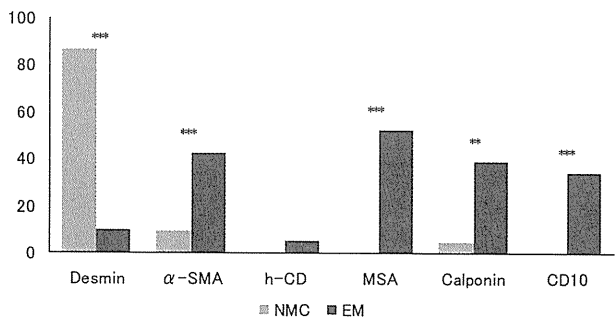


図7 肥厚した胸膜における中皮細胞の分布による良悪性の鑑別



NMC: non-neoplastic mesothelial cell, EM: epithelioid mesothelioma
 α-SMA: alpha-smooth muscle actin, h-CD: h-caldesmon
 MSA: muscle specific actin
 : p < 0.01, *: p < 0.001

図8 非腫瘍性中皮細胞と上皮型中皮腫の免疫組織化学的染色の比較

慮する。この際、免疫組織化学的染色で desmin が非腫瘍性中皮細胞では陽性、上皮型中皮腫では陰性であることが参考となる(図8)。Desmin は平滑筋のマーカーであるが、他の平滑筋マーカー(h-caldesmon など)は鑑別に使えない¹³⁾。この事実は、desmin が中皮細胞に発現する生物学的意義を探る必要性を感じさせる。

5. おわりに

中皮腫の病理診断における他の悪性腫瘍との鑑別、中皮細胞増殖病変の良悪性の鑑別について述べてきたが、これらの鑑別に際して免疫組織化学的染色が有用であることを強調したい。かつ、患者の治療を始める前に生検材料による診断が求められる場合には、可能な限り、胸膜や腹膜などの漿膜組織を広くかつ深部まで含めた材料の採取を行うことを臨床医に望みたい。さらにこうした材料について、迅速診断による判断が求められることがあるが、浸潤の有無の判断は容易でなく、免疫組織化学

的染色も必要な場合が多いことから、迅速診断による判断は行わないことが原則である。

文献

- 1) 神山宣彦, 星野圭司: 第2章. 石綿の用途と日本での使用状況, 石綿ばく露と石綿関連疾患—基礎知識と補償・救済, 増補新装版. 森永謙二編. 東京, 三信図書, 2008, pp 25.
- 2) Takeshima Y, Inai K, Amatya VJ, et al: Accuracy of pathological diagnosis of mesothelioma cases in Japan: Clinicopathological analysis of 382 cases. Lung Cancer (in press).
- 3) Inai K: Pathology of mesothelioma. Environ Health Prev Med 13: 60—64, 2008.
- 4) Allen TC, Cagle PT, Churg AM, et al: Localized malignant mesothelioma. Am J Surg Pathol 29: 866—873, 2005.
- 5) 立山義朗, 米原修治, 井内康輝, 他: 悪性中皮腫様の肉眼所見を示した肺癌の2剖検例. 広島医学 44: 756—761, 1991.
- 6) Travis WD, Brambilla E, Miller-Hermelink HK, Harris CC, editors: Pathology & Genetics, Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, IARC press, 2004, pp 128—136.
- 7) Cantin R, Al-Jabi M, McCaughey WTE: Desmoplastic diffuse mesothelioma. Am J Surg Pathol 6: 215—222, 1982.
- 8) 井内康輝: 中皮腫—病理所見の見方, 中皮腫アトラス. 東京, 篠原出版新社, 2009, pp 236—246.
- 9) 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.
- 10) Takeshima Y, Amatya VJ, Kushitani K, et al: A useful antibody panel for differential diagnosis between peritoneal mesothelioma and ovarian serous carcinoma in Japanese cases. Am J Clin Pathol 130: 771—779, 2008.
- 11) 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.
- 12) Churg A, Cagle PT, Roggli VL: Separation of benign and malignant mesothelial proliferations, Tumors of the Serosal Membranes. Washington, ARP Press, 2006, pp 83—102.
- 13) Tsukiji H, Takeshima Y, Kushitani K, et al: Myogenic antigen expression in epithelioid mesothelioma. (in submitted)

別刷請求先 〒734-8551 広島市南区霞1-2-3
 広島大学大学院医歯薬学総合研究科病理学
 井内 康輝

Reprint request:

Kouki Inai
 Department of Pathology, Graduate School of Biomedical Sciences Hiroshima University, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734-8551, Japan

Differential Pathological Diagnosis of Mesothelioma

Kouki Inai

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

Recently, mesothelioma, which is a malignant tumor related to asbestos-exposure, has rapidly increased, and this tendency is supposed to continue until 2030. The patients with mesothelioma have been compensated or relieved by law in Japan, however, more than 10% of applicants have been refused from compensation or relief. The reason is mainly the accuracy of pathological diagnosis, and therefore, the importance of differential diagnosis is pointed out now.

The occurrence sites of mesothelioma are limited to serosal membrane, that is, pleura, peritoneum, pericardium and tunica vaginalis, and the proportion of pleural case is extremely large. Grossly, diffuse type is dominant compared to localized type, however, pleural invasion of lung cancer rarely mimic the characteristics of mesothelioma. Histologically, mesothelioma is divided to epithelioid type, sarcomatoid type, desmoplastic type and biphasic type and others. Its histological varieties cause the difficulties of differential diagnosis, and on the pathological diagnosis, the immunohistochemical stainings using adequate antibodies are useful. Especially the differentiation between benign and malignant lesion is important for avoiding the excessive invasion as treatment to the patients.

(JJOMT, 57: 183—189, 2009)

第2部 社会問題となった疾患と病理学<環境>
1. アスベスト

井内康輝

病理と臨床【臨時増刊号】・別刷

2009 vol. 27

東京／文光堂／本郷

1. アスベスト

井内康輝*

はじめに

人類は古来、アスベスト(石綿)を日常生活において物の包装等に用いていた。例えばエジプトでは紀元前数百年頃に、ミイラを覆うためにアスベスト布が使われていたし、平安時代の日本でも奥州藤原氏がミイラにアスベスト布を使っていたことが平泉で発見されたミイラで確認されている。また、かぐや姫で有名な竹取物語(平安中期作)には、“火鼠の皮衣”と呼ばれてアスベスト布が登場する。江戸時代には平賀源内は秩父で発見したアスベストで織った布を使用し、これを“火流布”と名づけている。

明治時代、日本は本格的なアスベストの工業利用を始め、その利用量は徐々に増加したが、アスベストの体内への吸引・沈着による臓器障害について関心が払われることはなかった。第二次世界大戦後の経済成長のもとでは、産業界にとって有用な物質であるアスベストを社会から排除することは難しく、日本においてはアスベスト使用の法的規制の歩みは欧米に比べて20~30年遅れ、これが後年へ禍根を残す結果となった。本項では、こうしたアスベスト使用の歴史的な事

実をふまえて、アスベストによる臓器障害に関する病理学的情報をどのように社会に発信してきたか、考えてみたい。

I. アスベストとは何か

アスベストとは、工業的に用いられる繊維状鉱物の総称であり、鉱物名ではない¹⁾。鉱物学上の名称は結晶構造と化学組成の2要素によって決められるものであり、この点からは、アスベストという名称にはさまざまな鉱物が含まれており、その定義は鉱物学とは別に定めることが必要となる。WHOは1973年、“アスベストとは、多様な物理化学的性質をもつ天然の繊維状ケイ酸塩鉱物の総称で、クリソタイル、アクチノライト、アモサイト、アンソフィライト、クロシドライト、トレモライトに分類される”とした(表1)。ILO(1986)も同様の定義を用い、日本の労働関連法令でもこの6種類の鉱物名をあげている。

アスベストと呼ばれる6種類の鉱物は鉱物学的には蛇紋石族のクリソタイルと角閃石族のその他5種類に分けられるが、クリソタイルはすべて繊維状であるの

表1 アスベスト(石綿)の分類

	鉱物名	石綿名	化学組成式
蛇紋石族 Serpentines	クリソタイル (chrysotile)	クリソタイル (温石綿 chrysotile)	$Mg_3Si_2O_5(OH)_4$ 12001-29-5*
角閃石族 Amphiboles	グリユネ閃石 (grunerite) リーベック閃石 (曹閃石 riebeckite) アンソフィライト (直閃石 anthophyllite) トレモライト (透閃石 tremolite) アクチノライト (陽起石 actinolite)	アモサイト (褐石綿 amosite) クロシドライト (青石綿 crocidolite) アンソフィライト石綿 (fibrous anthophyllite) トレモライト石綿 (fibrous tremolite) アクチノライト石綿 (fibrous actinolite)	$(Mg, Fe)_7Si_8O_{22}(OH)_2$ 12172-73-5* $Na_2Fe_3^{2+}Fe_2^{3+}Si_8O_{22}(OH)_2$ 12001-28-4* $Mg_7Si_8O_{22}(OH)_2$ 77536-67-5* $Ca_2Mg_5Si_8O_{22}(OH)_2$ 77536-68-6* $Ca_2(Mg, Fe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$ 77536-66-4*

* : CAS No. (Chemical Abstracts Number) (文献1より改変)。

*広島大学大学院医歯薬学総合研究科病理学

表2 アスベスト(石綿)の特性

1. 木綿や羊毛と見間違ふほどにしなやかで糸や布に織れる(紡織性)
2. 引張りに強い(抗張力)
3. 摩擦・摩耗に強い(耐摩擦性)
4. 燃えないで高熱に耐える(耐熱性)
5. 熱や音を遮断する(断熱, 防音性)
6. 薬品に強い(耐薬品性)
7. 電気を通しにくい(絶縁性)
8. 細菌・湿気に強い(耐腐食性)
9. 比表面積が大きく, 他の物質との密着性に優れる(親和性)
10. 安価である(経済性)

(文献1より改変)

でアスベストとみなしてよいが, 角閃石族には, 肉眼的にも顕微鏡的にも繊維状でない鉱物があり, そのうち繊維状であるもののみがアスベストである。繊維状であることの定義は, 顕微鏡レベルでアスペクト比 aspect ratio (長さとの幅の比) が3かそれ以上である粒子とするのが一般的である。

II. アスベストの特性とその用途

アスベストが工業的に有用である理由は表2にあげられる。こうした特性はアスベスト以外の単一の天然

鉱物等にはみられないので, アスベストは“奇跡の鉱物”と呼ばれてきた。その用途はこれらの特性を生かして表3のように幅広い。日本でのこうした用途を歴史的にみると, 明治時代の後半に保温材やシール材としての生産が開始され, 大正時代に建築材料の生産が始まったとされる。第二次世界大戦以降は経済復興, 高度経済成長のもとで, 自動車のブレーキや機械類等, 建材分野での屋根材・壁材等, 煙突等のパイプ状製品, 継ぎ目等に使うパッキング・ガスケット等での利用が増加した。

また, 1955年頃から吹付け施工が広く行われた。すなわちアスベスト60%, セメント40%程度の割合で混合して, 学校, ビル, ホテル, 体育館, 駐車場等において, その鉄骨に吸音, 断熱・耐火, 結露防止等の目的で広く吹き付けられた。これにはアスベストの中でもクロシドライトが特に多く用いられた。数十年後の今日, 吹き付けられたものの劣化によるアスベストの飛散が, 重大な環境汚染をひき起こしている。

III. アスベストの生産量と輸入量および規制の推移

世界的にみると, 産業界で使用されてきたアスベストは, クリソタイル, アモサイト, クロシドライト, アンソフィライトの4種類であるが, そのうちクリソ

表3 アスベスト(石綿)の用途

	製品名	使用部門	使用箇所
石綿製品	石綿糸 石綿布 石綿パッキング, ひも 石綿ゴム引テープ 石綿ゴム加工 ジョイントシート 石綿板(ミルボード) ブレーキライニング ランバー(ヘミット) 電解隔膜 石綿紙	熱を使用する各部門 造船, 製鉄, 自動車 機関車, 製鉄, 化学工業 船舶, 化学, 機械, 製紙 船舶, 発電所, 機械, 化学 蒸気を使用する各部門 船舶, ガス, 鉄鋼, 自動車 船舶, 自動車, 機械, 鉄道 電気工業, 鉄道 硫酸工業, ソーダ工業 電気, ソーダ	石綿糸, パッキング 防火カーテン, パッキング ドア, 蓋の高熱部分 エンジンカバー, 薬品槽の蓋 パッキング 蒸気フランジのパッキング 防熱壁, パッキング 自動車のブレーキ, 捲揚機 耐熱母体 電気分解の隔膜 電線絶縁紙
セメント製品	石綿スレート 石綿円筒 石綿高圧管	工場, 家屋等 工場, 家屋等 電気, 水道	防火壁 煙突 上水道, 電線
その他	アスファルト混合 鑄鉄管ライニング 潤滑用グリース	建築, 自動車 機械, 土木 機械	屋根, 自動車車体, タイル 鑄鉄管 ベアリング用グリース

(文献1より改変)

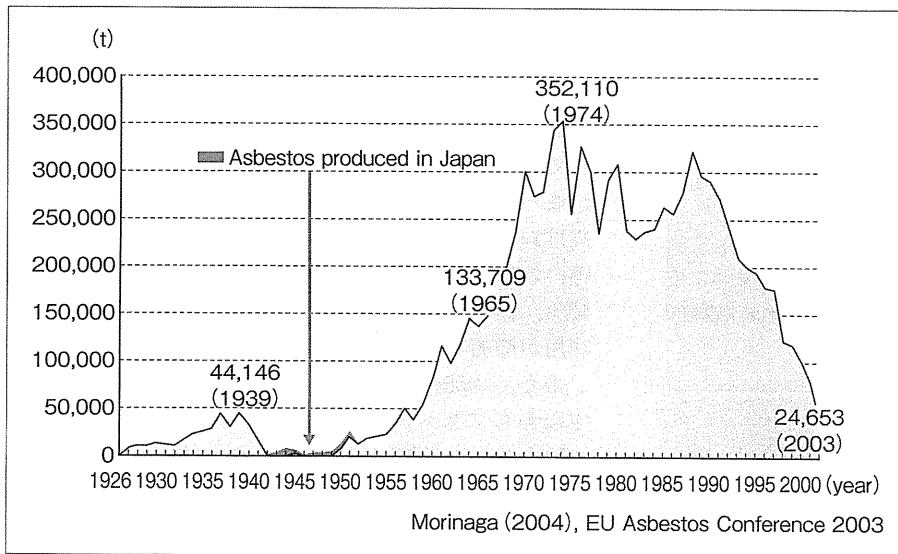


図1 日本のアスベスト輸入量(使用量)の推移

表4 世界および日本におけるアスベスト使用の規制

1972年	WHO: アスベストの発癌性を指摘
1973年	アメリカ: アスベストの吹付けを禁止(日本: 1975年)
1986年	ILO: 石綿管理条約の締結→クロシドライトとアモサイトの使用禁止
1990~93年	オーストリア, オランダ, イタリア, フィンランド, ドイツ: アスベストの使用禁止
1995年	日本: 労働安全衛生法施行令の改正→含有する製品の製造・輸入・使用の禁止
2004年	日本: クリソタイルを含むすべてのアスベストの製造・輸入・使用の禁止(一部を除く)
2005年	日本: アスベスト使用の全面禁止(代替品のない一部を除く)

タイルが90%以上を占め、次いでアモサイト、クロシドライトの順である。クリソタイルはカナダ、南アフリカ、ロシア、中国、ブラジル、イタリアの順に産出量が多い。アモサイトは南アフリカ、クロシドライトは南アフリカ、オーストラリア、中国等に産出国は限られている。世界の産出量は1992年の約335万トン(t)から、1998年の約176万tへと約半分に減少している。1988年の産出量の国別順位は、ロシア、カナダ、中国、ブラジルである。

一方日本では、明治・大正時代には、アスベストの産出はなく、専らカナダ、南アフリカ等からの輸入に依存してきたが、日中戦争の進展とともに輸入が途絶えたため、国内のアスベスト鉱山の開発が進められた。その結果、1937年、北海道富良野地方でクリソタイル鉱床が、熊本県松橋地方でアンソフィライト鉱

床が発見され、わずかな量の算出が始まった。加えて朝鮮半島や満州(中国東北部)での鉱床の開発が行われ、1944年には年間8,000tの産出量を示したが、これらのアスベストは主に軍用の船舶や航空機の製造に用いられた。

日本のアスベストの輸入量の推移を図1に示す。第二次世界大戦前は5万t未満であったが、1950年以降年々増加し、1974年に35万2千t(最高値)に達した。その後は表4に示すように使用規制が始まり、2000年以降は10万tを下回って2005年にはついにほぼゼロとなった。しかしこれまでに日本に輸入されたアスベストの総量はおよそ1,000万tに達し、これがさまざまな形でヒトの健康被害の原因となっているのである。

IV. アスベストによる健康被害の歴史

1. アスベスト(石綿)肺

ヨーロッパでは、アスベストを1800年代の初めから使ってきたが、これによる健康被害が問題となり初めたのは、アスベスト産業が本格的に勃興した1800年代末である。すなわち、フランスのアスベスト紡織工場では1890年から1895年の間に16人の労働者の死亡があり、またイギリスでも1899年、11人の若い男性(30歳代まで)の死亡があり、そのうち1例が剖検されて進行の早い肺疾患と記録されている。1924年になり、Cookeによって33歳の女性労働者の肺の病理

所見が報告され“pulmonary asbestosis (石綿肺)”と初めて命名されている。

一方、日本でのアスベスト肺の最初の報告は1929年、鈴木らによってなされている(45歳、男性例)。その後も大阪府下の泉南地方を中心に、アスベストを扱う工場従業員におけるアスベスト肺が報告され、大阪府下では1985年末までに、アスベスト肺によって管理4とされている、あるいは合併症による要療養患者は182人にのぼる²⁾。

2. 肺 癌

1935年、アメリカのLynch & SmithとイギリスのGloyneはほぼ同時に、アスベスト肺に肺癌を合併した事例を報告している。しかし、アスベストへの曝露と肺癌の関係が疫学的に証明されたのは、1955年に至ってイギリスのDollの報告であり、アスベストを扱う工場で20年以上働く労働者の肺癌の死亡率が一般の13.75倍であったことに基づく。また、Dollは1971年、喫煙とアスベストへの曝露は相乗的に肺癌のリスクを高めることも示唆した。

日本では1960年、瀬良らによってアスベスト工場従業員の肺癌が報告されたのが嚆矢といえる。以後、アスベストを扱う労働者のコホート調査が行われ、肺癌による死亡の相対危険度は2~6倍とされている²⁾。

3. 中皮腫

中皮腫 mesothelioma の名称は1931年、Klempere と Rabin によってはじめて用いられたが、この腫瘍がアスベストへの曝露と関連することが明らかとなったのは、1959年、Wagnerらの報告による。彼らは南アフリカのクロシドライト鉱山の従業員およびその家族、鉱山周辺の住民等に32例の胸膜中皮腫の集中的な発生を観察したのである。その後、アスベストを扱う造船所従業員らの調査が行われた結果、1972年、WHO (IARC) の会議において、アンソフィライト以外のすべての種類のアスベストが中皮腫をひき起こすが、その作用はクロシドライトが最も強く、次いでアモサイト、クリソタイルの順とされた。

日本では1973年、小泉らによって、約40年間アスベスト加工に従事した63歳、男性の胸膜中皮腫例が報告され、1974年には、姜らによってアスベスト製品の製造に従事した65歳、男性の胸膜中皮腫例が報告されているが、これらはいずれもアスベスト肺を合併していた。その後の中皮腫の発生数については、1956年から1996年までの日本病理解剖輯報の解析に

よると、胸膜1,213例、腹膜431例、心膜108例、精巣鞘膜6例、その他28例、計1,786例であり、年平均約45例が報告されていることになる。

4. その他の胸膜疾患

良性石綿胸水(胸膜炎)およびその後遺症としてのびまん性胸膜肥厚という概念と、疾患とは呼べないがアスベストへの曝露と密接な関連がある病態としてよく知られる胸膜プラーク(胸膜肥厚斑)がある。

アスベストを扱う労働者に胸膜プラークをしばしば認めることは1930年代から報告されていたが、1960年フィンランドのKiviluotoによってアンソフィライト鉱山の周辺住民にも胸膜プラークが認められ、胸膜プラークは職業性曝露のみならず、環境曝露によっても生じることが明らかとなった。アスベストによる胸水貯留あるいはびまん性の胸膜肥厚の存在は、日本においても1960年代から知られ、1970年代に胸膜プラークの存在とともに胸膜炎の所見としての報告がなされている。

V. アスベストによる健康被害の補償と救済

日本では1947年労働基準法とそれに基づく使用者の災害補償責任を果たすものとして、労働者災害補償保険法が制定された。それらによって、業務上の理由による負傷あるいは疾病に罹患した場合は、療養給付、休業給付、障害給付、遺族給付、疾病年金等の形で給付が行われる。対象となる業務上の疾病は、厚生労働省の省令で定められており、アスベストによるものとしてこの中に、塵肺の一種としての石綿(アスベスト)肺、アスベストに曝露される業務に基づく肺癌および中皮腫、良性石綿胸水およびびまん性胸膜肥厚があげられている³⁾。

肺癌については、一般的にはその大半は喫煙が主因と考えられていることから、業務上の疾病として認定される基準は厳しい。すなわち、胸部X線検査、胸部CT検査により胸膜プラークが認められること、または肺内にアスベスト小体またはアスベスト繊維が一定量以上認められた場合で、かつ、アスベスト曝露作業への従事期間が10年以上である場合とされている。

一方、中皮腫の場合は、肺癌と認定基準が異なり、胸部X線検査で塵肺法に定める第1型以上であるアスベスト肺の所見が得られていること、またはアスベ

表5 アスベスト曝露による肺癌とする基準(肺癌の発症リスクを2倍以上に高めるとみなされる条件)

<p>1. 胸部X線検査または胸部CT検査にて、胸膜プラークが認められ、かつ、胸部X線検査で、塵肺法第4条第1項に定める第1型以上と同様の肺線維化所見(いわゆる不整形陰影)があって、胸部CT検査においても肺線維化所見が認められること</p> <p>2. 肺内アスベスト(石綿)小体またはアスベスト(石綿)繊維の量が一定量以上*認められること</p> <p>*乾燥肺重量1gあたり5,000本以上のアスベスト小体もしくは200万本以上(5μm超, 2μm超の場合は500万本以上)のアスベスト繊維が認められること、または気管支肺胞洗浄液1mLあたり5本以上のアスベスト小体が認められること</p>

ト曝露作業への従事期間が1年以上ある場合で、胸膜、腹膜、心膜または精巣鞘膜の中皮腫であること、とされる。これは肺癌と異なり、ほとんどの中皮腫の発生原因はアスベストへの曝露と考えられることによる。

平成17年(2005年)6月、株式会社クボタが、旧神崎工場周辺の住民における中皮腫患者への見舞金支給を決定したことが大きく報道され(いわゆる“クボタショック”), 同年12月政府は、“労災補償を受けずに死亡した労働者、家族および周辺住民の被害への対応について、その救済のための新たな法的措置を講ずる”ことを表明した。これを受けて「石綿(アスベスト)による健康被害の救済に関する法律」がつくられ、この法律は平成18年2月の国会において異例の早さで成立し、同年3月27日に施行された。

この法律に基づく救済給付の対象となる疾病は、中皮腫と肺癌に限定された。その理由は、中皮腫と肺癌は多くの患者が短時間で死に至ることから、この制度が迅速な救済をはかることを目的としていることを考え、まず、両者のみを指定疾病とするのがよいと判断されたのである。第二次世界大戦後の日本ではアスベストが大量にかつ広範囲に使用されたことから、どこでどのような形でアスベストに曝露したかを一般生活環境の中で特定することは困難であるという認識のもとに、アスベスト曝露の証明は不必要とされた。給付の内容は、医療費、療養手当と亡なられた場合の葬祭料とからなる。

この救済制度においては、中皮腫の場合は、救済の対象となるために中皮腫の医学的判定が重視される。その内容は「医学的判定に係る留意事項」として公表されているが、この中には、胸部X線検査あるいは胸部CT検査による画像所見と、HE染色および免疫組織化学的染色による病理学的な中皮腫の確定診断の

必要性が述べられている。この制度の運用によって、これまでまれな腫瘍として多くの病理医が年に1例も経験することのなかった中皮腫が、一定の基準に基づいて精度高く診断されなければならない状況が生まれることとなった。

この制度では肺癌については、喫煙者、非喫煙者に関わらず肺癌の発症リスクを2倍以上に高める量のアスベスト曝露があったとみなされる場合に認定されることから、手術や剖検で得られた非腫瘍部末梢肺組織を用いてアスベスト小体あるいはアスベスト繊維の計測・定量が行われるようになった。その判定基準は表5に示すが、この定量作業では試料作製の技術や顕微鏡下でのアスベストの判定が難しいことから、一定の設備があり、訓練を受けたスタッフ(臨床検査技師等)のいる施設での計測・定量でなければ認められにくい状況にある。組織標本において末梢肺にアスベスト小体が多量に認められる場合は、ほぼ同様に評価されている。

VI. アスベストによる病変の病理学

1. 剖検例を用いたアスベストへの曝露状況の把握

我々の教室では、1985年に当時生まれであった中皮腫の剖検例を経験したことをきっかけとして、1984年から1987年にかけての連続的な剖検例194例を対象に、末梢肺でのアスベスト小体の定量を行った。当時は現在と異なり、Smith & Naylorの溶解法(次亜塩素酸ナトリウムによる)を用い、右肺S3領域の湿重量5gの末梢肺から定量したものであり、現在の乾燥重量であらわされる値とは数値が異なる。しかし、得られた結果は194例中192例(99%)においてアスベスト小体を認め(最低2本, 最高445,000本)、当時職業性の曝露レベルとされた501本以上のアスベスト小体を認めた例も27例(14.0%)存在するという、驚くべきものであった⁴⁾。この事実から我々は、一般生活環境下でのアスベストへの曝露が予想以上に広がっていることを指摘し、将来、我々の周辺で中皮腫の発生が増加するであろうことを予測した。また、同様の方法によって、1957~1984年の剖検例に比べ1984~1987年の剖検例における認められるアスベスト小体の量が多いこと、文献的に報告されている日本の他地域におけるアスベストへの曝露状況に比べ広島県下居住例での値が大きいことも明らかにした。この結果は、その

後広島県において特に瀬戸内沿岸地域で中皮腫が高率に発生したこととよく符合する。

2. 手術例を用いたアスベスト曝露による肺癌の検討

一般に手術や剖検で観察される肺癌がアスベスト曝露に起因するか否かを病理学的に決めることは難しい。しかし疫学的には、アスベスト曝露者での肺癌発生のリスクは高く、さらにリスクの上昇には喫煙との相乗効果があることが指摘されている。そこで、こうした“アスベスト関連肺癌”を病理学的に証明しうるか否かを、手術的に摘出された肺癌例84例を用いて検討した⁶⁾。これらを組織標本上でのアスベスト小体の出現頻度、溶解法によるアスベスト小体の定量および組織学的な呼吸細気管支周囲の線維化を指標として層別化を試みた結果、アスベスト小体の定量によって高度曝露者とみなされ、アスベスト肺の特徴とされる呼吸細気管支周囲の線維化とアスベスト小体が観察できる例をアスベストへの曝露と関連が深い肺癌と判断すると、84例中7例(8.3%)がこれに相当し、これに準ずる9例を加えた16例(19.0%)がアスベストへの曝露と関連する可能性があるとして推測した。しかし現在なお、アスベスト肺の定義は世界的にみても不確実であり、特発性肺線維症(IPF)との区別はできていない状況である。その上に“asbestosis-cancer theory”，すなわち肺線維化を基盤とする肺癌の発生という考え方ではなく、アスベスト繊維そのものが発癌要因であるとする“asbestos-cancer theory”を重視するならば、アスベストによる肺癌と判断する際に、これまでのように病理学的所見を材料とすることは不適切かもしれない。

3. 中皮腫の診断精度の向上

中皮腫の病理診断においては、従来は組織学的所見に加えて、ヒアルロン酸優位の酸性粘液多糖類の存在を腫瘍細胞の細胞膜面上あるいは細胞質内で証明することとともに、電子顕微鏡観察で中皮細胞の特徴である細くて長いmicrovilliを観察することが診断方法として勧められていた⁷⁾。しかし、酸性粘液多糖類の証明も電顕的観察も、分化度の高い中皮腫には有効な手段であるが、上皮型でも分化度が低くなった場合や肉腫型では証明することが難しく、一般論としては中皮腫の診断に必須とはいえない。特に電顕的観察については、検索の範囲が狭く、これにかかる労力や時間を考えると、いずれの医療機関においても実施できる検

査手段ではない。

前述したように今日、中皮腫の正確な診断は患者の補償や救済に直結することから、精度の高い診断が、病理医のいるすべての医療機関において可能になるようにしなければならない。近年、中皮腫の診断に有用なマーカーとなる抗体が数多く見出され、これらを用いた免疫組織化学的染色が中皮腫の診断には必須となってきた。いずれの抗体も単独で確定的な診断を得るに十分なものではないが、いくつかの抗体を組み合わせることでその結果を総合的に判断することで診断精度は飛躍的に向上する(表6)。ただし中皮腫の組織型が上皮型か肉腫型か、鑑別する疾患が肺癌なのか卵巣癌なのか、あるいは非腫瘍性の中皮細胞過形成なのか線維性胸膜炎なのか等を考え、鑑別に適した抗体を選ぶ必要がある。現在有用とされる免疫組織化学的染色を用いて過去の中皮腫例の診断を再検討してみると、画像診断や臨床所見も併せた検討の結果、その約15%程度においては中皮腫の診断は誤りとみなざるをえないことも判明した。この事実は、補償・救済の是非のみならず、今後の課題である適切な治療法の開発やその効果判定にも重大な影響を及ぼすことを考えると、中皮腫の病理診断の精度の向上にさらに取り組まなければならない。

4. アスベストによる発癌機序の解明

アスベストによる中皮腫、肺癌の発生は疫学的には証明されているといえるが、病理学的研究等に基づく、それらの発生・増殖・進展の機序の解明は遅れているといわざるをえない。これらを解明することが、新たな治療法、特に分子標的治療や新たな抗癌剤の開発に繋がり、さらに、早期発見や予防の方法にも有用な知見を与えることになるからである。

肺癌については、前述したように、肺線維化を基盤としてそのリモデリングの過程での発癌が考えられてきたが、現在までの知見として、アスベスト曝露によって生じたとされる肺癌は必ずしも末梢型の腺癌が多いわけではなく、発生部位も組織型も多様である。一方で、疫学的には喫煙との相乗効果が示されていることから、アスベスト繊維がタバコ中の発癌物質を吸着し、それらを肺内へ運搬することが発癌に関与している可能性が指摘される。事実、我々の検討でも、肺癌例に沈着するアスベスト繊維は細くて長い繊維の割合が大きく、種類としては鉄含量の多いクロシドライトよりアモサイトの方が多という結果を得ており¹²⁾、アスベスト繊維そのものによる発癌より、タバコその

表6 中皮腫の診断に有用な免疫組織化学的染色の抗体

	陽性マーカー	陰性マーカー	
上皮型中皮腫	calretinin D2-40 WT1 thrombomodulin	肺腺癌との鑑別	CEA TTF-1 NapsinA surfactant apoprotein
		卵巣癌との鑑別	BerEP4 MOC31 ER PgR
		反応性中皮細胞過形成の場合は右の所見を示すことが多い	desmin (+) EMA (+) p53 (-) glut-1 (-)
肉腫型中皮腫	cytokeratin (CAM5.2, AE1/AE3) D2-40 WT1 calretinin	肉腫との鑑別	smooth muscle actin desmin S-100蛋白 CD34 等
線維形成型中皮腫		線維性胸膜炎の場合は右の所見を示すことが多い	desmin (+)

他の経気道的な発癌物質への曝露を助長する作用が大きいことが示唆される。

一方中皮腫については、これまでの分子・遺伝子レベルの研究成果をみると、肺癌等で高頻度に点突然変異等の異常を示す *p53* 遺伝子、*ras* 遺伝子等の特異的変異は見出されていない。中皮腫細胞株での検討によると、*p16^{INK4a}* の欠失や *NF2* (マーリン) の高頻度の不活化が報告されている。アスベストによる発癌機序については、アスベストが鉄を含むという点から、フリーラジカルの産生とそれによる酸化 DNA 傷害の可能性が示唆される。しかし、経気道的に吸引されたアスベスト繊維の気道内での移動経路や、なぜ胸膜、腹膜等の中皮細胞が発癌の標的となるのか、またアスベスト曝露と中皮腫発生間に量-反応関係がないのはなぜか、あるいは曝露から中皮腫発生までの経過が30年から40年と長いのはなぜか等、解明できていない事象があまりにも多く、今後さらなる研究の発展が望まれる。

おわりに

我々がアスベストによる中皮腫や肺癌の研究をはじめてすでに20年以上が経つ。1980年代の日本では研究者による提示は、職業性悪性腫瘍の範囲を出ず、社

会を大きく動かすことはなかった。その後の研究も症例の少なさもあって大きな進展がなかったが、2005年のクボタショック以降、連日のマスコミ報道に後押しされる形で法律の制定、救済制度の発足があり、急に厚生労働省、文部科学省等からの関連する研究費も潤沢に提供されるようになった。現在では、早期発見のための検診の普及、血清診断のマーカーの開発、集学的治療法の確立、新規分子標的治療の開発等が競って行われているが、アスベストによる発癌の基礎的研究の不足が響いて、いまだ大きな進歩を見出せない状況にある。

このアスベストによる臓器傷害の研究を通して、我々病理学的研究に携わる者は、社会による一時的な評価に左右されることなく、常日頃疑問に思うところをテーマとして地道に研究を続けていくことの重要性を痛切に感じる。研究の成果は一朝一夕に得られるものではない。研究者としてのゆるぎない信念がいつの日か大きな社会的貢献に繋がることを信じて、研究を継続することこそが肝要であることを、しみじみと思わざるをえない。

文 献

- 1) 神山宣彦：石綿の基礎知識。石綿ばく露と石綿関連疾患，第I部，三信図書，東京，2008，17-54
- 2) 森永謙二：石綿関連疾患の医学的解説。石綿ばく露と石綿関連疾患，第II部，三信図書，東京，2008，91-136

- 3) 森永謙二：石綿関連疾患の補償と救済。石綿ばく露と石綿関連疾患，第三部，三信図書，東京，2008，231-273
- 4) 立山義朗，山本篤志，栗原寛治他：最近の194剖検例における肺内のアスベストに関する所見，広島医学 1989，42：878-886
- 5) 徳岡昭治，立山義朗，楠部滋他：剖検肺におけるアスベスト小体沈着状態の経年的推移に関する研究，広島医学 1989，42：1398-1405
- 6) 立山義朗，井内康輝，米原修治他：アスベスト曝露と肺癌との相関—手術摘出肺を用いた病理学的検討。病理と臨床 1993，11：967-973
- 7) 小武家俊博，米原修治，井内康輝他：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の鑑別。病理と臨床 1987，5：1290-1299
- 8) Kushitani, K., Takeshima, Y., Amatya, V.J. et al. : Immunohistochemical marker panels for distinguishing between epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Pathol Int* 2007, 57 : 190-199
- 9) Kushitani, K., Takeshima, Y., Amatya, V.J. et al. : Differential diagnosis of sarcomatoid mesothelioma from true sarcoma and sarcomatoid carcinoma using immunohistochemistry. *Pathol Int* 2008, 58 : 75-83
- 10) Takeshima, Y., Amatya, V.J., Kushitani, K. et al. : A useful antibody panel for differential diagnosis between peritoneal mesothelioma and ovarian serous carcinoma in Japanese cases. *Am J Clin Pathol* 2008, 130 : 771-779
- 11) Takeshima, Y., Amatya, V.J., Kushitani, K. et al. : D2-40 utility for the differential diagnosis between pleural sarcomatoid mesothelioma and lung sarcomatoid carcinoma. *Histopathology* (in press)
- 12) 岸槌健太郎：ヒト肺内に沈着するアスベスト繊維の分析—殊に肺癌，悪性中皮腫発生との相関。広大医誌 1995，43：279-296

Association of *CYP19A1* polymorphisms with risks for atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma in the lungs

Takashi Kohno, Ryutaro Kakinuma¹, Motoki Iwasaki², Taiki Yamaji², Hideo Kunitoh^{3,12}, Kenji Suzuki^{4,13}, Yoko Shimada, Kouya Shiraishi, Yoshio Kasuga⁵, Gerson Shigeaki Hamada⁶, Koh Furuta⁷, Koji Tsuta⁸, Hiromi Sakamoto⁹, Aya Kuchiba⁹, Seiichiro Yamamoto¹⁰, Yae Kanai¹¹, Shoichiro Tsugane² and Jun Yokota*

Biology Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104-0045, Japan, ¹Cancer Screening Technology and Development Division, National Cancer Center, Tokyo 104-0045, Japan, ²Epidemiology and Prevention Division, Research Center for Cancer Prevention and Screening, National Cancer Center, Tokyo 104-0045, Japan, ³Thoracic Oncology Division and ⁴Thoracic Surgery Division, National Cancer Center Hospital, Tokyo 104-0045, Japan, ⁵Department of Surgery, Nagano Matsushiro General Hospital, Nagano 381-1231, Japan, ⁶Nikkei Disease Prevention Center, São Paulo 04122-000, Brazil, ⁷Clinical Support Laboratory and ⁸Clinical Laboratory Division, National Cancer Center Hospital, Tokyo 104-0045, Japan, ⁹Genetics Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104-0045, Japan, ¹⁰Cancer Information Services and Surveillance Division, Center for Cancer Control and Information Services, National Cancer Center, Tokyo 104-0045, Japan and ¹¹Pathology Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104-0045, Japan

¹²Present address: Department of Respiratory Medicine, Mitsui Memorial Hospital, Kanda-Izumicho 1, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8643, Japan

¹³Present address: Department of General Thoracic Surgery, Juntendo University School of Medicine, Hongo 3-1-3, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8431, Japan

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 3 3547 5272; Fax: +81 3 3542 0807; Email: jyokota@ncc.go.jp

Estrogen has been indicated to play an etiological role in the development of lung adenocarcinoma (ADC), particularly bronchioloalveolar carcinoma (BAC), a type of ADC that develops from a benign adenomatous lesion, atypical adenomatous hyperplasia (AAH). Polymorphisms in the *CYP19A1* gene cause interindividual differences in estrogen levels. Here, 13 *CYP19A1* single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were examined for associations with lung AAH risk. AAH is detected as ground-glass opacity (GGO) by computed tomography (CT) examination, and this study consisted of 100 individuals diagnosed with GGO in their lungs among 3088 CT-based cancer screening examinees and 424 without. Minor allele carriers for the rs3764221 SNP showed an elevated risk for GGO [odds ratio (OR) = 1.72, $P = 0.017$]. Associations of this SNP with risks for lung AAH and BAC in the lungs were next examined using 359 ADC cases whose resected lung lobes were subjected to a histological examination for AAH accompaniment and the presence of BAC components and 330 controls without cancer. The ORs were also increased for lung ADC accompanied by AAH (OR = 1.74, $P = 0.029$) as well as lung ADC with BAC components (OR = 1.41, $P = 0.091$). The minor allele was associated with an increased circulating estradiol level ($P = 0.079$) in a population of 363 postmenopausal women without cancer. These results indicate that *CYP19A1* polymorphisms are involved in the risk for lung AAH and BAC in the lungs by causing differences in estrogen levels.

Introduction

Adenocarcinoma (ADC) is the commonest histological type of lung cancer, comprising ~40% of lung cancer cases, among European, North American and Asian countries and is increasing in incidence (1). Development of ADC is more weakly associated with smoking than those of two other major histological types of lung cancer, squamous cell carcinoma (SQC) and small-cell lung carcinoma. Thus, effective ways of preventing ADC are being searched for. Recent studies indicate that estrogen plays a role in the growth of lung ADC cells (2,3). Estrogen receptor (ER) β is expressed in bronchiolar epithelial cells (4). ER β expression was detected in >75% of lung ADC being more frequent than SQC and small-cell lung carcinoma, and the expression was preferentially observed in bronchioloalveolar carcinoma (BAC) (4), a differentiated type of lung ADC developed in the peripheral lung (5). ER β expression was also detected in atypical adenomatous hyperplasia (AAH) (4), a possible precancerous lesion for BAC (6). Growth of lung ADC cells with ER β expression was enhanced by estrogen, whereas it was suppressed by antagonizing estrogen (2,4). Therefore, estrogen is probably to play an essential role in the growth of lung ADC cells. In fact, an ER antagonist, fulvestrant, is being examined for its utility in the treatment of lung ADC (7).

Estrogen treatment significantly increased the development of adenoma and ADC in the lungs of ovariectomized female and male mice, therefore, estrogen is a risk factor for the development of lung ADC in mice (8). In a cohort study of 44 667 lifelong never-smoking women in Japan, women of either early age menarche or late age menopause showed significant increase in the risk for lung cancer, and involvement of the use of hormone replacement therapy in the risk for lung cancer of postmenopausal women was also suggested (9). Since ADC comprised >85% of lung cancer cases in this study, estrogen is a candidate risk factor for lung ADC also in the human. However, the involvement of endogenous and exogenous estrogen in the etiology of lung cancer of women has been inconsistent in other populations (10–18). In addition, the significance of estrogen on lung cancer risk of men has not been reported to our knowledge, although men have similar levels of circulating estrogen to postmenopausal women (19) and ER β expression was detected in lung ADC both of men and women (4,20). Therefore, estrogen is a possible target for prevention of lung ADC, and the significance of estrogen on its etiology should be further investigated.

Polymorphisms in genes involved in estrogen metabolism have been suggested to be associated with circulating estrogen levels (19). Particularly, polymorphisms in the *CYP19A1* gene, encoding an aromatase responsible for the final step in the biosynthesis of estrogens, estradiol (E2) and estrone (E1) (21), have been most intensively investigated (22). A tandem repeat polymorphism, (TTTA)_n, in intron 4 and a single-nucleotide polymorphism (SNP), rs10046, in the 3' untranslated region of exon 10 were reported to be associated with circulating estrogen levels in postmenopausal women (23,24). The tandem repeat polymorphism was also associated with circulating estrogen levels in men (25). Recently, by a large-scale association study, in which >3000 postmenopausal women of European descent were analyzed for 103 SNPs dispersed in the *CYP19A1* gene, SNPs located in the 3' region (i.e. exons 2–10) of the *CYP19A1* gene, such as rs10046 and four other SNPs (marked by blue lines in Figure 1), were defined as most strongly associated with serum E2 and E1 levels (26). Therefore, it was indicated that polymorphisms in the 3' region of the *CYP19A1* gene are responsible for interindividual differences in circulating estrogen levels. On the other hand, in a recent association study involving 1068 men from Sweden and 2568 men from the USA, SNPs in the 3' region of the *CYP19A1* gene, including rs10046, also showed associations with serum E2 and E1 levels in men (19).

Abbreviations: AAH, atypical adenomatous hyperplasia; ADC, adenocarcinoma; BAC, bronchioloalveolar carcinoma; CI, confidence interval; CT, computed tomography; ER, estrogen receptor; GGO, ground-glass opacity; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; LD, linkage disequilibrium; OR, odds ratio; SNP, single-nucleotide polymorphism; SQC, squamous cell carcinoma.

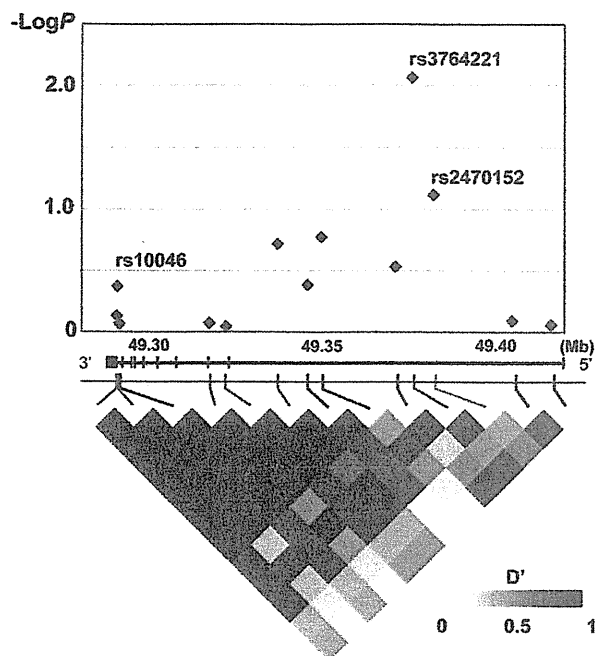


Fig. 1. Association of 13 SNPs in the *CYP19A1* gene with GGO risk. The top panel shows association results by trend test for SNPs and the location of SNPs. Black lozenges depict the results for risks for GGO. The bottom panel shows the LD structure in 424 control subjects. Boxes are shaded according to the pair-wise D' values.

However, the rs2470152 SNP located in intron 1 of the *CYP19A1* gene (marked by a green line in Figure 1) showed a stronger association than the SNPs in the 3' region (19). Therefore, it was indicated that polymorphisms in intron 1 of the *CYP19A1* gene also affect the estrogen levels. Since the rs2470152 SNP was not examined in the association study above in postmenopausal women (26), polymorphisms responsible for estrogen levels remain unclear. However, these studies strongly indicate that *CYP19A1* polymorphisms are a critical determinant of interindividual differences in the serum estrogen levels both in men and women.

We investigated here the significance of *CYP19A1* SNPs on risks for AAH and ADC by conducting four independent association studies to further obtain information on estrogen in the etiology of lung ADC. (i) AAH in the lungs is detected as a ground-glass opacity (GGO) by helical computed tomography (CT) examination (6,27–30). Therefore, the first study was to examine association of *CYP19A1* SNPs with GGO risk in the lungs among examinees admitted to a single cancer screening center. This study consisted of 100 cancer screening examinees diagnosed with GGOs by a thin-section (high resolution) CT examination among 3088 examinees and 424 examinees without GGO who were matched to the GGO cases in sex and age categories. (ii) AAH is an incidental histologic finding detected in 16–35% of lungs bearing primary lung ADC (6,31). Therefore, the second study was to examine association of *CYP19A1* SNPs with the risk for ADC accompanied with AAH(s) in the lungs among patients admitted to hospital. This study consisted of 81 cases diagnosed with lung ADC accompanied with AAH(s) among 359 lung ADC cases who received lobectomy followed by a histological examination of resected lobes serially sliced at intervals of 5 mm and 330 controls without cancer. (iii) AAH has been considered as a precancerous lesion that particularly develops to BAC, a type of ADC. Therefore, the third study was to examine association with risk for BAC. This study consisted of 151 cases diagnosed with lung ADC containing BAC components among 172 cases diagnosed with small-sized ADC, which include BAC as the majority, and 330 controls without cancer.

Table I. Study subjects

Set	Subject Category	All	Male (%)	Age (mean \pm SD)	Smoker (%)	
GGO	Case	100	45 (45)	57 \pm 9	37 (37)	
	Control	424	194 (46)	57 \pm 9	197 (46)	
Lung ADC	Case	359	193 (54)	59 \pm 9	187 (52)	
	AAH accompaniment					
		Present	81	39 (48)	60 \pm 7	42 (52)
		Absent	278	154 (55)	58 \pm 9	145 (52)
	BAC components					
		Present	151	70 (46)	59 \pm 8	66 (44)
	Absent	21	11 (52)	61 \pm 11	8 (38)	
	Control	330	186 (56)	62 \pm 11	154 (47)	

(iv) Finally, *CYP19A1* SNPs that were associated with GGO, AAH and BAC risks were examined for association with circulating estrogen levels of 363 postmenopausal women without cancer.

Subjects and methods

Subjects for association study on GGO risk

Study subjects were Japanese and consisted of examinees who underwent helical CT examination of the lungs from 2005–07 as a cancer screening program provided by the Research Center for Cancer Prevention and Screening of the National Cancer Center, Japan. Details of the screening program have been described elsewhere (32). All examinees gave written informed consent to allow their data and materials collected through the screening program to be used for the purpose of medical research. The study protocol was approved by the institutional review board of the National Cancer Center, Tokyo, Japan. Eligible examinees were individuals who underwent helical CT examination of the lungs. Details of the CT screening method were described previously (33). Examinees diagnosed with lung cancer or with a history of malignancies were considered ineligible. In a consecutive series of 3088 examinees aged from 40 to 79, 2822 fulfilled the necessary conditions above. One hundred and five examinees were defined as GGO cases because they had at least one GGO ≥ 5 mm in diameter by a screening CT examination followed by validation by a thin-section (high resolution) CT examination. Four hundred and forty examinees were chosen as control subjects from examinees without GGO by frequency matching to these GGO cases in sex and four age categories (ages 40–49, 50–59, 60–69 and 70–79 years). Genomic DNAs were available for 100 cases and 424 controls of these subjects for this study (the GGO set, Table I). One hundred and two examinees were chosen by a simple random sampling method from 512 examinees diagnosed as having at least one GGO < 5 mm in diameter by screening and/or high-resolution CT examinations and were examined as a population containing GGO cases as a subset.

Before undergoing the screening program, examinees completed a self-administered questionnaire concerning medical history and lifestyle characteristics, including smoking habit. The composition of the questionnaire has been detailed elsewhere (32,34). The questionnaire inquired about smoking habits by first determining smoking status (current, former and never) and then expressing lifetime exposure to cigarette smoking among current- and former-smokers by pack-years, with one pack-year defined as the smoking of 20 cigarettes every day for 1 year. Both current- and former-smokers were expressed as smokers in this study.

Subjects for association study on lung ADC risk

All 359 cases and 330 controls were Japanese and were admissions to the National Cancer Center Hospital from 1999 to 2004. Cases were admissions who were diagnosed with lung ADC by histological examinations according to World Health Organization classification (5) and received lobectomies at National Cancer Center Hospital. Controls were admissions who were not diagnosed with lung cancers and had no history of cancers (the lung ADC set, Table I). They were individuals who had been suspected to carry lung or gastric cancer in other hospitals and were not diagnosed with these cancers in National Cancer Center Hospital by CT, endoscope examinations, etc. All cases and controls, from whom informed consent as well as blood samples were obtained, were consecutively included in this study without any exclusion criteria. The participation rate was nearly 80%. From each individual, a 20 ml whole-blood sample was obtained.

All 359 ADC cases were subjected to pathological search for AAH in the resected lobes as described (35). Briefly, resected lungs were inflated with 10%

formalin through bronchial cut ends, and after fixation for a few days were serially sliced at intervals of 5 mm, and each cut surface was macroscopically examined. Sliced lungs containing a lesion(s) suspected for AAH were further examined microscopically. Even in cases without macroscopic lesions, at least one tissue block was prepared from all sliced lungs and subjected to microscopic examination. The criteria for AAH were as follows and as described previously (36,37): (i) a localized lesion with well-defined boundaries; (ii) an alveolar wall slightly thickened with mild infiltration of inflammatory cells but without scar formation; (iii) proliferating atypical epithelial cells abutting each other but not as compact as in ADC; (iv) atypical epithelial cells that were cuboidal to low columnar or peg-shaped in appearance, resembling either type II pneumocytes or non-ciliated bronchiolar epithelial cells (Clara cells) and (v) the presence of some atypical cells with two or more nuclei, most of which had relatively smaller and smoother contours than those of ADC. These criteria are compatible with those described in the reference of World Health Organization classification of lung tumors as a proposal (6). In the lobes, AAH lesions were detected in 81 cases (23%), whereas no AAH lesion was detected in the remaining 278 cases (77%) (Table I). The 359 ADC cases included 172 cases of small-sized ADC (i.e. <2 cm in maximum diameter), and the information on the presence of BAC components in the tumor was available (Table I). One hundred and fifty-one cases (87%) contained BAC components in the tumor, whereas the remaining 21 cases (13%) did not.

The study protocol was approved by the institutional review board of the National Cancer Center, Tokyo, Japan. Smoking histories of the case and control subjects were obtained via interview using a questionnaire. The definitions of never-smokers and smokers are described above.

Subjects for association with estrogen levels

Postmenopausal women who participated as controls in multicenter hospital-based case-control studies of breast cancer (38–40) were analyzed in the present study. This study was designed to determine lifestyle factors and genetic susceptibility to the risk for breast cancer and to compare potential risk factors among Japanese living in Nagano, Japan and Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians living in São Paulo, Brazil. Written informed consent was obtained from all these subjects. This study was approved by Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, National Committee of Ethics in Research), Brasília, Brazil and by the institutional review board of the National Cancer Center, Tokyo, Japan.

Estrogen (E2 and E1) levels in serum for Nagano and in plasma for São Paulo were determined by radioimmunoassay by Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories (Tokyo, Japan). Both the hormone levels and genomic DNA from peripheral blood cells of 185 Japanese, 44 Japanese Brazilians and 134 non-Japanese Brazilians were available for the present study.

SNP analysis

Genomic DNA was extracted from whole-blood cells using a Blood Maxi Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) according to the supplier's instructions. Thirteen SNPs located in the *CYP19A1* gene were selected. Five SNPs, rs4646, rs10046, rs2414096, rs727479 and rs1008805, were chosen since significant associations with serum estrogen levels of postmenopausal women were reported (26). rs2470152 was chosen since a significant association with serum estrogen levels of men was reported (19). The other seven SNPs were chosen based on the fact that their minor allele frequencies in the Japanese population were >0.1 in the GEMDBJ SNP database (<https://gemdbj.nibio.go.jp/dgdb/>). Genotyping of GGO set subjects for six SNPs, rs4646, rs10046, rs2414096, rs727479, rs1008805 and rs3764221 was performed by the Goldengate assay (Illumina, San Diego, CA) and that for the remaining seven SNPs was performed by the Taqman assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the supplier's instructions. Genotyping of lung ADC set subjects for the rs3764221 SNP and genotyping of the subjects for association of the rs3764221 and rs10046 SNPs with serum estrogen levels was performed by the Taqman assay.

Statistical analyses

A Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) test was performed using the SNPalyze version 3 software (DYNACOM, Chiba, Japan), and SNPs with a *P* value for deviation >0.05 were considered to be in HWE. Calculation of the *D'* and *R*² values between SNPs was performed by the expectation-maximization algorithm using the SNPalyze version 3 software.

Associations of 13 SNPs in the *CYP19A1* gene with GGO risk were examined by a trend test adjusted for gender, age (<49, 50–59, 60–69 and ≥70) and smoking (never-smoker versus smoker). Associations of the rs3764221 SNP with GGO and ADC risks were digitized as odds ratios (ORs) adjusted for gender, age (<49, 50–59, 60–69 and 70+) and smoking (never-smoker versus smoker) with 95% confidence intervals (CIs) by unconditional logistic regression analysis (41). ORs for ADC risk according to the accompaniment of AAH

were assessed by the multinomial logistic regression model. These analyses were performed using the JMP version 6.0 software (SAS Institute, Cary, NC). Linear trends for estrogen levels according to increases in the number of minor alleles for the rs3764221 and rs10046 SNPs were tested in a multivariate regression model using SAS software version 9.1 (SAS Institute). Variables used for adjustment in each test are described in the footnotes to Tables II and III. A level of *P* < 0.05 in a test was judged as significant and that of 0.05 ≤ *P* < 0.1 was judged as marginal.

Results

Association of a *CYP19A1* SNP with lung GGO risk

Thirteen SNPs dispersed in the *CYP19A1* gene region were examined for association with GGO risk in a case-control study that consisted of 100 examinees with GGO and 424 without (GGO set in Table I). All 13 SNPs were in HWE both in cases and controls. Significant association with GGO risk was observed for an SNP, rs3764221, located in intron 1 of the *CYP19A1* gene (*P* by trend test = 0.0085) (Figure 1; supplementary Table I is available at *Carcinogenesis* Online).

Five SNPs associated with estrogen levels in postmenopausal women of European descent (indicated by blue lines in Figure 1) were in strong linkage disequilibrium (LD) with each other (*D'* = 0.85–1.0) as reported (26). These five SNPs also showed LD with rs3764221 (*D'* = 0.75–0.92), however, none of them showed significant associations with GGO risk (supplementary Table I is available at *Carcinogenesis* Online). The rs2470152 SNP associated with estrogen levels in men from Sweden and the USA (indicated by a green line in Figure 1) were in a complete LD (*D'* = 1.0) with rs3764221, and this SNP showed a marginal association (*P* = 0.076) with GGO risk (supplementary Table I is available at *Carcinogenesis* Online).

Heterozygotes and homozygotes for the minor allele of the rs3764221 SNP showed increased ORs for the GGO risk (Table II), and the increase in the homozygotes was statistically significant. The OR in the dominant mode (C/T + T/T versus C/C) also

Table II. Association of *CYP19A1* (rs3764221) genotypes with lung ADC risk

Category	Genotype	Control, <i>N</i> (%)	Case, <i>N</i> (%)	OR ^a (95% CI)	<i>P</i>
GGO	C/C	262 (62)	47 (47)	Reference	
	C/T	138 (33)	42 (42)	1.59 (0.99–2.56)	0.057
	T/T	24 (6)	11 (11)	2.47 (1.09–5.28)	0.030
	Dominant			1.72 (1.10–2.70)	0.017
	Recessive			2.03 (0.92–4.23)	0.077
ADC	C/C	187 (57)	184 (51)	Reference	
	C/T	123 (37)	145 (40)	1.21 (0.88–1.67)	0.24
	T/T	20 (6)	30 (8)	1.47 (0.80–2.77)	0.22
	Dominant			1.25 (0.92–1.70)	0.16
	Recessive			1.37 (0.76–2.53)	0.30
AAH accompaniment ^b	Present				
	C/C		35 (43)	Reference	
	C/T		38 (47)	1.69 (1.01–2.85)	0.047
	T/T		8 (10)	2.05 (0.79–4.93)	0.12
	Dominant			1.74 (1.06–2.86)	0.029
Recessive			1.66 (0.66–3.82)	0.26	
Absent	C/C		149 (54)	Reference	
C/T		107 (38)	1.10 (0.78–1.55)	0.60	
T/T		22 (8)	1.33 (0.68–2.60)	0.40	
Dominant			1.13 (0.81–1.57)	0.46	
Recessive			1.29 (0.68–2.47)	0.44	
BAC components	Present				
	C/C		72 (48)	Reference	
	C/T		64 (42)	1.34 (0.88–2.03)	0.17
	T/T		15 (10)	1.87 (0.88–3.90)	0.10
	Dominant			1.41 (0.95–2.09)	0.091
Recessive			1.65 (0.80–3.35)	0.17	

^aAdjusted for age, sex and smoking.

^bORs according to the accompaniment of AAH were assessed by the multinomial logistic regression model.

showed a statistically significant increase [OR = 1.72 (1.10–2.70) $P = 0.017$] (Table II; supplementary Figure 1 is available at *Carcinogenesis* Online). The OR in the dominant mode was also calculated against 102 examinees with GGO < 5 mm in diameter by screening and/or high-resolution CT examinations. An increase in OR in the dominant mode was also observed [OR = 1.42 (0.90–2.23)]; however, the increase did not reach a statistical significance ($P = 0.13$).

Association of a CYP19 SNP with lung ADC risk

Association of the rs3764221 SNP with lung ADC risk was examined in a case-control study consisting of 359 lung ADC cases and 330 controls (Lung ADC set in Table I). This SNP was in HWE both in cases and controls. ORs of heterozygotes and homozygotes for the minor allele and those in both the dominant and recessive modes for the lung ADC risk were increased; however, the increases were not statistically significant (Table II; supplementary Figure 1 is available at *Carcinogenesis* Online).

All 359 lung ADC cases were informative for the presence of AAH in the lung lobe with primary ADC (Table I). Eighty-one (23%) cases had AAHs with primary ADC, consistent with previous reports that AAHs were detected in 16–35% of lungs with primary ADC (6,31). The ORs of heterozygotes and homozygotes for the minor allele and those in the dominant and recessive modes were higher for the risk for ADC with AAH than for ADC without AAH, although their 95% CIs overlapped (Table II; supplementary Figure 1 is available at *Carcinogenesis* Online). ORs of heterozygotes and in the dominant mode for the risk for ADC with AAH were statistically significant.

Among the 359 cases, 172 cases had small-sized ADC (i.e. <2cm in maximum diameter) and were informative whether their tumors contained BAC components or not (Table I). Tumors of 151 cases were diagnosed as containing BAC components. The ORs of heterozygotes and homozygotes for the minor allele and those in the dominant and recessive modes were higher for ADC with BAC components than for overall ADC, although their 95% CIs overlapped (Table II; supplementary Figure 1 is available at *Carcinogenesis* Online). ORs in the dominant mode for the risk for ADC with BAC components were marginally significant. The number of ADC cases without BAC components was small; therefore, ORs for ADC without BAC components were not calculated.

Association of the rs3764221 SNP with estrogen level

Association of the rs3764221 SNP with GGO and ADC risks prompted us to examine whether this SNP is associated with estrogen levels or not. For this purpose, we examined the allele distribution of this SNP in 363 postmenopausal women, consisting of 185 Japanese, 44

Japanese Brazilians and 134 non-Japanese Brazilians, whose information on circulating E2 and E1 levels was available (38–40). We also examined the allele distribution of the rs10046 SNP because the E2 and E1 levels in heterozygotes and homozygotes for the minor allele had been shown previously to be significantly higher than those in major allele homozygotes (Caucasian in Table III) (26). Heterozygotes and homozygotes for the minor allele for the rs3764221 SNP in all subjects showed higher E2 and E1 levels as for rs10046 in the previous report (Table III) (26). The increase in the E2 level according to increases in the number of minor alleles in all subjects was marginally significant ($P = 0.078$), whereas that in the E1 level was not significant. Heterozygotes and homozygotes for Japanese subjects also showed higher E2 and E1 levels, although the differences were not statistically significant. On the other hand, heterozygotes and homozygotes for the minor allele for the rs10046 SNP showed only slightly increased levels of E1 and E2 in this study population.

Discussion

In this study, the rs3764221 SNP in the *CYP19A1* gene was shown to be associated with risk for GGO (Table II). AAHs are usually detected as GGOs by CT examinations and a subset of these AAHs progress to ADC, including BAC (28,30,42). Therefore, this SNP was suggested to be involved in the risk for the development of AAH and also of lung ADC, particularly of BAC in the lungs. This suggestion was supported by the following two findings. First, the rs3764221 SNP showed a significant association with the risk for ADC accompanied by AAH but not for ADC not accompanied by AAH (Table II). Second, this SNP showed a marginal association with the risk for ADC containing BAC components, and the association in this subset of ADC was more evident than that in overall lung ADC (Table II). This result is consistent with the concept that AAH is a precancerous lesion of ADC, preferentially of BAC (5,6,43). The frequency of having AAH in the lungs has been shown to be considerably higher in ADC patients than in individuals without cancer (6,31,36,37,44). Therefore, the susceptibility to the development of AAH is probably to be associated with that of ADC in the lungs. Thus, the rs3764221 SNP might confer lung ADC risk by affecting the susceptibility to the development of AAH that progress to ADC, preferentially BAC.

In the present study, the minor allele for the rs3764221 SNP was marginally associated with a higher estrogen level in postmenopausal women. Notably, rs3764221 was in complete LD ($D' = 1$) with rs2470152, whose association with serum estrogen levels in men had been reported (19). Accordingly, the rs2470152 SNP also showed a marginally significant association with risk for GGO (Figure 1).

Table III. Association of CYP19A1 SNPs with circulating estrogen levels SNP

	Population	Genotype	No. of subjects	Increase in estradiol (E2)	P for trend	Increase in estrone (E1)	P for trend
rs3764221	All	CC	220	Ref	0.078 ^a	Ref	0.26 ^a
		CT	120	+4.8%		+1.0%	
		TT	17	+16.0%		+13.4%	
	Japanese	CC	86	Ref	0.11 ^a	Ref	0.30 ^a
		CT	86	+6.6%		+1.2%	
		TT	12	+17.1%		+17.0%	
rs10046	All	GG	116	Ref	0.92 ^a	Ref	0.36 ^a
		GA	193	+0.04%		+1.1%	
		AA	54	+0.69%		+5.3%	
	Japanese	GG	61	Ref	0.83 ^a	Ref	0.43 ^a
		GA	93	+0.8%		+2.5%	
		AA	31	-2.3%		+6.1%	
	Caucasian ^b	GG	835	Ref	2.9×10^{-9}	Ref	1.1×10^{-8}
		GA	1691	+5.7%		+5.4%	
		AA	799	+12.8%		+11.7%	

^aAdjusted for age, ethnic group, age at menarche, age at menopause, number of births, age at first birth, height, body mass index, smoking, alcohol drinking and physical activity in the past 5 years.

^bData from Haimann *et al.* (26).

Interestingly, intron 1 of the *CYP19A1* gene contains 10 tissue specific promoters, which have been indicated to play regulatory roles in *CYP19A1* gene expression differentially among diverse tissues (21,22). rs2470152 and rs3764221 SNPs are located, respectively, in and 3' to the I.4 promoter, which enables *CYP19A1* expression in skin, testis and adipose tissues (21,45,46). Therefore, genetic variations in the region spanning these two SNPs might be responsible for differential *CYP19A1* expression among individuals, and this might cause interindividual differences in estrogen levels. In contrast to previous reports (26), the rs10046 SNP did not show association with estrogen levels in the present study. Such an inconsistency might have come from ethnic differences of subjects examined. Since the minor allele frequency for the rs3764221 SNP is considerably lower in Europeans (<0.05) than in Asians (>0.2) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), this SNP was not examined in previous association studies of Europeans (19,26). The rs3764221 SNP is in LD with SNPs located in the 3' region of the *CYP19A1* gene, including rs10046, therefore, it is also possible that SNP(s) critical for estrogen levels is located in this 3' region.

Interaction of *CYP19A1* genotypes with smoking and gender was also investigated. The ORs for the risks for GGO and lung ADC were consistently higher in never-smokers than in smokers, although their 95% CIs overlapped (supplementary Table II is available at *Carcinogenesis* Online). This result went along with the result of meta-analysis showing that hormone replacement therapy particularly increases lung ADC risk of never-smokers (10). This stronger association of *CYP19A1* genotypes with GGO and lung ADC risks in never-smokers than smokers might be due to the anti-estrogenic effect of smoking (47,48). Smoking has been indicated to be associated with low levels of estrogen and with decreased risks for estrogen-dependent cancers, such as endometrial cancers (49–51). On the other hand, risks for GGO and lung ADC were not consistently associated with gender (supplementary Table III is available at *Carcinogenesis* Online); therefore, the interaction of *CYP19A1* genotypes with gender remains unclear.

The present study proposes that *CYP19A1* polymorphisms are involved in the risk for AAH and BAC in the lungs by causing differences in estrogen levels. Association studies of a single population among *CYP19A1* genotypes, estrogen levels and the risk for AAH and BAC, by taking gender and smoking into account, will further authenticate the present results. The contribution of *CYP19A1* polymorphisms to cancer risks has been investigated in estrogen-dependent cancers, such as ADCs of breast and endometrium. The contribution has been indicated to be possible but remains inconclusive due to inconsistent results among studies (22,26,52). Studies of *CYP19A1* polymorphisms on risks for ADCs of a variety of organs, including the lungs, breast and endometrium, will further elucidate the significance of these polymorphisms and estrogen levels on cancer risks.

Supplementary material

Supplementary Figure 1 and Tables I–III can be found at <http://carcin.oxfordjournals.org/>

Funding

Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare for the Third-term Comprehensive 10 year Strategy for Cancer Control, Cancer Research (19S-1), Research on Risk of Chemical Substances; Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology for Scientific Research on Priority Areas (20014031 and 17015049); Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation.

Acknowledgements

We thank Chisato Hamashima, Shizuka Sasazuki, Norie Kurahashi, Masahiro Kaneko, Masahiko Kusumoto, Takaaki Tsuchida and Hiroshi Saito for their

help in data and sample collection for the GGO set; Daizo Saito and Sachiyo Mimaki for their help in data and sample collection for the lung ADC set. K.S. is an awardee of a Research Resident Fellowship from the Foundation for Promotion of Cancer Research in Japan. We are also grateful to the participants in the São Paulo-Japan Breast Cancer Study and the Nagano Breast Cancer Study.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Travis, W.D. *et al.* (2004) Pathology and genetics, tumours of lung, pleura, thymus and heart. In Travis, W.D., Brambilla, E., Muller-Hermelink, K. and Harris, C.C. (eds) *World Health Organization Classification of Tumors*. IARC Press, Lyon, France, pp. 1–344.
- Marquez-Garban, D.C. *et al.* (2009) Targeting aromatase and estrogen signaling in human non-small cell lung cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1155**, 194–205.
- Siegfried, J.M. *et al.* (2009) Estrogen receptor signaling in lung cancer. *Semin. Oncol.*, **36**, 524–531.
- Omoto, Y. *et al.* (2001) Expression, function, and clinical implications of the estrogen receptor beta in human lung cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 340–347.
- Colvy, T. *et al.* (2004) Adenocarcinoma. In Travis, W.D., Brambilla, E., Muller-Hermelink, H.K. and Harris, C.C. (eds) *World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics, Tumours of Lung, Pleura, Thymus and Heart*. pp. 35–44.
- Kerr, K.M. *et al.* (2004) Atypical adenomatous hyperplasia. In Travis, W.D., Brambilla, E., Muller-Hermelink, H.K. and Harris, C.C. (eds) *World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics, Tumours of Lung, Pleura, Thymus and Heart*. pp. 73–75.
- Traynor, A.M. *et al.* (2009) Pilot study of gefitinib and fulvestrant in the treatment of post-menopausal women with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, **64**, 51–59.
- Hammoud, Z. *et al.* (2008) Estrogen promotes tumor progression in a genetically defined mouse model of lung adenocarcinoma. *Endocr. Relat. Cancer*, **15**, 475–483.
- Liu, Y. *et al.* (2005) Reproductive factors, hormone use and the risk of lung cancer among middle-aged never-smoking Japanese women: a large-scale population-based cohort study. *Int. J. Cancer*, **117**, 662–666.
- Greiser, C.M. *et al.* (2010) Menopausal hormone therapy and risk of lung cancer-Systematic review and meta-analysis. *Maturitas*, **65**, 198–204.
- Slatore, C.G. *et al.* (2010) Lung cancer and hormone replacement therapy: association in the vitamins and lifestyle study. *J. Clin. Oncol.*, **28**, 1540–1546.
- Chlebowski, R.T. *et al.* (2009) Oestrogen plus progestin and lung cancer in postmenopausal women (Women's Health Initiative trial): a post-hoc analysis of a randomised controlled trial. *Lancet*, **374**, 1243–1251.
- Wu, A.H. *et al.* (1988) Personal and family history of lung disease as risk factors for adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res.*, **48**, 7279–7284.
- Wu-Williams, A.H. *et al.* (1990) Lung cancer among women in north-east China. *Br. J. Cancer*, **62**, 982–987.
- Taioli, E. *et al.* (1994) Re: endocrine factors and adenocarcinoma of the lung in women. *J. Natl Cancer Inst.*, **86**, 869–870.
- Seow, A. *et al.* (2002) Diet, reproductive factors and lung cancer risk among Chinese women in Singapore: evidence for a protective effect of soy in nonsmokers. *Int. J. Cancer*, **97**, 365–371.
- Brenner, A.V. *et al.* (2003) Menstrual and reproductive factors and risk of lung cancer among Chinese women, Eastern Gansu Province, 1994–1998. *J. Epidemiol.*, **13**, 22–28.
- Kreuzer, M. *et al.* (2003) Hormonal factors and risk of lung cancer among women? *Int. J. Epidemiol.*, **32**, 263–271.
- Eriksson, A.L. *et al.* (2009) Genetic variations in sex steroid-related genes as predictors of serum estrogen levels in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**, 1033–1041.
- Wu, C.T. *et al.* (2005) The significance of estrogen receptor beta in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **130**, 979–986.
- Chen, D. *et al.* (2009) Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. *Cancer Lett.*, **273**, 15–27.
- Ma, C.X. *et al.* (2005) Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res.*, **65**, 11071–11082.
- Two Roger, S.S. *et al.* (2004) Association of CYP17, CYP19, CYP1B1, and COMT polymorphisms with serum and urinary sex hormone

- concentrations in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **13**, 94–101.
24. Bugano, D.D. *et al.* (2008) Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, **29**, 313–320.
 25. Gennari, L. *et al.* (2004) A polymorphic CYP19 TTTA repeat influences aromatase activity and estrogen levels in elderly men: effects on bone metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 2803–2810.
 26. Haiman, C.A. *et al.* (2007) Genetic variation at the CYP19A1 locus predicts circulating estrogen levels but not breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Res.*, **67**, 1893–1897.
 27. Nakata, M. *et al.* (2003) Prospective study of thoracoscopic limited resection for ground-glass opacity selected by computed tomography. *Ann. Thorac. Surg.*, **75**, 1601–1605; discussion, 1605–1606.
 28. Kakinuma, R. *et al.* (2004) Progression of focal pure ground-glass opacity detected by low-dose helical computed tomography screening for lung cancer. *J. Comput. Assist. Tomogr.*, **28**, 17–23.
 29. Park, C.M. *et al.* (2006) CT findings of atypical adenomatous hyperplasia in the lung. *Korean J. Radiol.*, **7**, 80–86.
 30. Godoy, M.C. *et al.* (2009) Subsolid pulmonary nodules and the spectrum of peripheral adenocarcinomas of the lung: recommended interim guidelines for assessment and management. *Radiology*, **253**, 606–622.
 31. Koga, T. *et al.* (2002) Lung adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma component is frequently associated with foci of high-grade atypical adenomatous hyperplasia. *Am. J. Clin. Pathol.*, **117**, 464–470.
 32. Hamashima, C. *et al.* (2006) Comparison of observed and expected numbers of detected cancers in the research center for cancer prevention and screening program. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **36**, 301–308.
 33. Gomi, S. *et al.* (2008) Low-dose CT screening for lung cancer with automatic exposure control: phantom study. *Radiol. Phys. Technol.*, **1**, 244–250.
 34. Otani, T. *et al.* (2006) Serum triglycerides and colorectal adenoma in a case-control study among cancer screening examinees (Japan). *Cancer Causes Control*, **17**, 1245–1252.
 35. Kohno, T. *et al.* (2008) Association of KRAS polymorphisms with risk for lung adenocarcinoma accompanied by atypical adenomatous hyperplasias. *Carcinogenesis*, **29**, 957–963.
 36. Yokose, T. *et al.* (2001) Atypical adenomatous hyperplasia of the lung in autopsy cases. *Lung Cancer*, **33**, 155–161.
 37. Yokose, T. *et al.* (2000) High prevalence of atypical adenomatous hyperplasia of the lung in autopsy specimens from elderly patients with malignant neoplasms. *Lung Cancer*, **29**, 125–130.
 38. Iwasaki, M. *et al.* (2009) Isoflavone, polymorphisms in estrogen receptor genes and breast cancer risk in case-control studies in Japanese, Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Sci.*, **100**, 927–933.
 39. Iwasaki, M. *et al.* (2009) Dietary isoflavone intake and breast cancer risk in case-control studies in Japanese, Japanese Brazilians, and non-Japanese Brazilians. *Breast Cancer Res. Treat.*, **116**, 401–411.
 40. Shimada, N. *et al.* (2009) Genetic polymorphisms in estrogen metabolism and breast cancer risk in case-control studies in Japanese, Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *J. Hum. Genet.*, **54**, 209–215.
 41. Breslow, N.E. *et al.* (1980) Statistical methods in cancer research. Volume I—The analysis of case-control studies. *IARC Sci. Publ.*, **32**, 5–338.
 42. Takashima, S. *et al.* (2003) CT findings and progression of small peripheral lung neoplasms having a replacement growth pattern. *AJR Am. J. Roentgenol.*, **180**, 817–826.
 43. Travis, W.D. *et al.* (2006) Bronchioloalveolar carcinoma and lung adenocarcinoma: the clinical importance and research relevance of the 2004 World Health Organization pathologic criteria. *J. Thorac. Oncol.*, **1**, S13–S19.
 44. Sterner, D.J. *et al.* (1997) Prevalence of pulmonary atypical alveolar cell hyperplasia in an autopsy population: a study of 100 cases. *Mod. Pathol.*, **10**, 469–473.
 45. Carreau, S. *et al.* (2004) The promoter(s) of the aromatase gene in male testicular cells. *Reprod. Biol.*, **4**, 23–34.
 46. Lambard, S. *et al.* (2005) Aromatase in testis: expression and role in male reproduction. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **95**, 63–69.
 47. Baron, J.A. (1996) Beneficial effects of nicotine and cigarette smoking: the real, the possible and the spurious. *Br. Med. Bull.*, **52**, 58–73.
 48. Tanko, L.B. *et al.* (2004) An update on the antiestrogenic effect of smoking: a literature review with implications for researchers and practitioners. *Menopause*, **11**, 104–109.
 49. Parazzini, F. *et al.* (1995) Smoking and risk of endometrial cancer: results from an Italian case-control study. *Gynecol. Oncol.*, **56**, 195–199.
 50. Bremnes, Y. *et al.* (2007) Different measures of smoking exposure and mammographic density in postmenopausal Norwegian women: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res.*, **9**, R73.
 51. Zhou, B. *et al.* (2008) Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Am. J. Med.*, **121**, 501–508 e503.
 52. Low, Y.L. *et al.* (2010) Multi-variant pathway association analysis reveals the importance of genetic determinants of estrogen metabolism in breast and endometrial cancer susceptibility. *PLoS Genet.*, **6**, e1001012.

Received June 1, 2010; revised July 6, 2010; accepted July 8, 2010

総説

肺がん CT 検診の有効性評価のための無作為化比較試験計画

佐川 元保^{*1,*2} 祖父江 友孝^{*1} 江口 研二^{*1} 中山 富雄^{*1} 西井 研治^{*1} 佐藤 雅美^{*1}
 塚田 裕子^{*1} 鈴木 隆一郎^{*1} 佐藤 俊哉^{*1} 林 朝茂^{*1} 小林 健^{*1} 斎藤 博^{*1}
 濱島 ちさと^{*1} 柿沼 龍太郎^{*1} 三澤 潤^{*1} 佐久間 勉^{*2}

要旨

肺癌死亡減少の重要な手段の一つとして低線量 CT 検診があるが、政策として採りあげるには EBM に基づいた有効性の評価が必須である。欧米で遂行中の RCT の結果が「無効」となった場合には、CT 検診は葬り去られる可能性がある。それを覆すには本邦における RCT で結果を出すしかなく、厚生労働省垣添班で RCT 計画を策定した。

- ・40%の肺がん死亡減少効果を見込み、50-64歳の住民50000人を対象
- ・年齢・施設・喫煙状況で層別化
- ・研究群では低線量CTと喀痰細胞診を10年間行い（喫煙者では低線量CT検診を10回、非喫煙者では低線量CT検診は1,3,7年目の3回で残りは現行検診）、対照群では現行検診を10年間行う

参加者の検診は無料とすると、研究費用の概算は15年間に38億5400万円で、年間2億5700万円にのぼった。膨大ではあるが、乳がん超音波検診のRCTでもかなりの額が投入されているので、不可能な額ではない。

キーワード： 低線量CT、肺がん検診、無作為化比較試験、有効性評価

J Thorac CT Screen 2009;16:102-107

はじめに

胸部 CT による肺がん検診は、高い肺癌発見率（現行検診の5-20倍）、高い早期癌の割合（80%以上）、高い発見例の5年生存率（80%以上）が報告されており¹⁻⁷⁾、いずれも驚異的なレベルと言って良い状況である。しかしながら、検診における発見率・早期癌割合・生存率は、いずれもバイアスの関与が大きいとされており、それだけでは効果の有無は不明と考えるのが通説である。

Overdiagnosis bias

バイアスの中でも問題視されているものの一つに Overdiagnosis bias がある。これは「ゆっくり大きくなり、他疾患で死亡するため、死亡に関係しない」肺癌を発見してしまうことであるが、CT 検診にはこれがある程度の大きさで存在しているだろうと想定されている。たとえば、CT 所見と剖検所見を比較した報告⁸⁾によれば、1047例の剖検例中、死亡前2ヶ月以内に胸部 CT を受検した例は187例あり、そのうち、139例は陰影がなかったが48例には陰影が存在した。対象としてCT 検診でのみ見つかるような病変を想定しているため、16mm以上の陰影や10個以上存在するような陰影を除外すると、28例において15mm以下の陰影が1ないし9個、死亡の2か月以内の胸部 CT 写真上で指摘できることが判明した。その28例中19例が剖検時に初めてチェックされ、そのうち原発性肺癌が2例

*1 厚生労働省がん研究助成金垣添班 胸部 CT 検診小班 *2 金沢医科大学 呼吸器外科
 (〒920-0293 石川県河北郡内灘町大学1-1)
 e-mail: sagawam@kanazawa-med.ac.jp

存在した。187例中2例に「死亡の原因に関連しない、CTをしていなければ気付かなかったはずの原発性肺癌」が存在したことになる⁸⁾。これは10万対比で1070にあたり、このことからでも、CT検診におけるOverdiagnosis biasは無視できない影響があると想定せざるを得ない。

有効性評価に基づく肺がん検診ガイドライン

厚生労働省の研究班である祖父江班(現:濱島班)では、有効性評価に基づくがん検診ガイドラインを、毎年臓器を変えながら作成している¹⁾。前述したようなバイアスの問題があるため、がん検診の有効性評価は、検診受診により受診者の死亡率が低下するかどうかによって評価するのが国際的な標準であり、祖父江班でもそのように行っている。それによれば、低線量CTによる肺がん検診に関しては、これまでのところ発見率と発見病期や組織型の報告が多く、生存率がわずかに報告されているのみであり、肺がん死亡について言及している論文は質の低いコホート研究が1つだけだが、その論文では肺がん死亡減少効果は認められていない⁹⁾。その結果、肺がん死亡減少効果の有無は不明であり、対策型検診としては勧められない、とされている¹⁾。

効果評価に関する今後の動き

前述した祖父江班の報告は、すなわち肺がん死亡を評価するような研究がなされる必要がある、ということでもある。今後は、まず、短期的に研究をまとめられるStage Shiftなどの傍証に関して論文化が必要と考えられる。ただし、Stage Shiftとは進行癌の割合が減ることではなく(これのみではOverdiagnosis biasだけでも観察されてしまう)、受診が繰り返されるにつれて受診者あたりの進行癌の「数」が減少してくることが必要なのだが、その点に関する誤解は現在においても、残念ながら専門家の間でも存在している。

死亡率減少を直接評価する研究としては、国内では厚生労働省中山班のコホート研究がおこなわれており、海外ではNLST, NELSON

などのRCTが進行中である¹⁰⁻¹²⁾。中山班の結果も期待されるが、RCTで効果が否定されると、CT検診はつづれかねない状況が予想され、しかも、NLSTは効果に関して楽観視はできない状況と推定されている。

厚生労働省垣添班の研究

厚生労働省垣添班では、効果が確立していないがん検診の方法の効果を評価するための道筋を明らかにすることを目的の一つとしており、胸部CT、PSA、胃内視鏡によるがん検診に関する効果評価研究の計画立案を行っている。

胸部CTに関しては、海外でのRCTで否定されても対抗できるような研究が必要であるため、2008年度には日本におけるRCT研究計画を作成した。RCTは、膨大な期間・参加者・研究費が必要であり、以前は日本では実現は不可能と考える向きもあったが、最近乳がんエコーのRCTが12万人規模で進行中であるなど環境は変化しており、実現できる可能性はある。

どのようなRCTを組めば良いか?

実際にRCT計画案を作成するに当たっては、種々の要素を確定していく必要があった。以下にそれを列記する。

1. 研究群は胸部CT、では対照群は?

「無検査」または「胸部X線」が考えられるが、日本ではX線(+細胞診)を推奨しており、対照群を無検査にすることは不可能であることから、対照群は「胸部X線」とする。

2. 喀痰細胞診は?

日本では推奨しているもので、外すことは難しい。そのため、両群の喫煙者に併用する必要がある。

3. 検診は何年行うべきか?

Lung Screening Studyなどの結果からは、3年程度の短期の検診では有意差は得られなさそうであり、ELCAPのデータでも5年ぐらい経ってから死亡率が開いてくる可能性がある

ると学会などで報告されている。そのため、最低でも5年は必要で、できれば8年ないし10年あったほうが望ましいと考えられた。

4. 対象は喫煙者 or 非喫煙者

肺癌死亡は喫煙者に多いので死亡を減らすためには喫煙者にターゲットを絞るのは合理的である。一方、非喫煙者ではGGOなどが発見され、その予後は良い。日本のデータが良いのは、これらを含んでいるためかもしれない。中山班のデータでも喫煙者より非喫煙者のほうが効果が大きいようだ。また、今回の研究の対象を喫煙者に限れば、研究終了後も非喫煙者に対するCT検診の効果のエビデンスは存在しないことになる。海外の研究はすべて喫煙者限定であるため、日本で非喫煙者のデータを出す必要があるということもあり、今回の研究では非喫煙者も含むことにした。

5. 年齢は？

厚労省の「がん対策推進基本計画」での死亡率減少の目標は74歳以下（75歳以上は減少できなくても良いという意味ではなく、コントロールが困難ということ）としている。10年行うとすると、50-64歳をリクルートすることになり、その線が妥当であろうということになった。

6. 性別は？

喫煙者 vs 非喫煙者の議論と同じであり、日本でやるなら男女とも行うべきだろうという結論になった。

7. 胸部X線に比較して、肺がん死亡減少効果がどの程度あると見込むか？

中山班のデータからでも、非喫煙者ではかなりあるかもしれないが、喫煙者ではそれほど楽観できないように思われる。死亡者の割合は圧倒的に喫煙者が多いので、喫煙者での期待できる死亡減少効果を、全体で期待できる死亡減少効果として算出しなければならない。その点からは、毎年受診しても死亡率50%減少は難しいのではないかと、という意見

もあり、一方で、毎年受診して20%減少では費用に見合わない、という意見もあった。

8. 毎年CTを撮らないとダメか？

喫煙者では半年に1回のCT検診でも死亡するケースがあることがわかっており、毎年必要だろうと思われたが、非喫煙者では10年に3-4回で充分ではないかと思われた。検診期間の後のフォローの期間は必要か、という問題もあったが、非喫煙者のようなゆっくりしたものにはあったほうが良いが、喫煙者のような速いものには必ずしも必要でないと思われた。

組み上げたRCT計画案

以上のような議論の末、費用的な面も加味して、以下のようなRCT計画案を組み上げた。

- ① 50-64歳の男女に対して、10年間の胸部CTが胸部X線に比べて40%の肺がん死亡減少効果があると見込んで必要症例数を算出
- ② 喫煙率、男女比などは現行検診のデータを使用
- ③ 妥当な応諾率、コンタミネーションを見込むと50000人必要
- ④ 研究群では低線量CTと喀痰細胞診を10年間
 - (ア) 喫煙者では低線量CT検診(+喀痰)を10回
 - (イ) 非喫煙者では低線量CT検診(+喀痰)は1,3,7年目の3回で、残りは現行検診
- ⑤ 対照群では現行検診を10年間
- ⑥ 当初計画としては3-4年程度で一段落させることを要請されたため、
 - (ア) プライマリ・エンドポイントとして、追跡法による精度(感度・特異度)を2群間で比較
 - (イ) セカンダリ・エンドポイントとして、発見時の病期の分布(特に進行がんの罹患数)、腫瘍径の分布を比較し、肺がん死亡率の減少の程度を推定
 - (ウ) 10年間(登録期間を5年と設定したので全部で15年)に延長できれば