (calretinin, WT1, AE1/AE3, CAM5.2, epithelial membrane antigen, desmin,  $\alpha$ -smooth muscle actin, S-100 protein, CD34, and CD68). CAM5.2 had the highest sensitivity and specificity for differentiating sarcomatoid mesothelioma from true sarcoma. The combination of CAM5.2, WT1, and AE1/AE3 is recommended for routine pathological diagnosis. Accurate clinical information is necessary for differentiating sarcomatoid mesothelioma from sarcomatoid carcinoma.

**Key words:** CAM5.2, immunohistochemistry, sarcomatoid carcinoma, sarcomatoid mesothelioma, true sarcoma

Differential diagnosis of sarcomatoid mesothelioma from sarcomatoid tumors involving the pleura, peritoneum, pericardium, and tunica vaginalis is of critical importance for optimal clinical management; but this can be very challenging using light microscopy alone. Additional clinical information based on clinical history and diagnostic imaging is necessary, together with ancillary diagnostic procedures on the tissue, including immunohistochemistry and electron microscopy.

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 12 December 2006. Accepted for publication 1 October 2007.

© 2008 The Authors

Journal compilation © 2008 Japanese Society of Pathology

A number of immunohistochemical markers have been proposed in recent years. However, most of these markers have been used for differentiating epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma but not for characterizing sarcomatoid mesothelioma.<sup>1–8</sup> Moreover, the effectiveness of immunohistochemistry for differentiating sarcomatoid mesothelioma from other sarcomatoid tumors is unclear.

Therefore the purpose of the present study was to clarify the use of immunohistochemistry in the differential diagnosis of sarcomatoid mesothelioma from other sarcomatoid tumors, including true sarcoma involving the pleura and sarcomatoid carcinoma.

### MATERIALS AND METHODS

#### Patients and histological samples

We used paraffin-embedded specimens from 39 patients with a definite histological diagnosis of mesothelioma who had undergone biopsy, surgical resection, or autopsy between 1995 and 2005. Nine specimens were obtained by biopsy; nine specimens by surgical resection; and 21 specimens by autopsy. All 39 mesotheliomas originated from the pleura. These specimens were provided by 27 external institutes. The 39 mesotheliomas were classified into two groups: the first consisted of 23 sarcomatoid mesotheliomas and the second consisted of 16 cases of biphasic mesothelioma with a definite sarcomatoid component. In the second group only the sarcomatoid component was examined.

For comparison, 43 true sarcomas showing spindle cell or pleomorphic morphology (Table 1) and nine pulmonary sarcomatoid carcinomas were examined according to the World Health Organization (WHO) criteria.<sup>9,10</sup> All true sarcomas originated from the non-pleural soft, visceral, or osseous tissue. All the sarcomatoid carcinomas were confirmed to have intrapulmonary tumor as the primary site. True sarcomas were obtained by surgical resection conducted between 1996 and

2005. Sarcomatoid carcinomas were obtained by lobectomy or autopsy conducted between 2002 and 2006. These samples were obtained from the archives of the Department of Pathology, Hiroshima University. In the present study we evaluated only the spindle cell component of sarcomatoid carcinomas. Informed consent was obtained from all subjects.

Each tumor specimen was reviewed by three pathologists (K.I., Y.T., and K.K.). All the mesothelioma cases were diagnosed based on the currently accepted histological criteria<sup>10,11</sup> associated with the immunohistochemical features; furthermore, the histological classification of true sarcoma and sarcomatoid carcinoma was confirmed according to the WHO classification.<sup>9,10</sup>

### Immunohistochemical procedures

Immunostaining was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections using the avidin-biotin-peroxidase method (ABC) with the Histofine SAB-PO kit (Nichirei, Tokyo, Japan), following an antigen retrieval procedure using a microwave or autoclave. The primary antibodies used in the present study are as follows: calretinin, WT1, pan-cytokeratin (AE1/AE3), CAM5.2, epithelial membrane antigen (EMA), desmin,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), S-100 protein (S-100p), CD34, and CD68. Dilution and

incubation periods of these markers are shown in Table 2. The grade of positivity was determined by the proportion of immunostained cells and was recorded as follows: 1+, 1–25%; 2+, 26–50%; and 3+, 51–100%.

## RESULTS

### Immunohistochemical profiles of sarcomatoid mesothelioma, true sarcoma, and sarcomatoid carcinoma

The results of immunohistochemical staining are summarized in Tables 3,4. A brief description of the reactivity of each antibody is as follows.

#### Calretinin

In sarcomatoid mesothelioma, positive results were observed mainly in the cytoplasm, with a great difference from epithelioid mesothelioma (Fig. 1a). Thirty percent of true sarcomas (four leiomyosarcomas, four desmoids, two malignant fibrous histiocytomas (MFH), one dedifferentiated liposarcoma, one fibrosarcoma, and one malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST)) and 66.7% of sarcomatoid carcinomas had calretinin positivity, mainly in the cytoplasm; but >51% reactivity was found only in two tumors (one desmoid and one sarcomatoid carcinoma).

#### WT1

Sarcomatoid mesothelioma generally had positive results in the cytoplasm (Fig. 1b), and the percentages of WT1-positive cells were greater than those of calretinin-positive cells. Forty-seven percent of true sarcomas (nine leiomyosarcomas, four MPNST, two MFH, two myxofibrosarcomas, one desmoid, one fibrosarcoma, and one malignant gastrointestinal stromal tumor) and 44.4% of sarcomatoid carcinomas had varying degrees of WT1 positivity in the cytoplasm.

**Table 1** Sarcomatoid tumor phenotypes

Histology	<i>n</i>
Leiomyosarcoma	15
Malignant fibrous histiocytoma	6
Malignant peripheral nerve sheath tumor	6
Desmoid tumor	4
Dedifferentiated liposarcoma	3
Rhabdomyosarcoma	3
Fibrosarcoma	2
Myxofibrosarcoma	2
Intimal sarcoma	1
Malignant gastrointestinal stromal tumor	1
Pulmonary sarcomatoid carcinoma	9

**Table 2** Antibodies used

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, 20 min
Cytokeratin-multi	AE1/AE3	Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK	1:100	MW, 5 min
Cytokeratin (CAM5.2)	2A4	Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA	Pre-diluted	MW, 5 min
EMA	E29	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:100	MW, 5 min
Desmin	D33	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:100	MW, 5 min
$\alpha$ -SMA	1A4	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:100	MW, 5 min
S-100p	Poly	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:1000	MW, 5 min
CD34	QBEnd/10	Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK	1:50	MW, 5 min
CD68	KP-1	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:100	MW, 5 min

†In citrate buffer (pH 6.0).

AC, autoclave;  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -smooth muscle actin; EMA, epithelial membrane antigen; MW, microwave.



**Table 3** Positive mesothelioma markers

Markers	Sarcomatoid mesothelioma				True sarcoma				Sarcomatoid carcinoma									
	Positive cases		Grading of reactivity		Positive cases		Grading of reactivity		Positive cases		Grading of reactivity							
	<i>n</i>	%	0	1+	2+	3+	<i>n</i>	%	0	1+	2+	3+						
Calretinin	34/39	87.2	5	23	7	4	13/43	30.2	30	9	3	1	6/9	66.7	3	4	1	1
WT1	35/39	89.7	4	16	11	8	20/43	46.5	23	7	5	8	4/9	44.4	5	1	1	2
AE1/AE3	33/39	84.6	6	12	9	12	2/43	4.7	41	2	0	0	8/9	88.9	1	2	0	6
CAM5.2	36/39	92.3	3	6	3	27	3/43	7.0	40	2	1	0	7/9	77.8	2	1	0	6
EMA	19/39	48.7	20	14	5	0	5/43	11.6	38	5	0	0	8/9	88.9	1	5	0	3

**Table 4** Mesenchymal markers on sarcomatoid mesotheliomas

Markers	Positive cases		Grading of reactivity			
	<i>n</i>	%	0	1+	2+	3+
Desmin	3/39	7.7	36	2	1	0
$\alpha$ -SMA	22/37	59.5	15	8	6	8
S-100p	13/36	36.1	23	12	1	0
CD34	2/32	6.3	30	1	0	1
CD68	22/36	61.1	14	13	5	4

#### AE1/AE3

Eighty-five percent of sarcomatoid mesotheliomas had cytoplasmic positive staining for AE1/AE3 (Fig. 1c), although the proportion of positive cells varied from 1+ to 3+. Two sarcomas (one leiomyosarcoma and one MFH) were positive for AE1/AE3, but the reaction was focal and weak (1+). Sarcomatoid carcinomas generally had diffuse and strong positive staining (3+) for AE1/AE3 in the cytoplasm.

#### CAM5.2

More than 90% of sarcomatoid mesotheliomas had diffuse and strong cytoplasmic positive staining (3+) for CAM5.2 (Fig. 1d). The reaction was focal (1+ or 2+) in three CAM5.2-positive true sarcomas (two leiomyosarcomas and one MPNST). Sarcomatoid carcinomas generally had diffuse and strong positive staining (3+) for CAM5.2 in the cytoplasm.

#### EMA

Forty-nine percent of sarcomatoid mesotheliomas and 12% of true sarcomas (four leiomyosarcomas and one MPNST) had focal (1+ or 2+) and weak cytoplasmic positive staining for EMA. A diffuse (3+) and strong positive staining for EMA in the cytoplasm was observed in 89% sarcomatoid carcinomas and three EMA-positive sarcomatoid carcinomas (Fig. 2).

#### Desmin and $\alpha$ -SMA

The results for desmin and  $\alpha$ -SMA are shown in Table 4. In sarcomatoid mesothelioma, positive staining for desmin was observed only in three cases (8%), but the reaction was focal (1+ or 2+) and weak. In addition, 60% of sarcomatoid mesotheliomas were positive for  $\alpha$ -SMA, and the positive

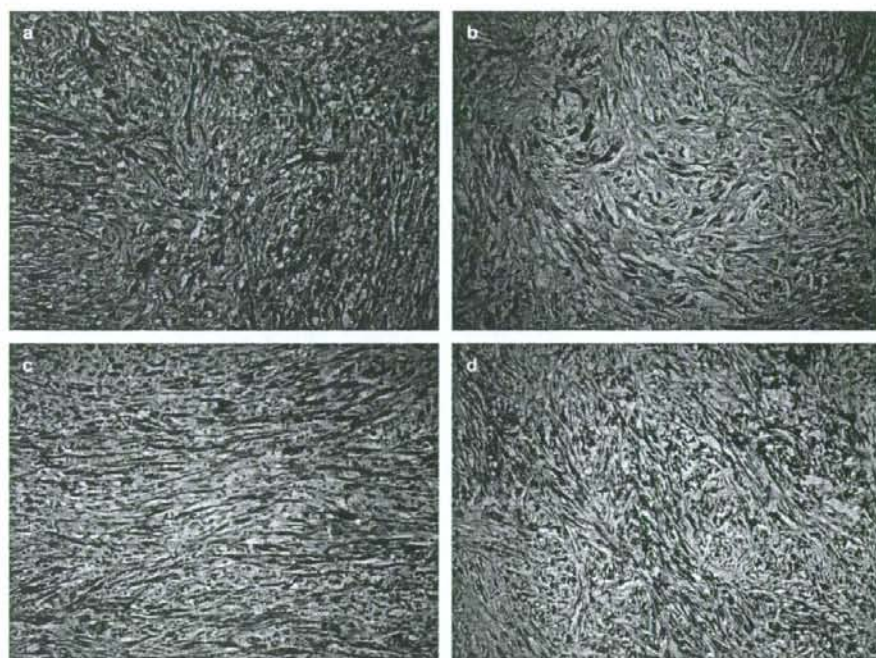
reactions for  $\alpha$ -SMA were wider and stronger than those for desmin. In contrast, among true sarcomas, myogenic sarcoma was naturally positive for  $\alpha$ -SMA and desmin in the cytoplasm. Sarcomatoid carcinoma was completely negative for desmin; but 57% of sarcomatoid carcinomas (5/9) had positive staining for  $\alpha$ -SMA, while two had diffuse (3+) and strong cytoplasmic positive staining (data not shown).

#### S-100p, CD34, and CD68

In sarcomatoid mesothelioma, cytoplasmic positive staining for S-100p was observed in 13 of 36 cases (31%) but the reaction was focal (1+) and weak in most of the positive cases (12/13). Positive results for CD34 were observed only in two sarcomatoid mesotheliomas (6%); but one of these two had diffuse (3+) and strong cytoplasmic positive staining. CD34 positive staining is often observed in solitary fibrous tumors;<sup>12</sup> but the one that had diffuse positive staining for CD34 also had the same pattern for AE1/AE3, CAM5.2, and WT1. Therefore, it can be inferred with a fair amount of certainty that this case was of sarcomatoid mesothelioma and not of solitary fibrous tumor. Sixty-one percent (22 of 36 cases) of sarcomatoid mesotheliomas had cytoplasmic positive staining for CD68, and diffuse (3+) and strong positive staining was observed in four. In contrast, among true sarcomas, neurogenic sarcoma was naturally positive for S-100p in the cytoplasm. In addition, 48% and 82% of sarcomas had positive staining for CD34 and CD68 irrespective of histological classification. In sarcomatoid carcinoma, 67% and 100% had positive staining for S-100p and CD68, respectively, but CD34 was completely negative.

#### Immunohistochemistry for sarcomatoid mesothelioma and true sarcoma

Comparison of the immunohistochemical findings of sarcomatoid mesothelioma and true sarcoma is shown along with statistical analysis in Fig. 3(a). The results indicate that WT1, calretinin, AE1/AE3, and CAM5.2 were statistically significantly different between sarcomatoid mesothelioma and true sarcoma.



**Figure 1** Immunohistochemistry of sarcomatoid mesothelioma: (a) nuclear and cytoplasmic positivity for calretinin; (b) cytoplasmic positivity for WT1; (c) cytoplasmic positivity for AE1/AE3; (d) strong cytoplasmic positivity for CAM5.2.



**Figure 2** Immunohistochemistry of sarcomatoid carcinoma; cytoplasmic positivity for epithelial membrane antigen.

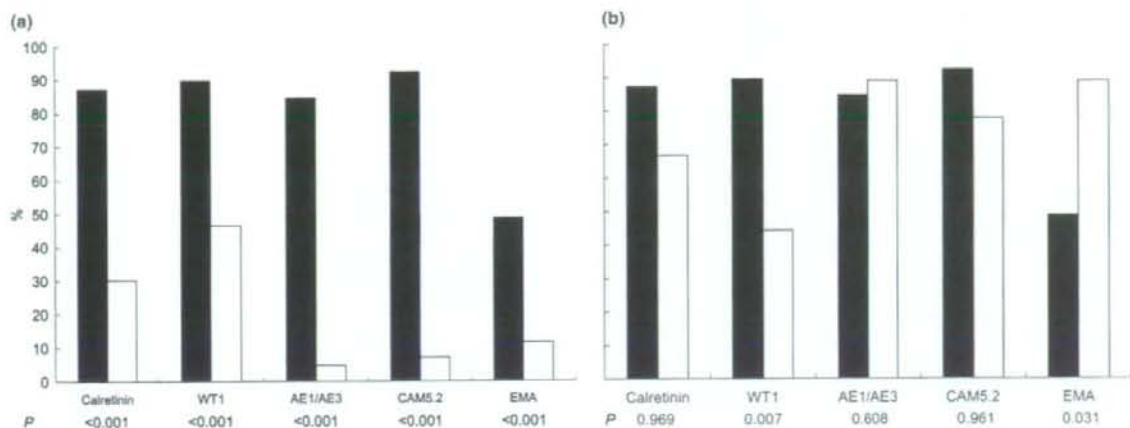
The sensitivity and specificity of one, two, or three of these positive markers for the differentiation of sarcomatoid mesothelioma and true sarcoma are shown in Tables 5–7.

With regard to each positive marker, CAM5.2 had the highest sensitivity while AE1/AE3 had the highest specificity in sarcomatoid mesotheliomas. The specificity of CAM5.2 was slightly inferior to that of AE1/AE3, but the reactivity of CAM5.2 was considerably wider and stronger than that of AE1/AE3 in sarcomatoid mesothelioma. Therefore, CAM5.2

is suggested to be the most useful positive marker for differentiating sarcomatoid mesothelioma from true sarcoma. The sensitivity of calretinin and WT1 was higher than that of AE1/AE3 but their specificities were considerably inferior to that of AE1/AE3 (Table 5).

Among the combinations of two antibodies, both the combination of WT1 and AE1/AE3 (either WT1 positivity or AE1/AE3 positivity) and that of WT1 and CAM5.2 (either WT1 positivity or CAM5.2 positivity) had the highest sensitivity, while the combination of calretinin and CAM5.2 (both calretinin and CAM5.2 positivity) and that of AE1/AE3 and CAM5.2 (both calretinin and CAM5.2 positivity) had the highest specificity (Table 6).

Among the combinations of three antibodies, the combination of CAM5.2, WT1, and AE1/AE3 (CAM5.2 positivity and (WT1 positivity or AE1/AE3 positivity)) had the highest sensitivity, but the sensitivity of this combination was inferior to that of WT1 and AE1/AE3 combination and WT1 and CAM5.2 combination. The combination of AE1/AE3, calretinin, and WT1 (AE1/AE3 positivity and (calretinin positivity or WT1 positivity)), the combination of AE1/AE3, calretinin, and CAM5.2 (AE1/AE3 positivity and (calretinin positivity or CAM5.2 positivity)), and the combination of AE1/AE3, WT1, and CAM5.2 (AE1/AE3 positivity and (WT1 positivity or CAM5.2 positivity)) had the highest specificity, and the specificity of these combinations was equal to that of calretinin and CAM5.2 combination and AE1/AE3 and CAM5.2 combination (Table 7).



**Figure 3** Positivity of each marker for (a) (■) sarcomatoid mesothelioma and (□) true sarcoma; and (b) (■) sarcomatoid mesothelioma and (□) sarcomatoid carcinoma (Fisher's exact test).

**Table 5** Immunohistochemistry in sarcomatoid mesothelioma for one marker

One marker	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Calretinin(+)	87.2	69.8
WT1(+)	89.7	53.5
AE1/AE3(+)	84.6	95.3
CAM5.2(+)	92.3	93.0

**Table 6** Immunohistochemistry in sarcomatoid mesothelioma for two markers

Two markers	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Calretinin(+) or WT1(+)	100	27.9
Calretinin(+) or AE1/AE3(+)	92.3	67.4
Calretinin(+) or CAM5.2(+)	94.9	67.4
WT1(+) or AE1/AE3(+)	100	48.8
WT1(+) or CAM5.2(+)	100	48.8
AE1/AE3(+) or CAM5.2(+)	92.3	90.7
Calretinin(+) and WT1(+)	76.9	95.3
Calretinin(+) and AE1/AE3(+)	79.5	97.7
Calretinin(+) and CAM5.2(+)	84.6	97.7
WT1(+) and AE1/AE3(+)	74.4	95.3
WT1(+) and CAM5.2(+)	82.1	97.7
AE1/AE3(+) and CAM5.2(+)	84.6	97.7

#### Immunohistochemistry findings of sarcomatoid mesothelioma and sarcomatoid carcinoma

Comparison of the immunohistochemical findings of sarcomatoid mesothelioma and sarcomatoid carcinoma is shown along with statistical analysis results in Fig. 3(b). It appears that WT1 is a positive marker while EMA is a negative marker for sarcomatoid mesothelioma; but the specificity of these markers for the differentiation of sarcomatoid mesothelioma and sarcomatoid carcinoma is relatively low. Therefore, these markers are not useful for differentiating these tumors.

**Table 7** Immunohistochemistry in sarcomatoid mesothelioma for three markers

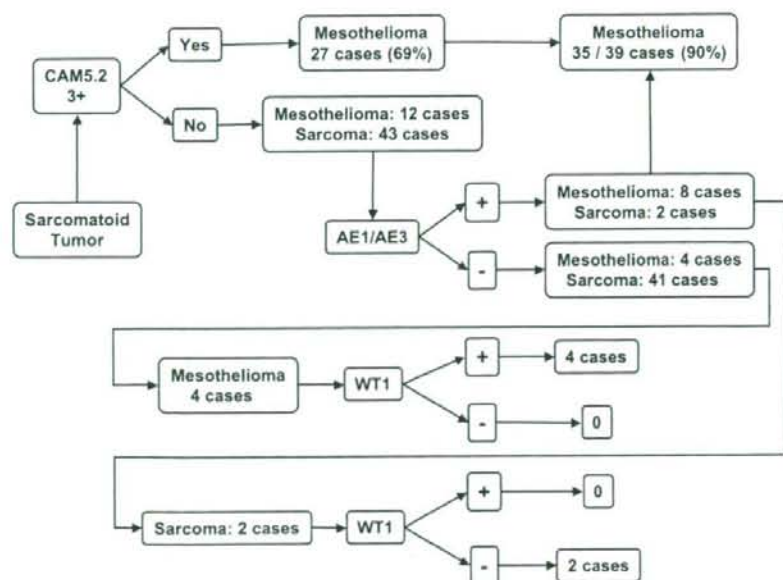
Three markers	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Calretinin(+) and (WT1(+) or AE1/AE3(+))	87.2	93.0
Calretinin(+) and (WT1(+) or CAM5.2(+))	87.2	90.7
Calretinin(+) and (AE1/AE3(+) or CAM5.2(+))	84.6	95.3
WT1(+) and (Calretinin(+) or AE1/AE3(+))	82.1	95.3
WT1(+) and (Calretinin(+) or CAM5.2(+))	84.6	93.0
WT1(+) and (AE1/AE3(+) or CAM5.2(+))	82.1	97.7
AE1/AE3(+) and (Calretinin(+) or WT1(+))	84.6	97.7
AE1/AE3(+) and (Calretinin(+) or CAM5.2(+))	84.6	97.7
AE1/AE3(+) and (WT1(+) or CAM5.2(+))	84.6	97.7
CAM5.2(+) and (Calretinin(+) or WT1(+))	92.3	93.0
CAM5.2(+) and (Calretinin(+) or AE1/AE3(+))	89.7	95.3
CAM5.2(+) and (WT1(+) or AE1/AE3(+))	92.3	95.3

#### Diagnostic flowchart based on immunohistochemical scoring of sarcomatoid mesothelioma and true sarcoma

A diagnostic flowchart based on immunohistochemical scoring of sarcomatoid mesothelioma and true sarcoma is shown in Fig. 4. If tumor cells have diffuse (3+) positive results for CAM5.2, the tumor is probably mesothelioma. If tumor cells are CAM5.2 negative and 1+ or 2+ and AE1/AE3 negative, the tumor is probably true sarcoma. If any discrepancy exists between pathological diagnosis and clinical findings, WT1 can be used to differentiate mesothelioma from true sarcoma.

#### DISCUSSION

Malignant mesothelioma is subclassified into three types: epithelioid, sarcomatoid, and biphasic.<sup>10</sup> In the case of



**Figure 4** Diagnostic flowchart based on immunohistochemical scoring of sarcomatoid mesothelioma and true sarcoma.

epithelioid and biphasic types, many immunohistochemical studies have reported differential diagnosis for pulmonary adenocarcinoma or ovarian adenocarcinoma. Many mesothelioma-associated markers such as calretinin, WT1, CK5/6, thrombomodulin, D2-40, and podoplanin are preferentially expressed by mesothelioma. These markers are very effective for diagnosing epithelioid mesothelioma and differentiating it from adenocarcinoma.<sup>13–18</sup> But there have been no comprehensive studies on the differential diagnosis of sarcomatoid mesothelioma from true sarcoma.

The positivity of calretinin (87.2%) for sarcomatoid mesothelioma in the present study is relatively higher than that reported in previous studies. For example, focal positivity was reported in 39% of 31 cases by Attanoos *et al.*,<sup>1</sup> in 50% of eight cases by Oates and Edwards,<sup>9</sup> in 70% of 10 cases by Lucas *et al.*<sup>19</sup> and in 100% of three cases by Doglioni *et al.*<sup>5</sup> But we observed that calretinin positivity tended to be less intense and less diffuse in the sarcomatoid components than in the epithelioid components of mesothelioma. Therefore, the utility of calretinin in the diagnosis of sarcomatoid mesothelioma is limited. WT1 was expressed in 89.7% of sarcomatoid mesotheliomas. In addition, the reactivity of WT1 was wider and stronger than that of calretinin. This result is different from that reported by Kumar-Singh *et al.*<sup>5</sup> and Lucas *et al.*<sup>19</sup> In the present study we examined nine biopsy specimens; the pathological diagnosis of sarcomatoid mesothelioma in small biopsy specimens is very challenging without immunohistochemistry. These nine cases were diagnosed based on histological findings combined with immunohistochemistry results such as calretinin or WT1 positivity. This bias may be the reason for the higher positive rates of

calretinin and WT1 for sarcomatoid mesothelioma than that reported in previous studies. The mesothelioma (epithelioid type) markers, including calretinin and WT1, had relatively high positivity; but the grading of positivity tended to be lower than that of epithelioid mesothelioma as compared to that reported in our previous study<sup>20</sup> and other studies.<sup>16</sup> In sarcomatoid mesothelioma, calretinin- and WT1-positive results were observed mainly in the cytoplasm; this is in contrast to epithelioid mesothelioma that had positivity in the nucleus.

Cytokeratin positivity is considered essential for the diagnosis of mesothelioma. In the present study AE1/AE3 and CAM5.2 were expressed in 84.6% and 92.3% of sarcomatoid mesotheliomas, respectively. These positive rates in sarcomatoid mesothelioma are comparable with those reported in previous studies. For example, Attanoos *et al.* reported AE1/AE3 positivity in 77% of 31 cases;<sup>1</sup> Montag *et al.* reported 100% positivity in 16 cases using AE1/AE3 and two polyclonal anticytokeratin antibodies;<sup>7</sup> and Lucas *et al.* reported 70% positivity in 10 sarcomatoid mesotheliomas and 90% positivity in 10 biphasic mesotheliomas using AE1/AE3, CAM5.2, and CK-904.<sup>19</sup> The AE1/AE3 antibody reacts with low- and high-molecular-weight (52–68 kDa) cytokeratin. In contrast, the CAM5.2 antibody reacts with low-molecular-weight (43 and 52 kDa) keratin. Hence, it was expected that AE1/AE3 positivity would be higher than that of CAM5.2, but the opposite was obtained. This result indicates that mesothelioma cells mainly express 43 kDa low-molecular-weight keratin. A similar tendency was observed in epithelioid mesothelioma cases in our previous study.<sup>20</sup> However, the accuracy of molecular weights of cytokeratins recognized by these antibodies is questionable because AE1/AE3-negative

and CAM5.2-positive findings are sometimes observed in other tumors.

Mesenchymal markers such as  $\alpha$ -SMA, desmin, S-100p, CD34, and CD68 were expected to be negative for differentiating sarcomatoid mesothelioma from true sarcomas. But in the present study >50% of sarcomatoid mesotheliomas had  $\alpha$ -SMA and CD68 positivity, and more than one-third of sarcomatoid mesotheliomas had S-100p positivity. Thus, these three markers appear to have no value as a discriminator of sarcomatoid tumors. In contrast, most of the sarcomatoid mesotheliomas were negative for desmin and CD34. Thus, it is possible that these two markers are negative for sarcomatoid mesothelioma. But the reactivity of mesenchymal markers in true sarcomas varies in each case; therefore these two markers do not appear to have much value as a discriminator of sarcomatoid tumors. In previous studies on these mesenchymal markers, smooth muscle or myofibroblastic differentiation, evident on  $\alpha$ -SMA expression, has been demonstrated in mesothelioma by Kung *et al.*<sup>21</sup> and Lucas *et al.*<sup>19</sup> Subsequently, Scoones and Richman reported desmin positivity in 12 of 38 sarcomatoid components (32%) of mesothelioma,<sup>22</sup> and Mayall *et al.* reported desmin positivity in 10 of 19 biphasic mesotheliomas (53%) and 0 of 13 sarcomatoid mesotheliomas (0%).<sup>23</sup> Attanoos *et al.* reported that desmin is a useful marker for differentiating benign from malignant mesothelial proliferation.<sup>24</sup> But there is no report that suggests the utility of desmin in differentiating sarcomatoid mesothelioma from other sarcomatoid tumors. In the present study the positive rate of  $\alpha$ -SMA in sarcomatoid mesothelioma was higher than that of desmin. A possible reason why  $\alpha$ -SMA had higher positivity in sarcomatoid mesothelioma is myofibroblastic differentiation of mesothelioma cells. However, the  $\alpha$ -SMA antibody consistently stained the stroma of invasive mesothelioma; this could lead to diagnostic misinterpretation. Hence, careful observation of the immunohistochemical slides stained with HE is required. In addition, because macrophages often exhibit positive reaction for CD68, the CD68 immunostaining should also be carefully observed.

In terms of sensitivity, specificity, and grading of reactivity, CAM5.2 appears to be the most useful positive marker for differentiating sarcomatoid mesothelioma from true sarcoma. Among the combinations of two or three antibodies, three combinations had 100% sensitivity; but the specificity of these combinations was low. Therefore, these combinations are not useful for differentiating the tumors (Table 6). In contrast, eight combinations exhibited the highest specificity (97.7%), but the sensitivity of these combinations was low. Therefore, these combinations are also not useful for differentiating the tumors (Tables 6,7). The combination of CAM5.2, WT1, and AE1/AE3 (both CAM5.2 positivity and (WT1 positivity or AE1/AE3 positivity)) had considerably high sensitivity and specificity and appears to be the best combi-

nation for differentiating the tumors (Table 7). A diagnostic flowchart based on immunohistochemical scoring of sarcomatoid mesothelioma and true sarcoma with CAM5.2, WT1, and AE1/AE3 is shown in Fig. 3(b). Almost all the sarcomatoid mesotheliomas and sarcomas involving the pleura could be differentiated using this flowchart.

The cytokeratins used in ordinary pathology laboratories, for example, AE1/AE3 and CAM5.2, are not mesothelial cell-specific markers but an accurate diagnosis can be made by combining multiple antibodies. Hence, it is essential to elucidate new markers with high sensitivity and specificity. Some exceptional sarcomatoid mesotheliomas exhibit unusual expression patterns for these antibodies. In such cases the clinical history, asbestos-exposure history, location, and radiological findings (CT or magnetic resonance imaging (MRI)) would be useful.<sup>19</sup>

The present study did not include synovial sarcoma, which is sometimes difficult to differentiate from sarcomatoid mesothelioma. Histologically, synovial sarcomas are either monophasic (consisting entirely of spindle cells) or biphasic (consisting both epithelial and spindle cells).<sup>10</sup> Biphasic tumors are more distinctive and thus more easily differentiated from other pleural sarcomas. The monophasic variant is histologically similar to other spindle cell sarcomas and sarcomatoid mesothelioma. Immunohistochemical findings that differentiate synovial sarcoma from other pleural sarcomas include positive staining for cytokeratin and EMA. Synovial sarcomas exhibit negative staining for neural (S-100p) and smooth muscle (desmin and  $\alpha$ -SMA) markers.<sup>25</sup> This staining pattern is similar to that of sarcomatoid mesothelioma, thus limiting its use. The epithelial marker BerEp4 may help to differentiate biphasic synovial sarcoma from biphasic mesothelioma because it consistently stains the epithelioid component of biphasic synovial sarcoma but is only focally positive in the epithelioid component of biphasic mesothelioma.<sup>25</sup> However, this marker is less useful for differentiating sarcomatoid mesothelioma from monophasic synovial sarcoma, which also stains scarcely with BerEp4.<sup>25</sup> The chromosomal translocation t(X; 18)(p11.2; q11.2) has been found in >90% of synovial sarcomas, regardless of the histological subtype.<sup>26-29</sup> This translocation results in the fusion of the SYT gene on chromosome 18 with the SSX1 or SSX2 gene on chromosome X.<sup>30</sup> Therefore, genetic analysis is also useful for differential diagnosis of malignant mesothelioma from synovial sarcoma.

In the present study we included nine sarcomatoid carcinomas of the lung. The definition of sarcomatoid carcinoma described in the WHO (2004) criteria is 'poorly differentiated non-small cell lung carcinomas that contain a component of sarcoma or sarcoma-like (spindle and/or giant cells) differentiation'.<sup>10</sup> In the present study WT1 and EMA expression differed significantly between sarcomatoid mesothelioma and sarcomatoid carcinoma. However, no markers among the 10

antibodies had high sensitivity or specificity (data not shown) in the analysis of only nine sarcomatoid carcinomas. Hence, other specific markers of sarcomatoid carcinoma are required in order to arrive at a definite conclusion. Lucas *et al.* studied 10 pulmonary sarcomatoid carcinomas using a six-antibody panel that included pan-cytokeratin, CK5/6, calretinin, WT1, thrombomodulin, and  $\alpha$ -SMA.<sup>18</sup> They concluded that immunohistochemistry plays a limited role in the differential diagnosis of sarcomatoid tumors as compared to epithelioid tumors; they also highlighted the significance of clinicopathological information such as pleural lining and gross appearance. Rossi *et al.* performed immunohistochemical analysis using CK7, CK20, thyroid transcription factor-1 (TTF-1), and surfactant apoprotein-A (SP-A) in sarcomatoid carcinoma.<sup>31</sup> They reported that TTF-1 and CK7 but not SP-A may be extremely useful in supporting the pulmonary origin of sarcomatoid carcinoma.

### CONCLUSION

It is suggested that the combination of CAM5.2, AE1/AE3, and WT1 antibodies is the most useful immunohistochemistry panel for differentiating sarcomatoid mesothelioma from true sarcoma. There is presently no useful marker for differentiating sarcomatoid mesothelioma from sarcomatoid carcinoma. Therefore, the clinical history, asbestos-exposure history, location, and radiological findings (CT or MRI) are important for accurate pathological diagnosis of sarcomatoid mesothelioma.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the pathologists at the 27 external institutions for performing immunohistochemical staining and for providing the results of the analysis, and Ms Midori Nagai (Technical Center, Hiroshima University) for her excellent technical assistance.

### REFERENCES

- Attanoos RL, Dojcinov SD, Webb R *et al.* Anti-mesothelial markers in sarcomatoid mesothelioma and other spindle cell neoplasms. *Histopathology* 2000; **37**: 224–31.
- Carella R, DeLeonardi G, D'Errico A *et al.* Immunohistochemical panels for differentiating epithelial malignant mesothelioma from lung adenocarcinoma: A study with logistic regression analysis. *Am J Surg Pathol* 2001; **25**: 43–50.
- Carter D, Otis CN. Three types of spindle cell tumors of the pleura. Fibroma, sarcoma, and sarcomatoid mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 1988; **10**: 747–53.
- Cury PM, Butcher DN, Fisher C *et al.* Value of the mesothelioma-associated antibodies thrombomodulin, cyto-

- keratin 5/6, calretinin, and CD44 in distinguishing epithelioid pleural mesothelioma from adenocarcinoma metastatic to the pleura. *Mod Pathol* 2000; **13**: 107–12.
- Dogliani C, Tos AP, Laurino L *et al.* Calretinin: A novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 1996; **9**: 1037–46.
- Kumar-Singh S, Segers K, Rodeck U *et al.* WT1 mutation in malignant mesothelioma and WT1 immunoreactivity in relation to p53 and growth factor receptor expression, cell-type transition, and prognosis. *J Pathol* 1997; **181**: 67–74.
- Montag AG, Pinkus GS, Corson JM. Keratin protein immunoreactivity of sarcomatoid and mixed types of diffuse malignant mesothelioma. An immunoperoxidase study of 30 cases. *Hum Pathol* 1988; **19**: 336–42.
- Oates J, Edwards C. HBME-1, MOC-31, WT1 and calretinin: An assessment of recently described markers for mesothelioma and adenocarcinoma. *Histopathology* 2000; **36**: 341–7.
- Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon: IARC Press, 2002.
- Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK *et al.* *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon: IARC Press, 2004.
- Churg A, Cagle PT, Roggli VL. *AFIP Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the Serosal Membranes*. Washington, DC: American Registry of Pathology, 2006.
- Ordóñez NG. Localized (solitary) fibrous tumor of the pleura. *Adv Anat Pathol* 2000; **7**: 327–40.
- Barnetson RJ, Burnett RA, Downie I *et al.* Immunohistochemical analysis of peritoneal mesothelioma and primary and secondary serous carcinoma of the peritoneum: Antibodies to estrogen and progesterone receptors are useful. *Am J Clin Pathol* 2006; **125**: 67–76.
- Chu AY, Litzky LA, Pasha TL *et al.* Utility of D2–40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Mod Pathol* 2005; **18**: 105–10.
- Kimura N, Kimura I. Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int* 2005; **55**: 83–6.
- Ordóñez NG. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: A comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003; **27**: 1031–51.
- Ordóñez NG. D2–40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 2005; **36**: 372–80.
- Ordóñez NG. Value of immunohistochemistry in distinguishing peritoneal mesothelioma from serous carcinoma of the ovary and peritoneum: A review and update. *Adv Anat Pathol* 2006; **13**: 16–25.
- Lucas DR, Pass HI, Madan SK *et al.* Sarcomatoid mesothelioma and its histological mimics: A comparative immunohistochemical study. *Histopathology* 2003; **42**: 270–79.
- Kushitani K, Takeshima Y, Amatya VJ *et al.* Immunohistochemical marker panels for distinguishing between epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Pathol Int* 2007; **57**: 190–99.
- Kung IT, Thallus V, Spencer EJ *et al.* Expression of muscle actins in diffuse mesotheliomas. *Hum Pathol* 1995; **26**: 565–70.
- Scoones DJ, Richman PI. Expression of desmin and smooth muscle actin in mesothelial hyperplasia and mesothelioma. *J Pathol* 1993; **169S**: 188A.
- Mayall FG, Goddard H, Gibbs AR. Intermediate filament expression in mesotheliomas: Leiomyoid mesotheliomas are not uncommon. *Histopathology* 1992; **21**: 453–7.
- Attanoos RL, Griffin A, Gibbs AR. The use of immunohistochemistry in distinguishing reactive from neoplastic mesothe-

- lium. A novel use for desmin and comparative evaluation with epithelial membrane antigen, p53, platelet-derived growth factor-receptor, P-glycoprotein and Bcl-2. *Histopathology* 2003; **43**: 231-8.
- 25 Miettinen M, Limon J, Niezabitowski A, Lasota J. Calretinin and other mesothelioma markers in synovial sarcoma: Analysis of antigenic similarities and differences with malignant mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 2001; **25**: 610-17.
- 26 Argani P, Zakowski MF, Klimstra DS *et al*. Detection of the SYT-SSX chimeric RNA of synovial sarcoma in paraffin embedded tissue and its application in problematic cases. *Mod Pathol* 1998; **11**: 65-71.
- 27 Kawai A, Woodruff J, Healey JH *et al*. SYT-SSX gene fusion as a determinant of morphology and prognosis in synovial sarcoma. *N Engl J Med* 1998; **338**: 153-60.
- 28 Nagao K, Ito H, Yoshida H. Chromosomal translocation t(X;18) in human synovial sarcomas analyzed by fluorescence in situ hybridization using paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol* 1996; **148**: 601-609.
- 29 van de Rijn M, Barr FG, Collins MH *et al*. Absence of SYT-SSX fusion products in soft tissue tumors other than synovial sarcoma. *Am J Clin Pathol* 1999; **112**: 43-9.
- 30 de Leeuw B, Balemans M, Olde Weghuis D *et al*. Identification of two alternative fusion genes, SYT-SSX1 and SYTSSX2, in t(X;18)(p11.2; q11.2)-positive synovial sarcomas. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 1097-9.
- 31 Rossi G, Cavazza A, Sturm N *et al*. Pulmonary carcinomas with pleomorphic, sarcomatoid, or sarcomatous elements: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 75 cases. *Am J Surg Pathol* 2003; **27**: 311-24.

表題

著者名

---

---

醫學のあゆみ 別刷

第 卷・第 号： 年 月 日号



## 病理よりみたアスベスト関連疾患の特徴と問題点

Characters and problems about asbestos-related diseases on the basis of pathology



井内康輝(写真) 武島幸男

Kouki INAI and Yukio TAKESHIMA

広島大学大学院医歯薬学総合研究科病理学

◎アスベストへの曝露による疾患の代表は、非腫瘍性疾患としてのアスベスト肺と、腫瘍性疾患としての中皮腫および肺癌である。アスベスト肺は塵肺症の一種であり、末梢肺の呼吸細気管支周囲からはじまる線維化とアスベスト小体の沈着が特徴である。画像診断では HRCT で小葉中心性に分布する多くの粒状影をみることが特発性肺線維症との鑑別点となる。中皮腫はその大半がアスベスト曝露によって生じる特異な腫瘍であるが、分子生物学的な研究によってもその発生機序についてはいまだ明確でない。その組織像は上皮型、肉腫型、二相型、線維形成型など多彩であり、その病理診断は難しい。そこで確定診断のためには免疫組織化学的染色が有用であるが、組織型に応じて適切な抗体を選択することが重要である。また、小さな生検材料を用いる場合は、中皮細胞の反応性過形成や線維性胸膜炎との鑑別診断を慎重に行う必要がある。



アスベスト肺、中皮腫、免疫組織化学的染色、アスベスト小体

アスベスト曝露に起因する疾患は表 1 のようにまとめられる。これらのなかで労災補償制度における補償の対象疾患は、アスベスト肺と平成 15 年(2003)から加わった良性石綿胸水、びまん性胸膜肥厚、円形無気肺であり、腫瘍性疾患(中皮腫、肺癌)とともに補償される範囲が広がった。平成 18 年(2006)3 月に成立した一般生活環境下での住民のアスベスト曝露による健康被害の救済法では、腫瘍性疾患の中皮腫、肺癌のみが対象となったが、その理由は中皮腫、肺癌が致命的な疾患であり、診断後の経過が長くないことから、救済制度の必要性が高いことによる。また、一般生活環境のもとではアスベスト肺と診断されるほどの肺の線維化は生じにくいと判断され、他の原因による間質性肺炎との鑑別も難しいと考えられたことがあげられる。

本稿では非腫瘍性疾患であるアスベスト肺と、腫瘍性疾患のうち中皮腫について、その特徴と問題点をあげてみたい。なお、肺癌については本特

表 1 アスベスト曝露に起因する疾患・病変

非腫瘍性疾患・病変	
1.	アスベスト肺(塵肺)
2.	良性石綿胸水
3.	びまん性胸膜肥厚
4.	円形無気肺
5.	胸膜ブランク(胸膜肥厚斑)
腫瘍性疾患	
1.	中皮腫
2.	肺癌

集の別稿において述べられているので、参照していただきたい。

### アスベスト肺の診断とその問題点

アスベスト肺の組織所見の初期像の特徴は、小葉中心の呼吸細気管支周囲の線維化である。この点が通常型の特発性肺線維症とは異なり、小葉中心から小葉辺縁へ広がる線維化がアスベスト肺の特徴といえる。呼吸細気管支周囲から線維化がはじまる理由はこの部でアスベスト繊維が肺実質へ

表 2 アスベスト肺(石綿肺)のgrade分類

I. Severity (局所の進行度)	
Grade 1:	すくなくとも1個の呼吸細気管支周囲に線維化をみる、これに隣接する肺胞壁に線維性肥厚があってもなくてもよい。
Grade 2:	Grade 1に加えて、隣接する2列目以遠の肺胞壁に線維性肥厚があり、隣在する細気管支との間に、線維性肥厚のない肺胞が存在する。
Grade 3:	Grade 2に加えて、隣在する細気管支との間の肺実質の線維化が連続してしまい、ときに肺胞腔が消失する。
Grade 4:	Grade 3に加えて、幅1cmまでの裂隙が生じる(蜂窩肺)
II. Extent (肺内の広がり)	
A:	ごくわずかの細気管支に変化がみられるのみである
B:	Aより強いが、変化のある細気管支は半数以下である
C:	半数以上の細気管支に変化をみる

侵入するからであるが、アスベスト繊維に対する反応は、繊維の種類や形状、鉄の含量などによって異なる。クリソタイルよりクロシドライトやアモサイトで線維化は強く起こるが、吸入された繊維の量と線維化の量-反応関係は一定でない。吸入から時間を経ると、肺胞腔内のみならず、線維性結合織中に褐色の数珠状あるいは串団子状の形態をとるアスベスト小体が多数認められる。線維化は細気管支壁から隣接した肺胞壁、肺胞道、肺胞囊の壁へと広がり、隣在する細気管支間をつながり、線維化の進展によって最終的には蜂窩肺(honeycomb lung)の所見を示すことになる。

アスベスト肺と特発性肺線維症との画像診断上の鑑別には胸部HRCTが有用である。ともに下肺野の末梢優位の線状・網状影をみるが、アスベスト肺ではHRCT上細気管支周囲の線維化が蜂窩肺部分以外の胸膜直下で小葉中心性に分布する多くの粒状影として認められる。一方、特発性肺線維症では小葉辺縁部に病変分布が強い。

Pneumoconiosis Committee of College of American Pathologist(CAP) and the National Institute for Occupational Safety and Health(NIOSH)(1982)においては、アスベスト肺(石綿肺)の特徴は「呼吸細気管支壁にみる明瞭な線維化と石綿小体の集簇」とされ、その程度分類が表2のようになされている<sup>1)</sup>。この内容は1997年ヘルシンキで開かれた国際会議(the International Expert Meeting on Asbestos, Asbestosis and Cancer)での組織診断基準でも踏襲され、アスベスト肺とは、「よく膨らませた肺において、肺癌あるいは肺の腫瘍とは離れ

て、びまん性の間質線維化と組織切片上1cm<sup>2</sup>の領域に2個以上のアスベスト小体(石綿小体)をみるか、被覆されていない繊維(uncoated fiber)をみる」と定義されている<sup>2)</sup>。光学顕微鏡でアスベスト小体を認めにくい場合は、電子顕微鏡を用いてuncoated fiberをみる必要がある、ともされており、定量法では肺乾燥重量1g当り1,000個以上のアスベスト小体をみるのが職業性曝露の基準である。

こうした線維化の生じる機序についてはいまだ不明な点が多い。アスベスト繊維の吸入によるマクロファージの誘導、マクロファージによるアスベスト繊維の貪食とさまざまなサイトカインや成長因子の放出、さらにそれらのネットワークの形成、などの過程が考えられるが、ヒトにおいて*in vivo*でこの詳細を明らかにすることは難しい。

じん肺法における「アスベスト肺(石綿肺)」はあくまで画像上の所見であり、この法律で定める第1型以上の肺線維化所見がある例とされている。あらたにつくられた救済法では、胸部X線検査でじん肺法に定める第1型以上と同様の所見があり、胸部CT検査においても肺線維化所見が認められることを「アスベスト肺(石綿肺)」の基準としている。また、救済法では上記の画像所見が明確でない場合、肺内アスベスト小体またはアスベスト繊維の量が一定量以上、すなわち乾燥肺重量1g当り5,000本以上のアスベスト小体あるいは200万本以上のアスベスト繊維(5 $\mu$ m超の場合、2 $\mu$ m超の場合は500万本以上)または気管支肺胞洗浄液1ml当り5本以上のアスベスト小体、

表 3 中皮腫の組織分類(WHO 分類, 1999 より改変)

1. 上皮型中皮腫	Epithelioid mesothelioma
2. 肉腫型中皮腫	Sarcomatoid mesothelioma
1) 線維形成型中皮腫	Desmoplastic mesothelioma
3. 二相型中皮腫	Biphasic mesothelioma
4. 特殊型	
1) リンパ組織球様	Lymphohistiocytoid
2) 粘液腫様間質脱落膜様	Myxoid stroma deciduoid
3) 多嚢胞性	Multicystic
4) 低分化型あるいは退形成型	Poorly differentiated or anaplastic
5) その他	Others

のいずれかが認められれば、肺癌の発生リスクを2倍以上とする25本/ml×年のアスベスト曝露があると判断することになっている。

アスベストの沈着量と肺線維化との相関関係を検討した報告は少ない。Rogliiら<sup>3)</sup>は、病理学的にアスベスト肺を伴うと診断された70例の肺癌症例では、肺内のアスベスト繊維(5μm超)の量の中央値は肺湿重量1g当り25.3万本(乾燥肺重量1g当りでは253万本に相当する)であったと報告している。この値は、前述したヘルシンキ国際会議のコンセンサスレポートで示された肺癌の相対リスクを2倍とする基準である。乾燥肺重量1g当りアスベスト繊維200万本(5μm超)とほぼ同じである。しかし、個々の症例でみた場合、アスベスト繊維の量と線維化の程度との間に、明確な量-反応関係を見出すことは難しい。

### 中皮腫の病理診断とその問題点

従来、中皮腫の発生はまれで、肺癌と比べて1/100程度であることから、個々の医療機関での経験数がごく少なく、多くは年1例の経験にとどまる<sup>4)</sup>。さらに、中皮腫の組織型は表3のとおりであるが、上皮性悪性腫瘍(癌腫)に類似し胸腔では肺の腺癌、腹腔では卵巣の漿液性腺癌や腹膜の漿液性癌との鑑別が必要な例(上皮型中皮腫)、非上皮性悪性腫瘍(肉腫)に類似し骨軟部組織や各臓器に生じる肉腫との鑑別が必要な例(肉腫型中皮腫)、また、癌腫様成分と肉腫様成分が混在し癌肉腫や二相型滑膜肉腫などの他の二相性腫瘍との鑑別が必要な例(二相型中皮腫)、さらに広い範囲が細胞密度の低い癒痕あるいは肉芽様の線維性結合組織からなり線維性胸膜炎との鑑別が必要な例

(線維形成型中皮腫, desmoplastic mesothelioma)に加えて、リンパ球様の小型細胞からなる例など多くの特殊型があり、きわめて多彩な組織像を示すといえる<sup>5)</sup>。したがって、中皮腫の病理診断にはHE染色による組織像の適切な判断と、それに基づく適切な抗体を用いた免疫組織化学的染色が必須となる。

著者らの検討によると、上皮型中皮腫を肺腺癌と鑑別するためには、陽性となる抗体としてcalretinin, WT1, thrombomodulinが感度・特異度からみて有用であり、陰性となる抗体としてはCEA, TTF-1などが用いられるべきである<sup>6)</sup>。一方、肉腫型中皮腫を他の肉腫と鑑別するためには、陽性となる抗体としてCAM5.2あるいはAE1/AE3を用い、他の肉腫において特徴的に陽性となる抗体、S100p, CD34, myoglobin, myoD1などを中皮腫では陰性となる抗体として用いることが勧められる。そのほか、D2-40, mesothelinなども中皮腫のマーカーとしては有用である。女性に生じた腹膜中皮腫は免疫組織化学的染色を用いても鑑別が難しいが、Ber-EP4, MOC-31など卵巣癌に特徴的に陽性となる抗体を用いることが参考となる。

小さな生検材料で中皮腫を診断することはいっそう難しい。炎症やプラの存在などで上皮様の中皮細胞が過形成を示す場合、上皮型中皮腫の初期像との鑑別が難しい。この場合、過形成を示す中皮細胞ではdesminが陽性で、EMAおよびp53(遺伝子蛋白)が陰性となり、中皮腫では逆にEMAおよびp53が陽性で、desminは陰性であることが参考となる<sup>5)</sup>。一方、線維性胸膜炎と線維形成型あるいは肉腫型中皮腫の鑑別はさらに難しい。胸膜炎では胸腔側で細胞密度が高く、深部になると細胞

表 4 中皮腫における分子・遺伝子レベルの異常

がん遺伝子	K-ras, N-ras, CDK4: mutation なし β-catenin: 低率に mutation あり
がん抑制遺伝子	p53: mutation はごく少ない RB: mutation はごく少ない p16/CDKN2A: 高率に deletion あり NF2: 高率に mutation あり
成長因子	PDGF, IGF-I: 高発現例あり
サイトカイン	TGF-β, IL-6, IL-8, GM-CSF の発現例あり

密度が低下するという zonation (層状構造) があり、胸腔面に垂直な細くて長い毛細血管を多くみることが特徴である<sup>7)</sup>。免疫組織化学的染色では胸膜炎にみる紡錘形細胞にはサイトケラチン (抗体として CAM5.2 あるいは AE1/AE3 を用いる) はしばしば陽性となるので、鑑別に用いることはできない。Desmin は胸膜炎では陽性で、中皮腫では陰性であることが多い点が鑑別に有用である。

#### アスベストによる中皮腫の発生機序

アスベストによる中皮腫の発生は疫学的には多くの事実によって証明され、動物実験でも胸腔や腹腔へのアスベスト繊維の強制的な投与によって発癌が証明されているが、ヒトにおいてその発生機序が明確にされているわけではない<sup>8)</sup>。ひとつには経気道的に吸引されたアスベスト繊維が胸腔や腹腔の表面を覆う中皮細胞をなぜ標的とするか、繊維の体内での移動はある程度証明されているが、細胞の発癌感受性という面からみると不明な点が多い。また、アスベスト繊維は中皮細胞に刺入すると思われるが、発癌の面からみて、その機械的刺激が重要なのか、あるいはクロシドライトを代表として鉄を多く含むアスベスト繊維による活性酸素の発生が遺伝子異常を引き起こすのか、についても定かではない。

これまでに報告された中皮腫細胞の分子・遺伝子レベルの異常を表 4 に示す。多くの癌で異常の頻度の高い p53, RB, ras の各遺伝子の変異の頻度は低い。Genetic な変化よりむしろメチル化などの epigenetic な変化が重要かもしれないが、いまだ十分な検討はできておらず、今後の大きな課題

である。

#### おわりに

アスベスト曝露は経気道的に起こることが多く、当然のことながら肺および胸膜の傷害の頻度が高い。しかし中皮腫は腹膜や、まれに心膜、精巣鞘膜にも発生し、この場合はアスベストの体内での移動を考慮せざるをえない。さらに、肺においては腫瘍病変のみならず線維化を引き起こすが、それらの機序については多くのことが不明である。いずれも頻度の低い疾患であり、これまではこれを扱う研究者も多くなかったが、アスベスト曝露による中皮腫あるいは肺癌が増加している現状をみると、早急な研究の進展が望まれるところである。

#### 文献

- 1) Craighead, J. E.: *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **106**: 544-596, 1982.
- 2) Consensus Report: *Scand. J. Work Environ. Health*, **23**: 311-316, 1997.
- 3) Roggli, V. L. and Sanders, L. L.: *Ann. Occup. Hyg.*, **44**: 109-117, 2000.
- 4) 厚生労働省: 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, 2006.
- 5) 井内康輝・他: 病理と臨床, **22**: 681-686, 2004.
- 6) Kushitani, K. et al.: Immunohistochemical panels for distinguishing between epithelioid malignant mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma. (in submitted)
- 7) US-Canadian Mesothelioma Reference Panel: *Am. J. Surg. Pathol.*, **24**: 1183-1200, 2000.
- 8) Jaurand, M. C. and Fleury-Feith, J.: *Respirology*, **10**: 2-8, 2005.