

イテリア[®]に基づいている。このような医学的な所見あるいは職業歴のある労働者に発生した原発性肺癌症例をアスベスト肺癌として認定する。特に、胸膜プラークは胸腔鏡や手術時に確認できた場合には証拠として写真を撮っておくと労災認定の際に重要な証拠となる。また、手術や剖検時の肺組織内でのアスベスト小体や繊維数は胸膜プラークを認めない症例で、職業性アスベスト曝露がある際には、労災認定上重要となるので、外科医の先生方には知っておいていただきたいと思う。

2) 治療

一般人の肺癌治療と同様である。

3. 中皮腫

中皮腫は臓側および壁側漿膜の表面にある中皮細胞に生じる腫瘍である。通常、腫瘍は良性と悪性に分類されるが、中皮腫はすべて悪性を指す。発生部位は胸膜原発が約 80% と最も多く、ついで腹膜が約 20% であり、心膜や精巣鞘膜の中皮腫はまれである。

中皮腫は石棉肺と異なり、アスベスト低濃度曝露でも発生する。初回曝露よりおおむね 40 年後、最低でも 20 年を経て発生する。また、中皮腫はアスベストの体内蓄積量がさほど多くなくても、沈着した期間が長くなるほど中皮腫発生の危険性は増大する。そのため、職業性曝露のみならず、近隣曝露や家庭内曝露も原因となる。したがって、本人のみならず家族の職業歴や過去の居住歴などの調査が必要になる。

現在でもなお肺に吸入されたアスベスト繊維が中皮腫を発生させるメカニズムは明らかではないが、細気管支・肺に吸入されたアスベスト繊維はリンパ流により臓側胸膜側に送られ、胸膜の間質を通じ、壁側胸膜にアスベスト繊維が運ばれて、発癌が成立すると考えられている。

1) 診断

胸膜中皮腫の自覚症状は、呼吸困難と胸痛が最も多く、ついで咳、発熱などがみられる。画像所見では胸水貯留が約 80% 以上と多くみられる。通常、腫瘍は肺を取り囲むようにびまん性に増殖する胸膜病変をきたすが、胸膜の腫瘍

状陰影を呈することもある。そのため、胸膜直下に発生した肺癌や胸膜あるいは胸壁腫瘍との鑑別が必要になる。また、早期病変では胸部 CT でも、胸水貯留のみのこともあるので、胸膜炎との鑑別も必要となる。

一方、腹膜中皮腫の場合は初発症状として腹痛と腹部膨張感が多くみられる。画像上ではびまん性腹膜肥厚、腫瘍の播種像や腹部腫瘍像が認められ、女性の場合には卵巣癌との鑑別が重要となる。

胸水や腹水の細胞診による診断率はおおむね 40% である。胸水中ヒアルロン酸が 10 万 ng/mL 以上である場合には約 50% が中皮腫であるが、肉腫型中皮腫ではほとんどがこれより低い値を示す⁶⁾。そのため、確定診断には病理組織学的検査を必須とし、胸腔・腹腔鏡下胸膜生検が推奨されている。

病理組織所見では、上皮型、肉腫型、二相型の大まかに分けて 3 分類されるが、特殊型と分類される多数の亜型が存在する。上皮型が約 60%、肉腫型が約 15% で、両者の組織型が混じる二相型が約 25% である。

現在では HE 染色のほかに免疫組織化学染色法が必須である。すなわち、上皮型中皮腫の場合には陽性マーカーとして、calretinin, D2-40, WT-1 など、陰性マーカーとしては CEA, TTF-1, Ber-EP4, MOC-31 などが使用される。特に女性の腹膜中皮腫と卵巣癌腹膜播種の鑑別では女性ホルモンである estrogen, progesterone の染色性が重要視される。一方、肉腫型中皮腫の陽性マーカーとして、D2-40, AE1/AE3, CAM5.2, EMA (膜陽性)、陰性マーカーとして、desmin, α -smooth muscle actin (SMA), s-100, CD34 などがある⁷⁾。

2) 治療方法

手術療法、化学療法、対症療法に分けられる。

(1) 唯一の根治療法は胸膜肺全摘出術である。Sugarbaker ら⁸⁾は 5 年生存率が 40% と報告しているが、ヨーロッパグループは姑息的手術である壁側胸膜切除/肺胸膜剥離術と生存期間が変わらないと報告⁹⁾している。手術適応を十分考慮し、早期病変に限れば予後は良いと思われる。

表2 良性石綿胸水の診断ガイドライン

-
- 1) 職業性石綿曝露歴がある
 - 2) 胸水穿刺により胸水の存在が確認されている
 - 3) 下記の検査所見などにより、胸水をきたす他疾患を除外しうる
 - ・ 滲出性胸水
 - ・ 胸水 ADA 値 50 IU/L 未満
 - ・ 胸水 CEA 値が血清正常値未満
 - ・ 胸水ヒアルロン酸値が 100,000 ng/mL 未満
 - ・ 胸水細胞診 陰性
 - ・ 胸水細胞分類で中皮細胞が 5% 未満
 - ・ 胸部 CT で悪性腫瘍が疑われるような胸膜病変を認めない
 - ・ 胸腔鏡による胸膜病変の観察および胸膜生検にて他疾患を否定できる
(ただし、胸腔鏡検査ができない症例では 1 年間経過観察で悪性腫瘍など他疾患を否定する)
-

(2) 化学療法ではシスプラチン+ペメトレキセド(アリムタ)併用化学療法が唯一有意な効果が得られた治療方法である⁹⁾。特に、上皮型では効果が高いが、治療効果がなくなった後には有効な治療方法がないため、緩和治療を有効に活用することが求められる。

(3) 対症療法のための症例では生存期間中央値は 4.1 カ月と、予後が不良であった¹⁰⁾。

早期病変では、胸膜肺全摘出術、化学療法に放射線療法を加える trimodality を行うと 5 年生存が期待できるため、治療目的のため積極的に行うことが求められるが、performance status (PS) が 0-1, 70 歳未満, 左側, 上皮型であるという条件が付く。

4. 良性石綿胸水(アスベスト胸膜炎)

1) 診断

アスベスト曝露によって生じる非悪性の胸水を良性石綿胸水という。通常は片側で少量の胸水を認めるが、1,000 mL 以上の大量胸水を呈することもある。初回曝露からの潜伏期間が 12-30 年と他のアスベスト関連疾患に比べてやや短いと報告¹¹⁾されている。

自覚症状としては、胸痛、息切れを主訴とすることが多いが、40% 程度は無症状のまま健診で発見されている。診断基準は①アスベスト曝露歴がある、②胸水が存在する、③悪性腫瘍や結核などほかに胸水の原因となる疾患が見あたらない、④胸水発生後 3 年間悪性腫瘍が

認められない、以上の 4 項目を満たす必要がある¹²⁾。通常は除外診断を行う。すなわち、リウマチ、SLE などの膠原病、結核性あるいは癌性胸膜炎などを否定して、胸水の原因がアスベスト曝露以外に考えられないことを裏づける必要がある。この疾患の‘良性’とは、悪性腫瘍でないという意味であり、臨床経過が必ずしも良性であるということでもなく、胸膜中皮腫の前駆病変でもない。悪性胸膜中皮腫を否定するために、最近では胸腔鏡による肉眼的な観察とともに胸膜生検を行うことが求められている。

胸水の性状は滲出液でしばしば血性であり、細胞成分では大半の症例でリンパ球が増加する。胸水中のヒアルロン酸値は 5 万 ng/mL 以下の場合が多く、中皮腫の場合のように 10 万 ng/mL を超えることは極めてまれである。また、adenine deaminase (ADA), CEA, CYFRA21-1 などのマーカーは正常範囲内である。胸膜生検結果では病理学的に線維性胸膜炎と診断される。著者らは表 2 に示すような診断ガイドラインを作成して、積極的に本疾患を診断するように努めている。

2) 治療

臨床経過では 1-10 カ月で自然軽快することが多いが、軽快しない場合はステロイド剤が有効なこともある。大量胸水の際には胸水の持続吸引も必要となる。

5. びまん性胸膜肥厚

1) 診断

びまん性胸膜肥厚とはアスベストによる臓側胸膜の慢性炎症による広範な線維化病変を指す。病変は通常壁側胸膜にも及び両者は癒着している。一般的には良性石綿胸水の後遺症として生じることが多いが、胸水貯留を認めず徐々にびまん性胸膜肥厚に進展することもある。定義は、胸部X線上で、胸膜肥厚の広がり範囲が一側の場合は一側胸壁の1/2以上、両側の場合は両側胸壁の1/4以上の所見を認める場合である。壁側胸膜病変である胸膜プラークとの鑑別のために胸部CTにより臓側胸膜の病変であることを確認する必要がある。病変の広がりや横隔膜との癒着の程度が強くなると、拘束性呼吸機能障害をきたすことがある。

びまん性胸膜肥厚は必ずしもアスベストによるものとは限らない。結核性胸膜炎の後遺症やリウマチ性疾患、心不全による胸水などによっても発生するため、これら疾患との鑑別が必要である¹⁾。詳細な職業性アスベスト曝露歴を聴取するとともに(石灰化)胸膜プラークの存在を確認することが重要である。上述の胸部X線上の広がりがあり、職業性アスベスト曝露が3年以上あり、著しい呼吸機能障害があると労災認定されることになる。著しい呼吸機能障害は必ずしも拘束性障害でなくても、閉塞性呼吸機能障害でも日本では認定を受けることになる。

2) 治療

気管支拡張剤などによる対症療法と慢性呼吸不全に対する在宅酸素療法になる。

6. 医学的・客観的なアスベスト曝露の所見

労災認定のうえで、アスベスト関連疾患の最も重要な点は、職業性アスベスト曝露を確認することである。その医学的所見には、①胸膜プラーク、②石綿小体、③石綿繊維がある。

1) 胸膜プラーク

胸膜プラークは、低濃度アスベスト曝露によっても発生する限局性で、板状の胸膜肥厚である。その大部分は壁側胸膜に生じるが、まれに葉間胸膜など臓側胸膜にも生じる。厚みは1-5mm程度のもが多いが、10mm以上のものまで多彩である。

胸膜プラークの好発部位は、胸壁背外側第7-10肋骨レベル、外側第6-9肋骨レベル、横隔膜ドーム部、傍椎体領域などが知られている。肺尖部や肋横角には通常みられない。一般的には左右同程度に認められるが、時に左右非対称な症例もあり、まれに片側性の症例もある²⁾。

石灰化の頻度は10-15%程度とされており、アスベスト曝露から20年程度経てから出現し、時間の経過とともに石灰化を伴う頻度が増加する。

胸膜プラークの診断について、胸部X線のみでの診断は難しく、胸部X線でプラークが疑われる場合は、胸部CTでの確認が推奨されている。胸部CTになると検出率はかなり上がるが、紛らわしい偽病変について理解したうえでの慎重な読影が求められる。しかし、CTを用いても描出できない薄いプラークもあることから、胸腔鏡下や開胸による手術時または剖検時などに肉眼で確認することも考慮する必要がある。胸膜プラークは疾患ではなく、病態を示すものであるが、アスベスト曝露のよい指標となる。

■ 文 献

- 1) 高田礼子：アスベストばく露による中皮腫の発生。胸膜中皮腫診療ハンドブック(岸本卓巳編)，p2-11，中外医学社，2007。
- 2) 岸本卓巳：アスベスト肺。呼吸器科 9: 548-552, 2007。
- 3) Akira M, et al: High-resolution CT of asbestosis and idiopathic pulmonary fibrosis. AJR Am J Roentgenol 181: 163-169, 2003。

- 4) Hammond EC, et al: Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates. *Ann N Y Acad Sci* 3630: 473-475, 1979.
- 5) Consensus Report: asbestos, asbestosis and cancer: the Helsinki criteria for diagnosis and attribution. *Scand J Work Environ Health* 23: 311-316, 1997.
- 6) 武島幸男: 中皮腫の免疫組織化学染色の見方. 画像と病理像から学ぶ中皮腫アトラス(井内康輝編), p247-261, 篠原出版, 2009.
- 7) Sugarbaker DJ, et al: Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117: 54-65, 1999.
- 8) Flores RM, et al: Extrapleural pneumonectomy versus pleurectomy/decortication in the surgical management of malignant pleural mesothelioma: Results in 663 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 135: 620-626, 2008.
- 9) Vogelzang NJ, et al: Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 21: 2636-2644, 2003.
- 10) Gamba K, et al: Treatment and survival analyses of malignant mesothelioma in Japan. *Acta Oncol* 52: 803-808, 2013.
- 11) Epler GR, et al: Prevalence and incidence of benign asbestos effusion in a working population. *JAMA* 247: 617-622, 1982.
- 12) 三浦溥太郎: 石綿曝露の医学的所見 胸膜疾患. びまん性胸膜肥厚. 石綿曝露と石綿関連疾患(森永謙二編), p189-196, 三信図書, 2008.
- 13) 審良正則ほか: 石綿曝露の医学的所見 胸膜プラーク-臨床. 石綿曝露と石綿関連疾患(森永謙二編), p55-61, 三信図書, 2008.



The degree of microRNA-34b/c methylation in serum-circulating DNA is associated with malignant pleural mesothelioma



Takayuki Muraoka^a, Junichi Soh^a, Shinichi Toyooka^{a,*}, Keisuke Aoe^b, Nobukazu Fujimoto^c, Shinsuke Hashida^a, Yuho Maki^a, Norimitsu Tanaka^a, Kazuhiko Shien^a, Masashi Furukawa^a, Hiromasa Yamamoto^a, Hiroaki Asano^a, Kazunori Tsukuda^a, Takumi Kishimoto^c, Takemi Otsuki^d, Shinichiro Miyoshi^a

^a Department of Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan

^b Department of Medical Oncology and Clinical Research, National Hospital Organization, Yamaguchi-Ube Medical Center, 685 Higashi-kiwa, Ube 755-0241, Japan

^c Department of Respiratory Medicine, Okayama Rosai Hospital, 1-10-25 Chikkomidorimachi, Minami-ku, Okayama 702-8055, Japan

^d Department of Hygiene, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki 701-0192, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 May 2013

Received in revised form

18 September 2013

Accepted 29 September 2013

Keywords:

Digital PCR

Malignant pleural mesothelioma

microRNA

miR-34b/c

Methylation

Circulating DNA

ABSTRACT

Objectives: Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive tumor with a poor prognosis. microRNA-34b/c (miR-34b/c), which plays an important role in the pathogenesis of MPM, is frequently downregulated by DNA methylation in approximately 90% of MPM cases. In this study, we estimated the degree of miR-34b/c methylation in serum-circulating DNA using a digital methylation specific PCR assay (MSP).

Materials and methods: A real-time MSP assay was performed using the SYBR Green method. The melting temperature (T_m) of each PCR product was examined using a melting curve analysis. For a digital MSP assay, 40 wells were analyzed per sample. A total of 110 serum samples from 48 MPM cases, 21 benign asbestos pleurisy (BAP) cases, and 41 healthy volunteers (HVs) were examined.

Results: Positive range of T_m value for miR-34b/c methylation was defined as 77.71–78.79 °C which was the mean \pm 3 standard deviations of 40 wells of a positive control. The number of miR-34b/c methylated wells was counted per sample according to this criterion. The number of miR-34b/c methylated wells in MPM cases was significantly higher than that in BAP cases ($P=0.03$) or HVs ($P<0.001$). Advanced MPM cases tended to have higher number of miR-34b/c methylated wells than early MPM cases. Receiver–operating characteristic (ROC) curve analysis revealed that three number of miR-34b/c methylated wells per sample was the best cut-off of positivity of MPM with a 67% of sensitivity and a 77% specificity for prediction. The area under the ROC curve was 0.77.

Conclusions: Our digital MSP assay can quantify miR-34b/c methylation in serum-circulating DNA. The degree of miR-34b/c methylation in serum-circulating DNA is associated with MPM, suggesting that this approach might be useful for the establishment of a new detection system for MPM.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Asbestos exposure has been reported to cause asbestos-related diseases such as malignant pleural mesothelioma (MPM), primary lung cancer, and benign asbestos pleurisy (BAP) [1]. Although the use of asbestos has been strictly restricted, the number of MPM patients who had been exposed to asbestos is still increasing [2,3]. MPM is an aggressive tumor with a dismal prognosis, with a median

overall survival period of 12 months [2]. Approximately 85–90% of patients with MPM present with unresectable disease at the time of diagnosis [4]. Additionally, both MPM and BAP cases suffer from common symptoms caused by pleural effusion. These conditions are difficult to distinguish using not only radiological imaging tests such as chest X-ray and computed tomography, but also cytological examinations of pleural effusion [5,6]. Therefore, pathological validation by means of an invasive pleural biopsy with a full-layer resection of the parietal pleura is strongly recommended [7], although the possibility of a sampling error at the time of biopsy is significant; whether a few pieces of the parietal pleura are actually representative of the entire pleural lesion is unclear [8].

* Corresponding author. Tel.: +81 86 235 7265; fax: +81 86 235 7269.

E-mail address: toyooka@md.okayama-u.ac.jp (S. Toyooka).

Considering the difficulty associated with the pathological diagnosis of MPM, a definitive diagnosis based on pathological finding alone is occasionally challenging [9,10]. Since misguided diagnoses lead to delays in treatment and early diagnosis and subsequent treatment are thought to improve the clinical outcome of patients with MPM, a critical need exists for the development of a reliable and non-invasive test for the detection of MPM.

Reportedly, the downregulation of several tumor suppressive genes, such as *BMP3b* [11], *BMP6* [11], *IGFBP* [12], and *RASSF1A* [13], frequently occurs as a result of DNA methylation in MPM cases. Similar to protein coding genes, microRNAs (miRs), which are a group of non-coding small RNAs that mostly regulate their target messenger-RNAs through posttranscriptional repression [14], are downregulated through the methylation of their promoter regions [15]. In fact, we have recently revealed that miR-34b/c, which plays an important role in the pathogenesis of MPM, is downregulated by promoter methylation in approximately 90% of MPM cases [16].

Blood examinations are less-invasive diagnostic methods and several serum biomarkers such as mesothelin, osteopontin, CYFRA21-1, and Fibulin-3 have been reported for the diagnosis of MPM [10,17–19]. Among them, mesothelin has been well-studied and is currently considered to be the best serum biomarker of MPM available, although a recent systematic review of medical literature revealed a limited sensitivity [20]. The presence of nucleic acids in the blood was recognized more than 30 years ago [21]. Solid malignant tumors are known to release a significant amount of genomic DNA into the systemic circulation probably through cellular necrosis and apoptosis [21,22]. Therefore, cell-free circulating DNA in the serum or plasma is considered to be a source of useful biomarker during carcinogenesis [23,24], although tumor-derived circulating DNAs are fragmented and present in the blood flow amidst a high background of normal cell-derived DNAs [22,25]. Highly sensitive assays are required to detect tumor-specific genetic alterations in serum-circulating DNAs in patients with malignant tumors [23].

Digital PCR assays have been developed as a highly sensitive assay for the detection of rare genetic abnormalities amidst a high normal background. Digital PCR was originally developed as a tool for the amplification of individual molecules for purposes of identifying and counting individual DNA molecule sequence alterations [26], and now is applied to determine coding mutations, loss of heterozygosity, allelic imbalance and SNP polymorphisms [27,28]. This principle has been also applied to DNA methylation analyses [29]. One of advantages of digital PCR is the sequestration of competing background molecules into negative wells that do not participate in the PCR amplification, leading to improve the ratio

of template-to-background in the positive wells [29]. Particularly, competition for primer annealing by background DNA is a major problem in the detection of low-abundance methylation variants by MSP, because sequence redundancy is increased in bisulfite converted DNA, which contains only three bases outside of sites of DNA methylation [29]. To the best of our knowledge, the digital PCR assay for the detection of methylation of miR genes has never been applied as a blood detection test for MPM.

To establish a new detection system for MPM, we developed a digital MSP assay to evaluate the degree of miR-34b/c methylation in serum-circulating DNAs in patients with MPM, comparing those in patients with BAP, and healthy volunteers (HVs).

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

We obtained more than 2 mL of peripheral blood samples from 48 MPM cases, 21 BAP cases, and 41 HVs at Okayama University Hospital, Okayama Rosai Hospital, and the National Hospital Organization Yamaguchi Ube Medical Center between August 2006 and August 2011. The characteristics of all 110 cases are shown in Table 1. The blood samples were centrifuged at 3500 rpm for 5 min within 1 h after the collection, and the sera were collected and stored in aliquots at -80°C at each institute until further experiments. As a positive control (POC), the supernatant of a culture medium for NCI-H290 (H290), an MPM cell line harboring heavy methylation of miR-34b/c [16], was collected and stored at -80°C . We also collected the supernatant of culture medium for LP9, a non-malignant peritoneal mesothelial cell line, as a negative control. H290 was a kind gift from Dr. Adi F. Gazdar (Hamon Center for Therapeutic Oncology Research and Department of Pathology, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX). We purchased LP9 from the Coriell Cell Repository (Camden, NJ). Informed consent was obtained from each case at each institute. The study was approved by the ethics committee of Okayama University (approval number for the genome study, 173).

2.2. DNA extraction and bisulfite conversion

We extracted DNA from 1 mL of serum sample or supernatant of cell culture medium using the QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's recommendations, and eluted the DNA in 120 μL of the kit's elution buffer. The DNA concentration was quantified using NanoDrop ND-1000

Table 1
Patient characteristics of all samples.

| | Subsets | MPM (n=48) | | BAP (n=21) | | HV (n=41) | | |
|----------------|--------------------------------|------------|----|------------|----|-----------|----|----|
| | | n | % | n | % | n | % | |
| Age | (69, 38–91) (median, range) | <69 | 28 | 58 | 4 | 20 | 23 | 56 |
| | | ≥ 69 | 20 | 42 | 17 | 80 | 18 | 44 |
| Sex | Male | 45 | 94 | 15 | 71 | 23 | 56 | |
| | Female | 3 | 6 | 6 | 29 | 18 | 44 | |
| Smoking | Never | 14 | 29 | 9 | 43 | 23 | 56 | |
| | Ever | 34 | 71 | 12 | 57 | 18 | 44 | |
| Histology | Epithelioid | 36 | 75 | – | – | – | – | |
| | Biphasic | 8 | 17 | – | – | – | – | |
| | Sarcomatoid | 4 | 8 | – | – | – | – | |
| Clinical stage | I | 12 | 25 | – | – | – | – | |
| | II | 5 | 10 | – | – | – | – | |
| | III | 16 | 33 | – | – | – | – | |
| | IV | 12 | 25 | – | – | – | – | |
| | Unknown | 3 | 7 | – | – | – | – | |

MPM, malignant pleural mesothelioma; BAP, benign pleural asbestosis; HV, healthy volunteer.

(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) and the mean dosage of the extracted serum DNA was $4.8 \pm 1.8 \mu\text{g}$ ($40 \pm 15 \text{ ng}/\mu\text{L}$). Among the $120 \mu\text{L}$ of extracted serum DNA, $20 \mu\text{L}$ of DNA ($0.8 \pm 0.3 \mu\text{g}$) was used for bisulfite conversion using the Epitect Bisulfite Kit (Qiagen) and the DNA was eluted in $40 \mu\text{L}$ of the kit's elution buffer and used as the templates for the assays described below. As for the H290 and LP9 cell lines, the concentrations of extracted DNA from the supernatant of cell culture medium were adjusted to $40 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Twenty microliters ($0.8 \mu\text{g}$) were applied for bisulfite conversion using Epitect Bisulfite Kits (Qiagen) with $40 \mu\text{L}$ of the final elution.

2.3. Real-time methylation specific PCR (MSP) assay

We designed three sets of MSP primers for the predicted bisulfite-modified sequences based on the nucleotide sequence submitted to GenBank (gene accession numbers, NR_029839 for miR-34b and NR_035765 for miR-34c) and our previous report [16]. Among them, we decided to use the following primer set because of its high sensitivity (data not shown): forward primer, CGTACGGGGTTCGAGAGAGT; reverse primer, CTCGACCCGAAGTCCCACT. The length of the PCR product was 83 bp. A real-time MSP assay was performed using the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in a final volume of $20 \mu\text{L}$ per well containing $1 \mu\text{L}$ of bisulfited DNA ($20 \pm 7.5 \text{ ng}/\text{well}$ for serum and $20 \text{ ng}/\text{well}$ for cell supernatant), $10 \mu\text{L}$ of $2 \times$ Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), and $0.3 \mu\text{L}$ of both $10 \mu\text{M}$ forward and reverse primers. The PCR conditions were as follows: an initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles of 94°C for 15 s and 60°C for 60 s. After PCR amplification, the melting temperature (T_m) of each PCR product was examined using a melting curve analysis.

2.4. Statistical analysis

Differences in the number of miR-34b/c methylated wells were compared between two categorized groups using the Mann–Whitney test. P values less than 0.05 were considered statistically significant. The receiver–operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to determine the cut-off point for the number of miR-34b/c methylated wells. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Detection of positive wells containing miR-34b/c methylated DNA using a melting curve analysis

The fluorescent signal after PCR amplification was detected in all the wells, including those containing a water blank, because of nonspecific PCR reactions. To detect the positive wells containing miR-34b/c methylated DNA, we defined the positive range of the T_m value for miR-34b/c methylation. We investigated the T_m values of 40 wells of the POC samples, 40 wells of LP9 supernatant samples (negative control), and 40 wells containing a water blank. The supernatants of the culture medium for the cell lines contained cell-derived DNA from apoptotic cells and were used as models of the serum samples. The range of the T_m values differed between the 40 POC wells (mean \pm standard deviation [SD], $78.25 \pm 0.18^\circ\text{C}$) and the 40 water blank wells ($75.01 \pm 0.47^\circ\text{C}$) (Fig. 1). In addition, the length of the PCR product of the water blank was confirmed to be shorter than that of POC using gel electrophoresis (Supplemental Figure 1). Furthermore, the T_m values of 39 out of 40 of the wells of the LP9 supernatant sample (negative control) were within the range of the WB samples (Fig. 1). We confirmed that none of the CpG sites that our MSP assay could detect were methylated in the

LP9 cell lines using bisulfite sequencing (data not shown). According to this result, we defined the positive range of the T_m values for miR-34b/c methylated wells as $77.71\text{--}78.79^\circ\text{C}$, which was within the mean T_m values ± 3 SDs of 40 wells of the POC samples.

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.09.017>.

3.2. Digital MSP assay for miR-34b/c methylation

In the preliminary study, we examined miR-34b/c methylation in $1 \mu\text{L}$ of bisulfited DNA from serum-circulating DNA using a real-time MSP assay (one well per sample). miR-34b/c methylation was not present in $1 \mu\text{L}$ of bisulfited DNA from serum-circulating DNA from the MPM cases, even though the primary tumor harbored heavy miR-34b/c methylation. Considering the dilution effect of tumor-derived DNA in serum-circulating DNA, we repeated the real-time MSP assay for the same serum-circulating DNA and found that miR-34b/c methylation could occasionally be detected. Based on these findings, we decided to perform a real-time MSP assay for 40 PCR wells per serum-circulating DNA sample using the whole elution of bisulfited DNA ($40 \mu\text{L}$). The quantification of miR-34b/c methylation was performed using a digital MSP assay by counting the number of miR-34b/c methylated wells per sample. For this purpose, a total of $800 \mu\text{L}$ of PCR mixture containing $40 \mu\text{L}$ bisulfited DNA templates were first made, and we then distributed them in $20\text{-}\mu\text{L}$ aliquots per well for a total of 40 wells. After PCR amplification, the T_m value of each PCR product was calculated using a melting curve analysis, and the miR-34b/c methylation status of each PCR well was classified according to the positive range of the T_m values for miR-34b/c methylation. In every experiment, a POC sample was placed into a 96-well polypropylene PCR plate to confirm that the T_m value of the POC sample fell within the positive range for miR-34b/c methylation.

3.3. Quantification of miR-34b/c methylation using a digital PCR assay

A distribution map showing the T_m values for all the wells in all the cases was shown in Fig. 1. Each group showed a characteristic distribution of T_m values. Biphasic peaks of T_m values were seen for the MPM and BAP cases, in which the low- and high-grade T_m values were comparable to those of the water blank (low-grade) and the POC of miR-34b/c methylation (high-grade), respectively.

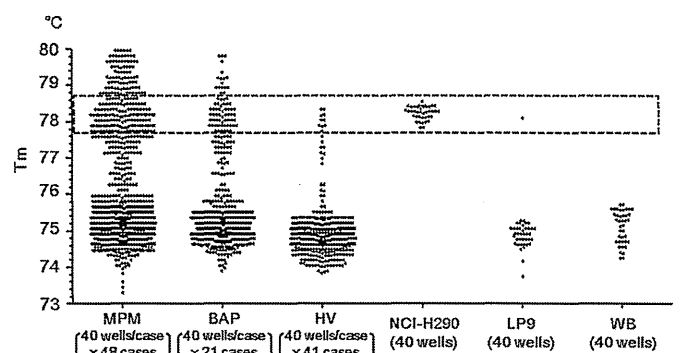


Fig. 1. A distribution map showing the T_m values for all wells in all the cases and the positive range for miR-34b/c-methylated well. The mean T_m values of 40 positive control (POC) wells were $78.25 \pm 0.18^\circ\text{C}$ (mean \pm standard deviation [SD]). We defined the well having the T_m within the mean value ± 3 SDs of POC ($77.71\text{--}78.79^\circ\text{C}$) as the positive well for miR-34b/c methylation, indicated with dotted square. MPM, malignant pleural mesothelioma; BAP, benign asbestos pleurisy; HV, healthy volunteers; WB, water blank.

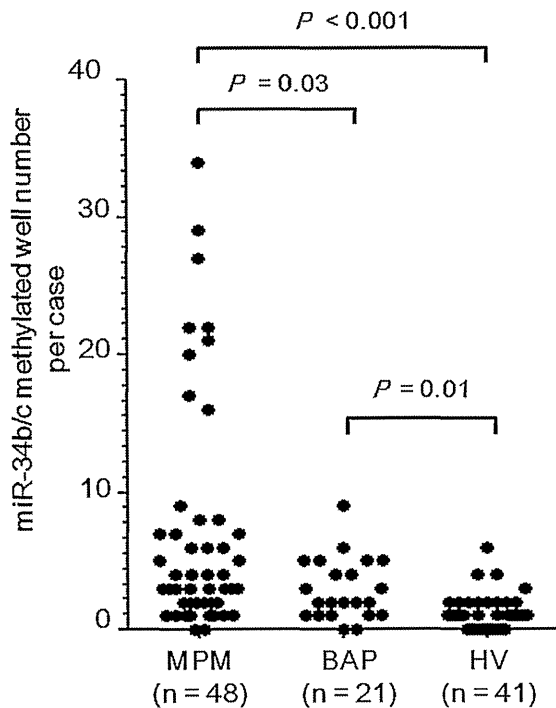


Fig. 2. Comparison of the numbers of miR-34b/c methylated wells. The numbers of miR-34b/c methylated wells were significantly higher in malignant pleural mesothelioma cases than in benign asbestos pleurisy (BAP) cases ($P=0.03$) and healthy volunteers (HVs) ($P<0.001$). BAP cases also showed significantly more miR-34b/c methylated wells than HV ($P=0.01$).

The T_m values of the HVs were mainly around that of the water blank.

The numbers of miR-34b/c methylated wells in the MPM cases was significantly higher than those in the BAP cases ($P=0.03$) or the HVs ($P<0.001$) (Fig. 2). The BAP cases also had significantly higher numbers of miR-34b/c methylated wells than the HVs ($P=0.01$).

3.4. Association between the numbers of miR-34b/c methylated wells and patient characteristics

We evaluated the association between the numbers of miR-34b/c methylated wells per sample and clinicopathological factors. No significant differences in the numbers of miR-34b/c methylated wells were seen when compared according to age, sex, smoking status, and histological subtype. MPM cases with an advanced clinical stage tended to exhibit higher numbers of miR-34b/c methylated wells than those with an early clinical stage except in two cases (Supplemental Figure 2). These two MPM cases with clinical stage I had over 20 miR-34b/c methylated wells; one of the patients had 34 miR-34b/c methylated wells, while the other had 22 miR-34b/c methylated wells and he suffered from a rapid increase in the thickness of the pleura immediately after the initial diagnosis and collection of the serum sample, although the patient was subsequently lost to follow-up.

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.09.017>.

3.5. Optimal cut-off point for miR-34b/c methylation by ROC curve analysis

In order to determine the cut-off number of miR-34b/c methylated wells for MPM cases, we carried out ROC curve analysis comparing MPM cases versus other non-malignant cases (Fig. 3 and

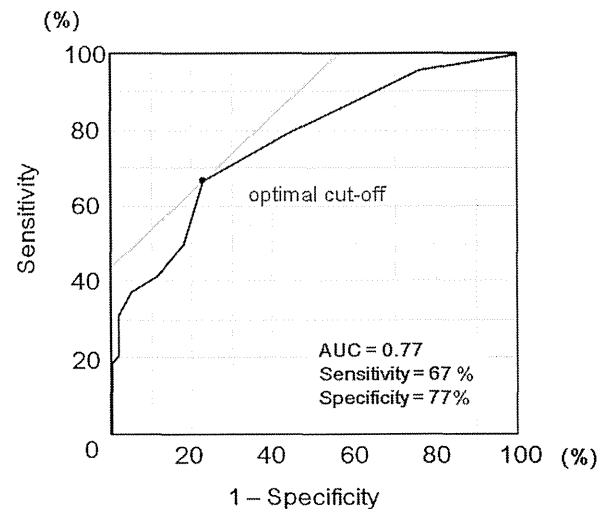


Fig. 3. Receiver-operating characteristic (ROC) curve for the cut-off number of miR-34b/c methylated wells in malignant pleural mesotheliomas. The optimal cut-off for the test is the point closest to the upper-left corner of the graph, which corresponds to miR-34b/c methylation. Area under the ROC curve (AUC) was 0.77.

Supplemental Table 1). According the ROC curve for all cases, three number of methylated wells was the best cut-off of positivity of MPM with a 67% of sensitivity and a 77% specificity for prediction. The area under the ROC curve (AUC) was 0.77.

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.09.017>.

4. Discussion

In this study, we established a highly sensitive assay for the quantification of miR-34b/c methylation in serum-circulating DNA to distinguish MPM cases from BAP cases or HVs. Our assay showed that the degree of miR-34b/c methylation was significantly higher in serum-circulating DNA from MPM cases than from BAP cases or HVs. MPM cases with an advanced clinical stage tend to have more miR-34b/c methylated wells than those with early stage disease, although two early-stage MPM cases did show heavy miR-34b/c methylation of their serum-circulating DNAs.

The dosage of DNA in the blood circulation itself is associated with tumor progression in patients with malignant tumors [30]. Needless to say, the degree of tumor-specific alterations in serum-circulating DNA can be considered a more specific marker for the detection of malignant tumors than the amount of total serum-circulating DNA. PCR reactions for the detection of these tumor-specific alterations in serum-circulating DNA can be interrupted not only by the fragmentation of DNA derived from tumor cells, but also by a high background of DNA derived from non-malignant cells. To overcome these difficulties, several sensitive assays have been developed [29,31,32]. Among them, digital PCR has been established as a highly sensitive assay for the detection of minor genetic alterations among a vast number of normal alleles [27,29]. Digital PCR can also calculate the dosage of the genetic alteration in a sample by determining the percentage of PCR wells with a positive reaction [29], with more precise quantification enabled by analysis of more PCR wells per sample. Of note, although we used TaqMan-based real-time PCR assays in our preliminary experiment, its sensitivity was low and we finally selected the present method (data not shown).

Our results showed that more than three miR-34b/c methylated wells yielded the highest discriminative ability with a 67%

sensitivity and a 77% specificity for predicting the presence of MPM. The AUC was 0.77, indicating that the established assay had a moderate diagnostic accuracy for predicting the occurrence of MPM [33,34]. As a positive test, a high specific threshold is typically required, and if we opt for a specificity of 95% (i.e., a false-positive rate of one out of 20), a sensitivity of our assay results in 38%. For a negative test result to aid in excluding diagnosis, a high sensitive threshold is generally required. At a selected sensitivity of 95%, the specificity of this assay was 24%. These results suggested that the sensitivity and specificity of our assay is almost similar to those of serum mesothelin level in an individual patient data meta-analysis (AUC=0.77, a sensitivity of 32% at 95% specificity) [20]. With regard to our sensitive assay, false positive cases are present in 43% of BAP cases and 12% of HVs using a cut-off value of three methylated wells. Further investigation is warranted for improvement of both sensitivity and specificity by combining with other biomarkers.

Two early-stage MPM cases exhibited heavy miR-34b/c methylation, indicating that our sensitive assay might detect miR-34b/c methylation during the early stage of MPM pathogenesis. Obviously, the limitation of clinical staging based on conventional radiological examinations should be considered, since one case experienced the rapid progression of the MPM soon after the initial diagnosis. The serum level of miR-34b/c methylation might reflect biological malignancy much more accurately than clinical staging. Further investigations of large-scaled studies are needed to clarify this issue. The sequential occurrence of other malignant tumors is another consideration, since miR34-b/c methylation can be observed in patients with other malignant tumors, such as lung [35,36], colorectal [15], and gastric cancers [37]. Regarding this issue, these malignant tumors were not obviously coincidental in any case of this study.

In conclusion, our digital MSP assay can quantify miR-34b/c methylation in serum-circulating DNA, revealing that miR-34b/c methylation is more heavily and frequently present in serum-circulating DNA from MPM cases than from BAP cases or HVs. This approach might be useful for the establishment of a new detection system for MPM.

Conflict of interest statement

The authors disclose no potential conflicts of interest. We have received Grant-in-Aids for the Okayama-Ken Tokubetsu Dengen Syozai Ken Kagaku Gijyutsu Sinkou Jigyuu Kenkyu. Itaku, 2010–2012 (S. Toyooka and T. Otsuki), for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports, Culture and Technology of Japan (23791570 for H. Asano), and for the 13 fields of occupational injuries and illnesses of the Japan Labor Health and Welfare Organization (T. Kishimoto).

Acknowledgement

We give special thanks to Yoko Kojima, Research Center for Asbestos-related Disease, Okayama Rosai Hospital for technical support.

References

- [1] La Vecchia C, Boffetta P. Role of stopping exposure and recent exposure to asbestos in the risk of mesothelioma. *Eur J Cancer Prev* 2012;21:227–30.
- [2] Robinson BW, Lake RA. Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med* 2005;353:1591–603.
- [3] Tsao AS, Wistuba I, Roth JA, Kindler HL. Malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 2009;27:2081–90.
- [4] Fennell DA, Gaudino G, O'Byrne KJ, Mutti L, van Meerbeeck J. Advances in the systemic therapy of malignant pleural mesothelioma. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5:136–47.

- [5] Hooper C, Lee YC, Maskell N. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. *Thorax* 2010;65(Suppl. 2):ii4–17.
- [6] Scherpereel A, Astoul P, Baas P, Berghmans T, Clayson H, de Vuyst P, et al. Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J* 2010;35:479–95.
- [7] Ray M, Kindler HL. Malignant pleural mesothelioma: an update on biomarkers and treatment. *Chest* 2009;136:888–96.
- [8] Davies HE, Nicholson JE, Rahman NM, Wilkinson EM, Davies RJ, Lee YC. Outcome of patients with nonspecific pleuritis/fibrosis on thoracoscopic pleural biopsies. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;38:472–7.
- [9] Creaney J, Olsen NJ, Brims F, Dick JM, Musk AW, de Klerk NH, et al. Serum mesothelin for early detection of asbestos-induced cancer malignant mesothelioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:2238–46.
- [10] van der Bijl S, Schaake E, Koffijberg H, Burgers JA, de Mol BA, Moons KG. Markers for the non-invasive diagnosis of mesothelioma: a systematic review. *Br J Cancer* 2011;104:1325–33.
- [11] Kimura K, Toyooka S, Tsukuda K, Yamamoto H, Suehisa H, Soh J, et al. The aberrant promoter methylation of BMP3b and BMP6 in malignant pleural mesotheliomas. *Oncol Rep* 2008;20:1265–8.
- [12] Tomii K, Tsukuda K, Toyooka S, Dote H, Hanafusa T, Asano H, et al. Aberrant promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in human cancers. *Int J Cancer* 2007;120:566–73.
- [13] Toyooka S, Carbone M, Toyooka KO, Bocchetta M, Shivapurkar N, Minna JD, et al. Progressive aberrant methylation of the RASSF1A gene in simian virus 40 infected human mesothelial cells. *Oncogene* 2002;21:4340–4.
- [14] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 2003;113:673–6.
- [15] Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008;68:4123–32.
- [16] Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2011;17:4965–74.
- [17] Grigoriu BD, Scherpereel A, Devos P, Chahine B, Letourneux M, Lebailly P, et al. Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment. *Clin Cancer Res* 2007;13:2928–35.
- [18] Gube M, Taeger D, Weber DG, Pesch B, Brand P, Johnen G, et al. Performance of biomarkers SMRP, CA125, and CYFRA 21-1 as potential tumor markers for malignant mesothelioma and lung cancer in a cohort of workers formerly exposed to asbestos. *Arch Toxicol* 2011;85:185–92.
- [19] Pass HI, Levin SM, Harbut MR, Melamed J, Chiriboga L, Donington J, et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N Engl J Med* 2012;367:1417–27.
- [20] Hollevoet K, Reitsma JB, Creaney J, Grigoriu BD, Robinson BW, Scherpereel A, et al. Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data meta-analysis. *J Clin Oncol* 2012;30:1541–9.
- [21] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646–50.
- [22] Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayr FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659–65.
- [23] Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res* 2007;635:105–17.
- [24] Paci M, Maramotti S, Bellesia E, Formisano D, Albertazzi L, Ricchetti T, et al. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;64:92–7.
- [25] Horlitz M, Lucas A, Sprenger-Haussels M. Optimized quantification of fragmented, free circulating DNA in human blood plasma using a calibrated duplex real-time PCR. *PLoS One* 2009;4:e7207.
- [26] Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9236–41.
- [27] Pohl G, Shih le M. Principle and applications of digital PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4:41–7.
- [28] Yung TK, Chan KC, Mok TS, Tong J, To KF, Lo YM. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2009;15:2076–84.
- [29] Weisenberger DJ, Trinh BN, Campan M, Sharma S, Long TI, Anantharayan S, et al. DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight. *Nucleic Acids Res* 2008;36:4689–98.
- [30] Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, Jantus-Lewintre E, Sanmartin E, Blasco A, et al. Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011;6:286–90.
- [31] Li L, Choi JY, Lee KM, Sung H, Park SK, Oze I, et al. DNA methylation in peripheral blood: a potential biomarker for cancer molecular epidemiology. *J Epidemiol* 2012;22:384–94.
- [32] Snell C, Kryptuy M, Wong EM, Loughrey MB, Dobrovic A. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Res* 2008;10:R12.
- [33] Shen J, Todd NW, Zhang H, Yu L, Lingxia X, Mei Y, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Lab Invest* 2011;91:579–87.

- [34] Fischer JE, Bachmann LM, Jaeschke R. A readers' guide to the interpretation of diagnostic test properties: clinical example of sepsis. *Intensive Care Med* 2003;29:1043–51.
- [35] Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Kubo T, Yamamoto H, Maki Y, et al. Frequent methylation and oncogenic role of microRNA-34b/c in small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2012;76:32–8.
- [36] Wang Z, Chen Z, Gao Y, Li N, Li B, Tan F, et al. DNA hypermethylation of microRNA-34b/c has prognostic value for stage non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther* 2011;11:490–6.
- [37] Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano HO, Yoshikawa K, et al. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. *Carcinogenesis* 2010;31:2066–73.

アスベスト関連肺胸膜病変

加藤勝也* 岸本卓巳** 金澤 右*

まずはアスベスト曝露の医学的指標として用いられ、臨床的に目にする機会が多い胸膜ブランクについて、精通しておく必要がある。肺癌、中皮腫に加えて著しい呼吸困難を伴う石綿肺、びまん性胸膜肥厚も労災や救済法での保障対象となっているため、その画像所見、認定要件についても精通しておく必要がある。中でも肺癌、中皮腫に関しては、石綿曝露職歴がない場合も保障対象となることに注意しておく必要がある。

アスベスト、胸膜ブランク、中皮腫

はじめに

中皮腫、肺癌をはじめとして、アスベスト曝露に起因する疾患が近年社会問題化している。これらアスベスト関連病変には労災や救済法など各種社会保障の対象となる疾病が含まれており、その認定に際し画像所見は大きな役割を果たしている。そのため、放射線科医は、その病態、画像所見について精通しておく必要がある。今回、アスベスト関連肺胸膜病変について、その画像所見を中心に概説する。

1 アスベストとは

アスベスト(石綿)は、天然の鉱物繊維で「せきめん」「いしわた」とも呼ばれる。石綿は蛇紋石族と角閃石族に別れ、そのうち、わが国で使用された代表的な石綿は、蛇紋石族の白石綿(クリソタイル)と角閃石族の茶石綿(アモサイト)、青石綿(クロシドライト)である。このうち発癌性が最も高いのが青石綿で、次いで茶石綿とされる。この2種類は1995年に使用禁止となったが、その後も白石綿は2004年まで濃度規制を強化しながらも使用し続けられた。石綿はきわめて細い繊維で、熱、摩擦、酸やアルカリにも

強く、丈夫で変化しにくいという特性をもち、他の代替え物質に比し安価である。このため、法的に禁止されるまでに相当量の石綿が、建材(吹き付け材、保温・断熱材、スレート材など)、摩擦材(自動車のブレーキライニングやブレーキパッドなど)、シール断熱材(石綿紡織品、ガスケットなど)といった様々な工業製品に使用された。

欧州では、アイスランドの1983年をはじめ、ドイツが1993年、英国が1998年など日本よりも早期に石綿は全面使用禁止となっており、この使用禁止の遅れも社会問題化している一因である。

2 アスベスト関連肺胸膜病変¹⁾

胸部領域のアスベスト関連病変として、表1のようなものがある。まず、各病変におけるアスベスト曝露量と曝露から発症までの期間について知っておく必要がある(図1)²⁾。アスベスト関連肺胸膜病変のうち、職業性高濃度曝露で発生するのが、石綿肺と石綿肺癌である。

石綿肺は職業性塵肺のひとつであり、職業性曝露の中でも石綿紡織、石綿吹き付けなど、かなりの高

* Kato K., Kanazawa S. 岡山大学病院放射線科センター

** Kishimoto T. 岡山労災病院アスベストプロク

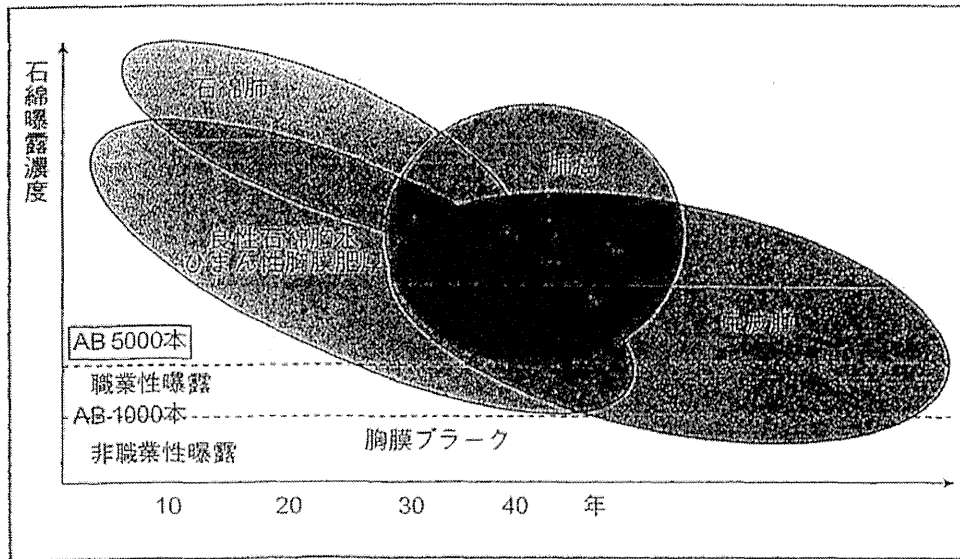


図1 疾患別石綿曝露濃度と潜伏期間
 AB：石綿小体。本数は肺乾燥重量1g当たりの石綿小体数。
 (文献2)を一部改変して転載)

表1 アスベスト関連肺胸膜病変

| 肺病変 | 胸膜病変 |
|-------|----------|
| 石棉肺 | 胸膜プラーク |
| 円形無気肺 | びまん性胸膜肥厚 |
| 石棉肺癌 | 良性石綿胸水 |
| | 悪性中皮腫 |

とも職業性での曝露が必要とされている。円形無気肺は良性石綿胸水に続いて起こることが多いので、良性石綿胸水と同等の曝露量であることが予想される。

以下に、これらアスベスト関連肺胸膜疾患について、画像を提示しながら解説する。

3 石綿肺 (asbestosis)

アスベスト曝露から10年程度以上を経て発症する。珪肺と並ぶ塵肺であり、職業性曝露の中でもきわめて高濃度の曝露によって発症するとされる。気道から吸入されたアスベスト繊維は細気管支周囲にまず沈着し、その周辺部に線維性変化を生じる³⁾。両側下肺外側部から上方に進展する下葉優位、背側優位の分布を呈し、胸部単純X線写真では不整形陰影といわれる下肺優位の線状・網状影を呈する。この不整形陰影についてはじん肺法で定められており、塵肺標準フィルムの1型相当以上がじん肺法で定める石綿肺となる。この際、じん肺法の中⁴⁾では胸部CT所見はあくまでも参考であり、胸部単純X線写真の所見が診断の基準となるということに留意しておく必要がある。

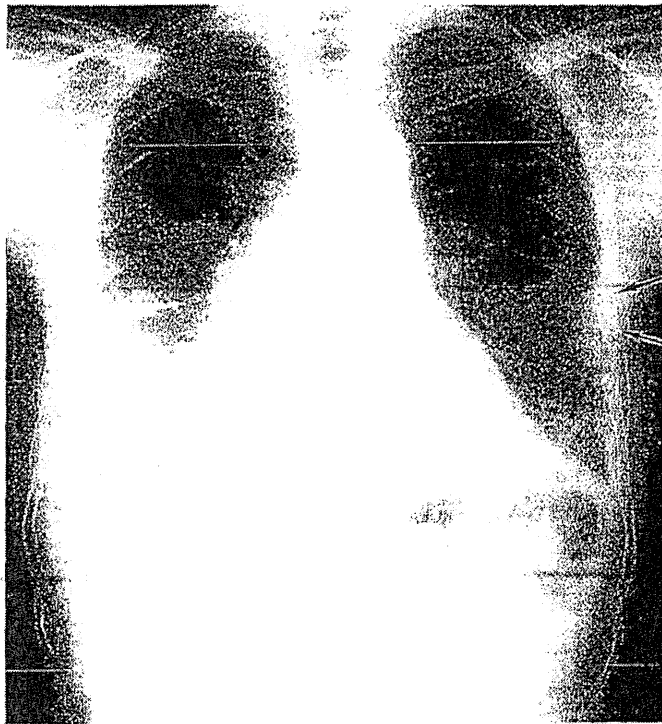
石綿肺は進行すると蜂巣肺を形成し、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) に類似した画像を呈することもある。進行は特発性肺線維症に比し緩徐であるが、珪肺など他の塵肺との比較では予後不良である。慢性呼吸不全や肺癌合併により比較的若いうちに死亡することも多い。

濃度曝露後、比較的早期に発症するとされている。石綿肺とは、肺癌発生の危険性が2倍になるアスベスト曝露歴を有する者に発生した肺癌のことをいう。具体的にはヘルシンキクライテリアで、25ファイバー/ml×年を超えるアスベスト曝露で肺癌発生の危険率が倍加するとされている。すなわち、近隣曝露とされる0.2ファイバー/ml程度の曝露では、石綿による肺癌を生じるリスクは低い。

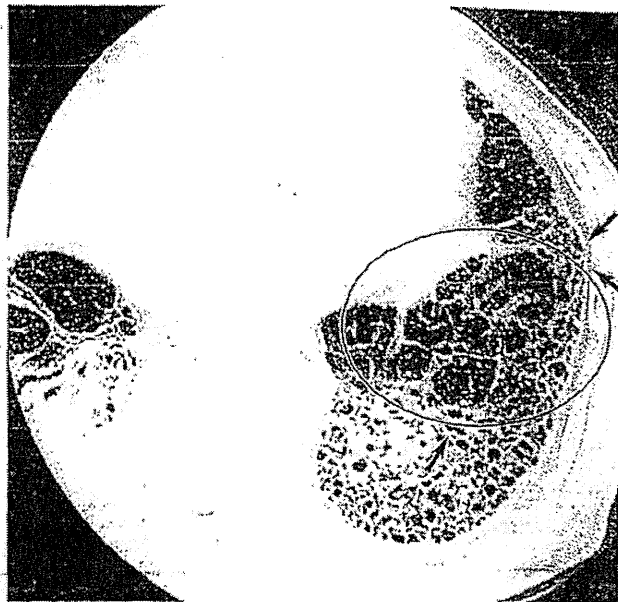
これに対し胸膜プラーク、胸膜中皮腫は職業性曝露以外の低濃度曝露でも生じ、間接曝露、近隣曝露、家庭内曝露などでも生じうる。胸膜中皮腫は曝露から30～40年程度とかなり時間が経過して発症するが、胸膜プラークは曝露から10年程度と早期から生じ、低濃度曝露でも生じるため、労災や石綿救済法など各種保障の際に、アスベスト曝露の医学的指標として用いられる。

びまん性胸膜肥厚と良性石綿胸水に関しては、疫学的調査が十分ではないが、高濃度曝露で生じる石綿肺や石綿肺癌と、低濃度曝露でも生じる胸膜プラークや胸膜中皮腫の中間程度の曝露量で、少なく

A 単純X線写真



B HRCT (2mm厚)



C HRCT (2mm厚)

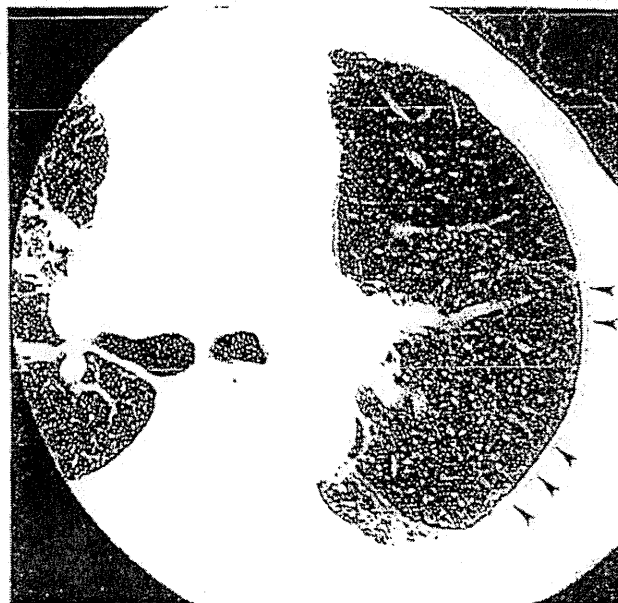


図2 70歳台、男性(断熱作業40年) 石綿肺

A: 左下肺優位に網状影とすりガラス影を認め、じん肺法におけるPR2/2程度の不整形陰影の所見である。左側胸部の限局性胸膜肥厚様の陰影はCTとの対比で、胸膜プラークの所見であった(→)。右には胸水貯留を認める。この後減量し、良性石綿胸水と診断されている。

B: 下葉優位背側優位に敷石状に並ぶ小嚢胞構造の集簇像を認め、蜂巢肺の所見である。蜂巢肺のサイズは小さめである。周囲には牽引性気管支拡張(→)やすりガラス影(O)も認める。

C: 病変が軽度の上肺のHRCTでは胸膜から少し離れて胸膜に沿った粒状影を認め、一部粒状影は繋がって線状影(→)を呈している。胸膜下粒状影、線状影の所見である。内層にも粒状影を軽度伴っている。

典型的な石綿肺の症例を示す(図2)。単純X線写真では下肺優位に線状・網状影を呈し、容量低下を伴っている。2mm厚のHRCTでは嚢胞状病変が敷石状に並んだ蜂巢肺の所見を呈している。特発性肺線維症に類似した画像であるが、蜂巢肺のサイズはそれほど大きくない。このように特発性間質性肺炎と類似した所見を呈するため、その鑑別が問題となるが、本症例では比較的病変の軽微な上肺に、石綿肺に特徴的とされる胸膜下粒状影、胸膜下線状影の所見を認めており、鑑別点となる。また、断熱作業という高濃度曝露職歴があることも、石綿肺を示唆するポイントである。

繰り返しになるが、石綿肺はかなり高濃度職業性

曝露によって生じるため、近隣曝露や家庭内曝露のような間接曝露では生じにくい。また、気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage; BAL)液や肺組織から一定量以上のアスベスト小体(1cm²当たり2本以上のアスベスト小体を検出)が証明されれば、石綿肺と診断する根拠となるが、本症例では乾燥重量1g当たり271万本と、大量のアスベスト小体が計測された。

画像所見としては、表2のような所見が石綿肺のHRCT所見として報告されている⁵⁾。特発性肺線維症との鑑別に関しては、提示症例でも認めた胸膜下粒状・分枝状影、胸膜下線状影の他に肺実質内帯状像、モザイクパターンの所見が複数以上認められる

表2 石綿肺のHRCT所見

| |
|----------|
| 小葉内間質肥厚像 |
| 小葉間隔壁肥厚像 |
| 胸膜下線状像 |
| 胸膜下楔状像 |
| 肺実質内帯状像 |
| すりガラス様陰影 |
| 蜂巣肺 |

場合に鑑別できるとの報告もある⁶⁾。

4 円形無気肺 (rounded atelectasis)

円形無気肺は画像上、円形または類円形の腫瘤様陰影を示す末梢性無気肺である。良性石綿胸水に続いて起こることが多い。石綿曝露以外に、結核性胸膜炎、呼吸器感染症、うっ血性心不全などの種々の胸膜炎後に発生することも多く、石綿曝露と因果関係を認めない例もままある。発生部位としては、背側病変が多く、下葉特にS10に生じる場合が多いが、中葉・舌区など腹側の病変の頻度も低くはない。いずれの肺葉にも生じ、多発病変も時に認める⁷⁾。

胸部単純X線写真においては、胸水または胸膜肥厚に接する末梢肺の腫瘤影であり、肺の容量低下、肺血管・気管支の収束像 (comet tail sign) が有名であるが、実際的に胸部単純X線写真のみでは肺癌など腫瘍性病変との鑑別は困難である。

胸部CTでは、1) 胸膜肥厚など胸膜異常病変に関連する円形または類円形陰影、2) 周囲の肺の容量低下、3) 胸膜と腫瘤の間に肺組織が介在、4) comet tail sign、5) 腫瘤基部の気管支透亮像の存在、6) 少なくとも2か所にシャープな辺縁を有する、7) 腫瘤は胸膜と鋭角をなすなどの所見が、特徴とされている⁸⁾。これらの所見を参考にすれば、生検することなく画像のみで円形無気肺の診断が可能な症例が多い(図3)。また、さらにMRIも有用で、施行することにより得られる所見として、1) 多撮像断面での comet tail sign、2) 胸水や胸膜肥厚と無気肺との正確な境界、3) 背側胸膜との連続性や無気肺内に見られる胸膜折れ込み像の所見があり⁹⁾、これらの所見が得られれば、さらに正診率が向上する。

5 石綿肺癌 (asbestos lung cancer)

石綿肺癌は、前述したように、職業性に相当する

高濃度曝露者に生じ、曝露から20年以上を経て発症するとされている。画像診断としては石綿曝露のない肺癌と差異はない。合併所見として、胸膜プラークを認める例が60~70%程度あるとの報告がある¹⁰⁾。

従来、石綿肺癌は労災補償の対象となってきたが、労災時効例を含めた労災対象とならない肺癌症例においても、一定の基準を満たせば、環境省の石綿救済法にて救済給付を受けられるようになった。石綿肺癌と認定するに当たっては、肺癌発生の危険性がアスベスト曝露により2倍になる程度の曝露があることが診断基準となっている。画像的には胸部単純X線写真やCTにて胸膜プラークを認め、同時に、肺線維化所見を認める場合、石綿肺癌として救済の対象となる。よって、肺癌の画像診断をする際に、放射線科医の社会的な役割として、胸膜プラークと肺線維化に注意して読影する必要がある。

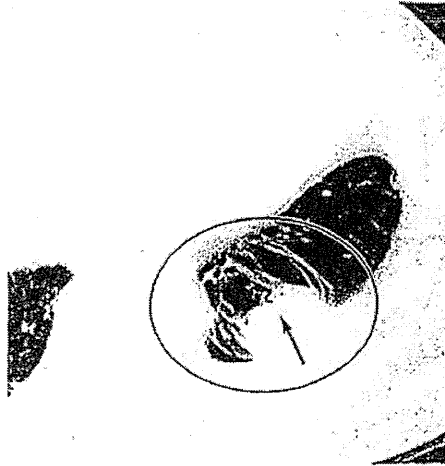
6 胸膜プラーク (pleural plaque)

胸膜プラークは胸膜肥厚斑または限局性胸膜肥厚とも呼ばれる。胸膜プラークを胸膜アスベストosisと呼んだ時期もあったため若干の混乱があるが、アスベストosisはあくまで肺病変である石綿肺のみを表す用語である。胸膜病変に用いるべきではなく、胸膜プラークとアスベストosisを混同してはならない。

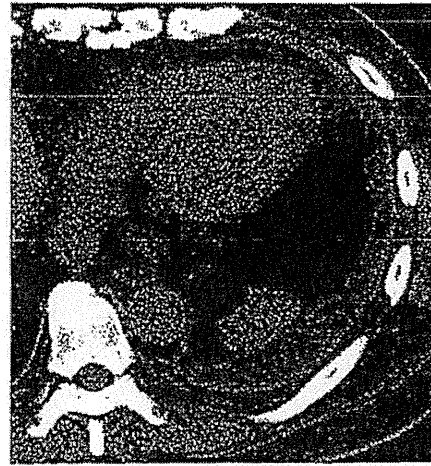
胸膜プラークは、一般的にアスベスト曝露から早ければ10年程度経過したあたりから生じ、以後時間の経過とともに徐々に増大し、石灰化を伴う頻度が増加する¹¹⁾。胸膜プラークは限局性、板状の胸膜肥厚であり、その大部分は壁側胸膜に生じるが、稀に葉間胸膜など臓側胸膜にも生じる。1~5mm程度の厚さのものが多く、1cmを超える厚さのものもある。好発部位としては、胸壁背外側第7-10肋骨レベル、前外側6-9肋骨レベル、横隔膜ドーム部、傍椎体領域などがある。肺尖部や肋骨横隔膜部にはほとんど見られない¹²⁾。通常左右同程度に認められるが、左右非対称例も時にあり、片側性の胸膜プラーク症例も稀にある。石灰化の頻度は10~15%程度とされているが、曝露者の高齢化とCTの描出能の向上により、その頻度は増加傾向である¹³⁾。

画像所見としては、胸部単純X線写真では、非石灰化プラークは描出されにくく、その検出率は14~54%程度とされている¹⁴⁾ ¹⁵⁾。好発部位である側胸

A 単純CT(肺野条件)



B 単純CT(縦隔条件)



C 造影CT(縦隔条件)

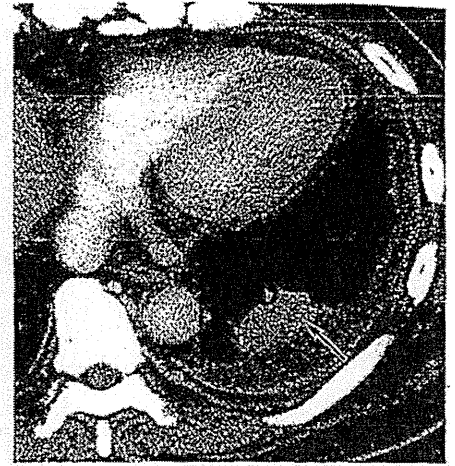


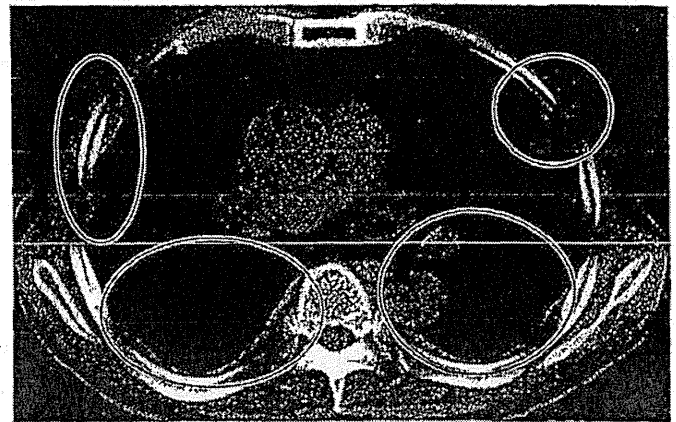
図3 60歳台, 男性 円形無気肺

A~C: 左胸水と臓側胸膜に接する腫瘤影を認める. 肺野条件では周囲の血管を巻き込む“comet tail sign”(A: O印内), 腫瘤基部の気管支透亮像を認める(A: →). 単純CT(B)では比較的均一な吸収値を示し, 造影CTでも内部は比較的均一に造影されるが, 臓側胸膜の折れ込みを疑う帯状の造影不良域(C: →)も認められる.

A 単純X線写真



B 単純CT



C 単純CT

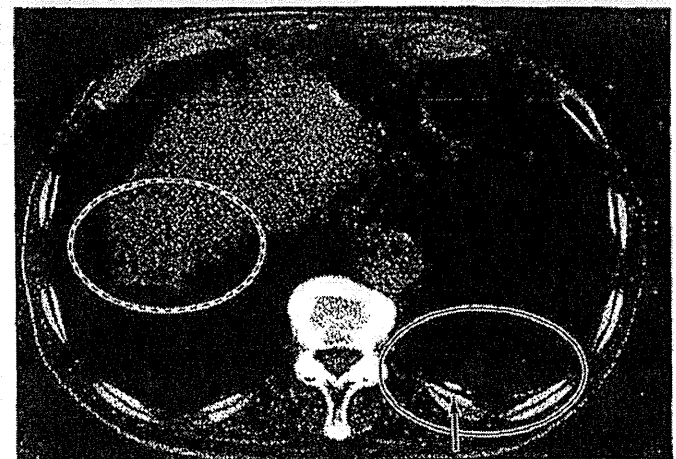


図4 70歳台, 男性 石灰化を伴わない胸膜プラーク(典型例)

A: 両側中下肺肋骨内側, 横隔膜面に典型的な胸膜プラーク像を認める(→).

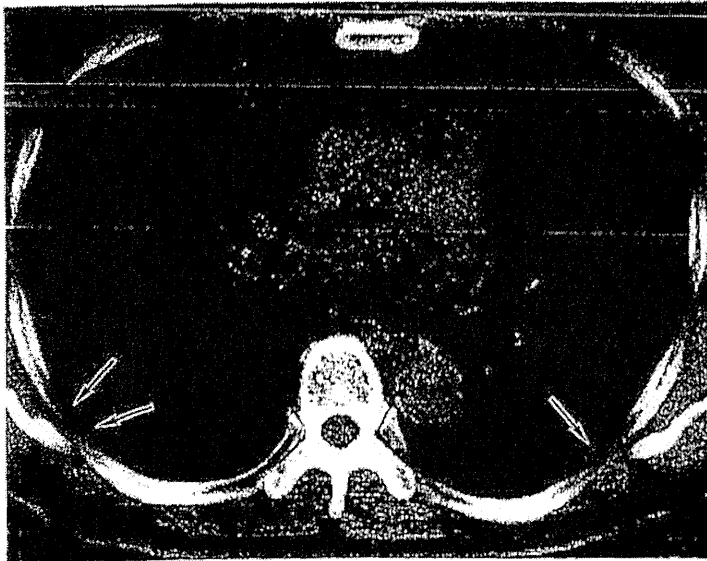
B, C: 両側中下肺背側から内側, 外側前方部に限局性板状の胸膜肥厚を認め, 典型的胸膜プラークのCT所見である(O印). 横隔膜面のプラークも典型的である(○印内). 一部わずかに石灰化を伴っている(C: →).

部や横隔膜ドーム部に凹凸不整や板状石灰化を呈する典型的な高度胸膜プラーク症例(図4-A)の診断は容易であるが, 検出率が示すように胸部単純X線写真のみでの診断は難しい. よって, 現在では胸膜プ

ラークの有無を正確に診断するためには胸部CTが必要不可欠である.

胸部CTではプラークは限局的な板状胸膜肥厚として描出される(図4-B). その厚さや形状に明確な

A 単純CT



B 単純CT



図5 60歳台, 男性 胸膜ブランク(薄い症例)

A, B: わずかに限局的な板状胸膜肥厚を認め(→), 軽度のブランクの所見である。

単純CT

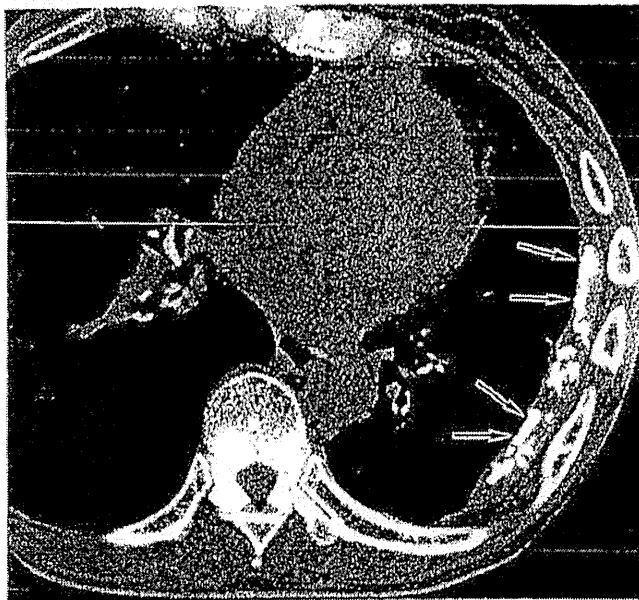


図6 70歳台, 女性 陳旧性結核性胸膜炎

左肺に片側性の胸膜肥厚を認め, 一部石灰化を伴っている。石灰化は散在して認められるが, 臓側胸膜側に沿うような石灰化の所見が認められる(→)。

単純CT

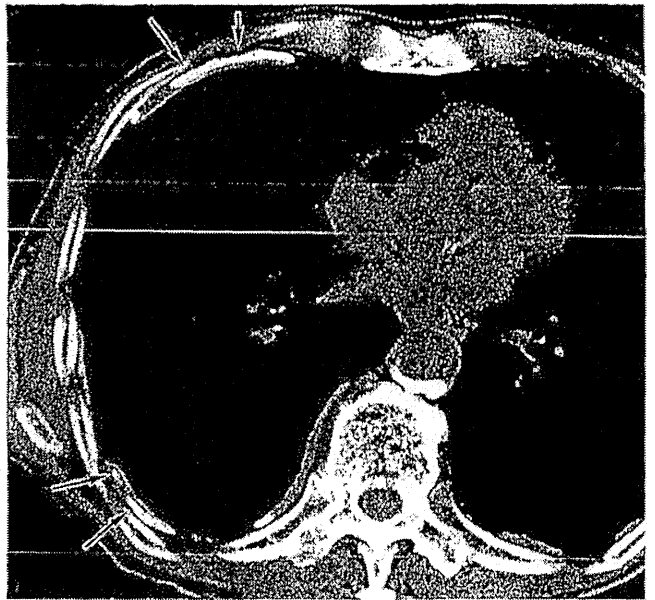


図7 70歳台, 男性 石灰化胸膜ブランク(軽度)

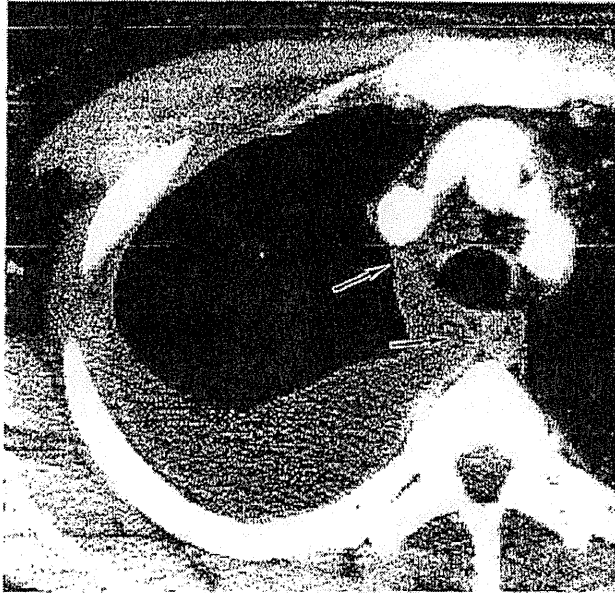
両側胸膜に板状の胸膜肥厚を複数認め, 多発胸膜ブランクの所見である。一部石灰化を伴っている。全層にわたる石灰化も認めるが, 図6の陳旧性結核性胸膜炎と異なり, 壁側胸膜側に石灰化を認める(→)。

定義はない。CTでの検出率は85%程度とされており¹⁶⁾, 2~3mm以上の厚みをもった病変であれば明瞭に描出可能であり, CTのみで診断可能である。ただし, 厚みが1~2mm以下のような薄いブランク症例(図5)では診断に迷うことも多い。胸膜ブランク様の所見を呈する偽病変として, 胸膜下脂肪層¹⁷⁾, 肋間静脈, 胸膜直下の肺病変などに注意する必要が

ある。

その他に石灰化胸膜ブランクとの鑑別を必要とする病変として, 陳旧性結核をはじめとした炎症性胸膜肥厚がある。鑑別点として, 結核性胸膜肥厚は通常片側性で比較的広範な肥厚であり, 石灰化が臓側胸膜側に生じる(図6)。これに対し胸膜ブランクの石灰化は厚さの薄い病変では全層にわたるが, 厚み

A 7月(受診時)の造影CT



B 12月の造影CT

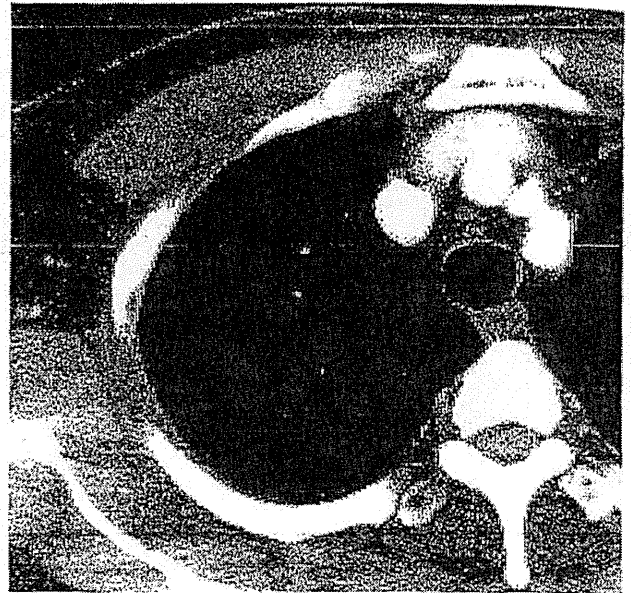


図8 60歳台, 男性 良性石綿胸水

A, B: 7月の胸部造影CT(A)では, 右胸水を認めるが, 12月の造影CT(B)では胸水は消失している。縦隔側胸膜に軽度の肥厚所見を認め(A: →)。中皮腫初期病変の除外も必要であるが, 12月の造影CTではこれも消失している。

のある症例では部分的に生じることがあり, その場合, 壁側胸膜側に石灰化を来すことが多い¹⁷⁾(図7)。

また, 最初にも述べたが, ブラークの数や大きさにかなり左右差がある症例, さらには完全に片側性の症例, 葉間胸膜にブラークを認める症例も, 頻度としては少ないが存在することを念頭に置いておく必要がある。

7 良性石綿胸水

(benign pleural effusion)¹⁸⁾(図8)

良性石綿胸水とは, 1) 石綿曝露歴があること, 2) 胸部単純X線写真あるいは胸水穿刺で胸水の存在が確認されること, 3) 石綿曝露以外に胸水の原因がないこと, 4) 胸水確認後3年以内に悪性腫瘍を認めないこと, という4項目を満たす疾患をいう。本疾患の診断は通常除外診断により, 確定診断には3年間の経過観察が必要ということになる。したがって, 画像診断の果たす役割は, 胸水自体の存在の有無とその消長の経過観察, 胸水を生じるその他の原因疾患(特に悪性病変)の除外である。具体的には, 石綿曝露歴があることが診断項目となっているので, 胸膜ブラークの有無の診断, 中皮腫, 肺癌(癌性胸膜炎)合併の除外が必要となる。

8 びまん性胸膜肥厚

(diffuse pleural thickening)¹⁹⁾(図9)

円形無気肺同様に, 良性石綿胸水に引き続き起こることが多いが, 石綿曝露以外の様々な胸膜炎後に生じる可能性がある。びまん性胸膜肥厚の定義は次のごとくで, 広範囲で肺の1葉以上を巻き込むような胸膜の線維化(臓側胸膜の病変で, 壁側胸膜との癒着を来す)である。以前は胸膜肥厚の厚さが5 mm以上とされたが, 最近はその程度を問わなくなった。胸膜肥厚の範囲が一侧の場合は片側胸郭全体の1/2以上, 両側の場合は左右それぞれ1/4を超えるものを指す。また, 石綿曝露以外でも発生するため, 職業性石綿曝露歴が明確であることを必要とする。

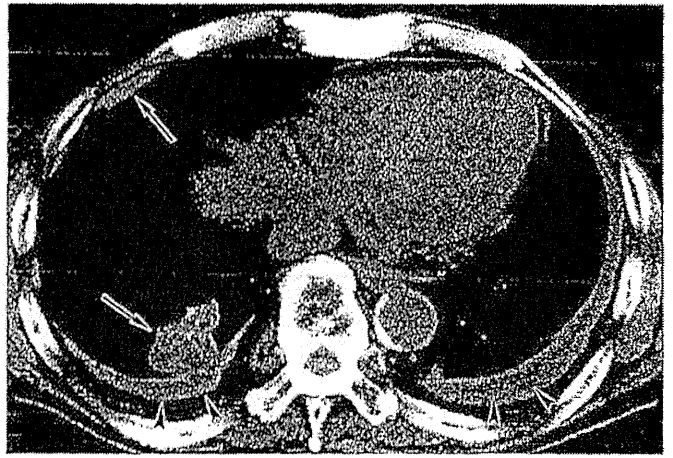
胸部単純X線写真では, 側胸壁内側の比較的滑らかな厚みのある濃度上昇としてとらえられ, 胸膜癒着を伴うので大多数において, 肋骨横隔膜角の鈍化が見られる。胸膜ブラークのみの症例ではこの肋骨横隔膜角が保たれることが多く, 肋骨横隔膜角の鈍化の存在は, びまん性胸膜肥厚合併を疑う所見となる。ただし, 胸部単純X線写真のみでは胸膜肥厚の正確な範囲を同定することは難しく, 診断には胸部CTを必要とすることが多い。胸部CTではブラークのように限局した板状の胸膜肥厚ではなく, 連続し

A 単純X線写真

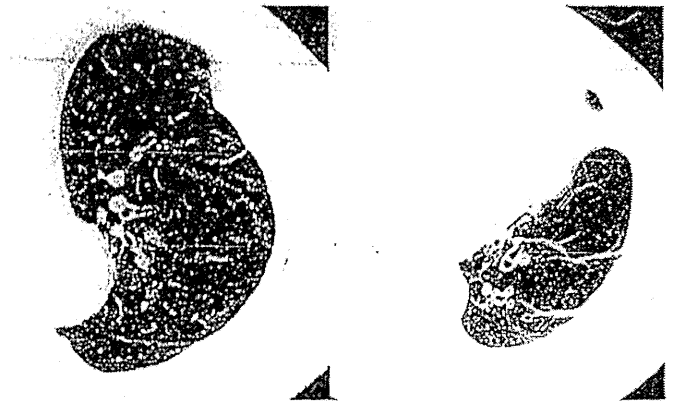


図9 70歳台, 男性 びまん性胸膜肥厚
 A: 左側に肋骨横隔膜角の鈍化を認め, 左胸郭の1/2を超える広範囲胸膜肥厚を伴っている。
 B: 左肺優位に広範な胸膜肥厚を認め, 左側では左胸郭の1/2を超えるような範囲に広がっている。両側ともに少量の器質化した被包化胸水を伴っている(←)。また, 右側では円形無気肺と胸膜ブランクも認める(→)。
 C: 胸膜と直交するような線状影が上肺～肺底部まで多発しており, 広範囲胸膜癒着の所見と考えられる。

B 単純CT(縦隔条件, 5mm厚)



C HRCT(肺野条件, 2mm厚)



た広範な胸膜の肥厚像を認め, 同時に末梢肺との癒着性変化を伴っている。びまん性胸膜肥厚による呼吸機能低下の主体は拘束性換気障害であり, 広範な末梢肺と臓側胸膜の癒着が主たる原因になっていると考えられる。

9 胸膜中皮腫 (pleural mesothelioma)

中皮腫は胸膜, 心膜, 腹膜, 精巣鞘膜などに生じ, 胸膜発生の頻度が最も多い。80~90%程度以上がアスベスト曝露によるものとされている。低濃度曝露でも生じ, 曝露後40年程度経て発症することが多いが, 10年程度で発症する例もある。予後は非常に悪く, 生存期間は上皮型中皮腫は12か月, 肉腫型は6か月程度で, 2年生存率が30%程度である²⁰⁾。中皮腫も肺癌同様, 従来の労災対象者以外も環境省の石綿救済法にて救済給付を受けられることになったが, プラークや肺線維化の所見を必要とする肺癌と

は異なり, 中皮腫の場合は中皮腫であるという診断が正確であると担保されれば, 救済対象となる。

画像診断には, 胸部単純X線写真, CTが主に用いられ, MRIやFDG-PETも時に用いられる。

胸部単純X線写真での典型像は, 片側性の胸水, 胸膜の結節, 腫瘤, 凹凸不整像を示す片側性のびまん性胸膜肥厚像である(図10-A)。75%以上の症例で胸水を伴うが, 胸水を認めない症例も存在する²¹⁾。

胸膜中皮腫の典型的CT所見は, 片側性胸水, 広範なびまん性の不整結節状胸膜肥厚像で, 進行例では病変は肺を環状に取り巻き, 葉間胸膜にも進展し, 不整な葉間胸膜肥厚像や腫瘤を形成する(図10-B, C)。進行しても胸水を認めない症例や, 部分的に胸壁への高度浸潤を伴う腫瘤を形成するような症例もある(図11)。また, 限局した胸膜肥厚を来すような症例の場合, 病初期には胸膜ブランクと鑑別が難しい場合もある。限局的な胸膜中皮腫病変の場合, 胸

A 単純X線写真

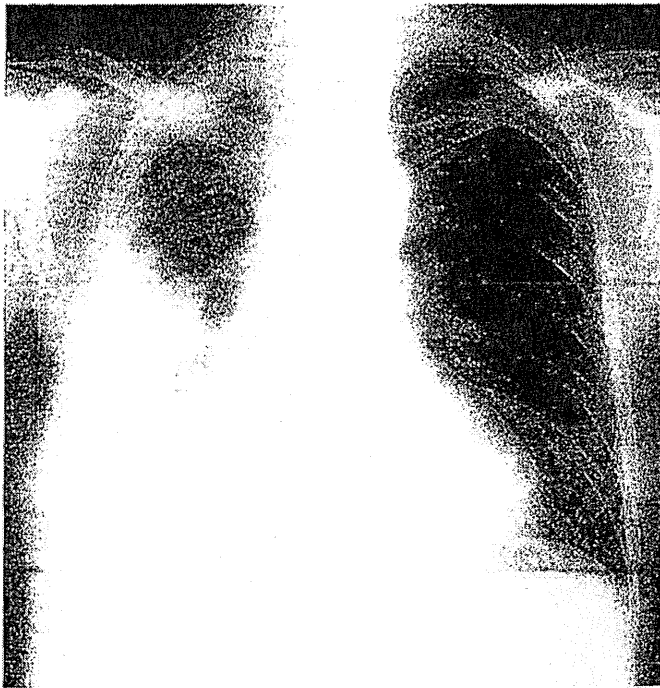
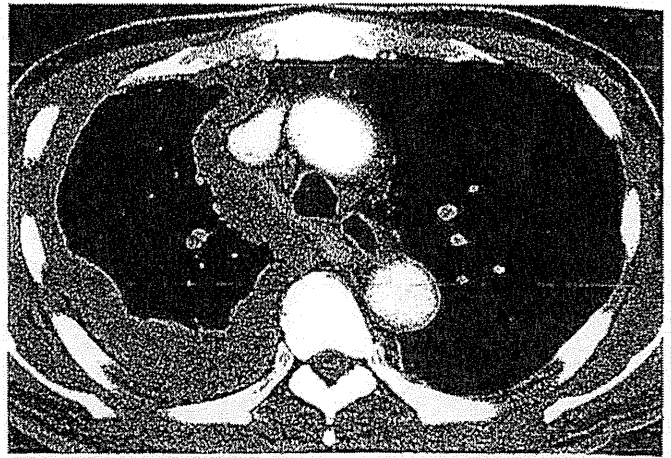


図10 60歳台, 男性 悪性胸膜中皮腫

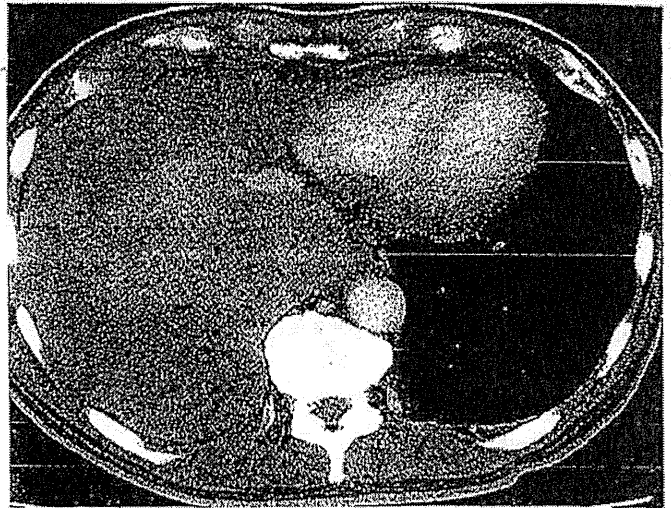
A: 右側に胸水を伴うびまん性不整胸膜肥厚の所見を認め、肺野には明らかな腫瘤形成は認めない。典型的な進行した悪性胸膜中皮腫の所見である。

B, C: びまん性の胸膜不整肥厚を認め、胸水を伴っている。典型的な進行した悪性胸膜中皮腫のCT所見である。

B 造影CT(縦隔条件)



C 造影CT(縦隔条件)



膜ブランクよりも表面が不整で、厚みの程度が大きく、左右差を認めることが多い。さらに、画像上の鑑別点としては、中皮腫には造影効果を認め、胸膜ブランクには造影効果を認めないということがあり、造影CT・MRIが有用である²²⁾。

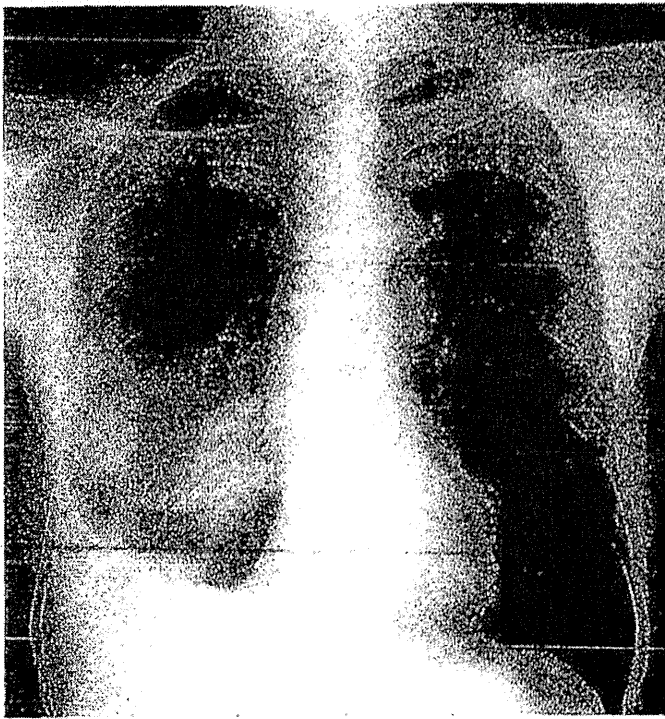
中皮腫の典型的MRIは、形態所見としてはCTと同様のびまん性の不整結節状胸膜肥厚や腫瘤形成であり、内部信号はT1強調像では、胸壁筋肉よりもやや高信号を呈し、T2強調像では筋肉に比べて中等度の高信号を呈することが多い²³⁾。

MRIではCTよりも軟部組織の分解能が高いことから、胸壁や胸内筋膜への局所浸潤と経横隔膜進展の評価に優れている。また、矢状断像は、上下の病状進展の評価に有用であり、横隔膜を越えての腹膜進展などにはMRIによる検査が不可欠である²³⁾とされてきたが、近年はMDCTの再構成画像も有用である。

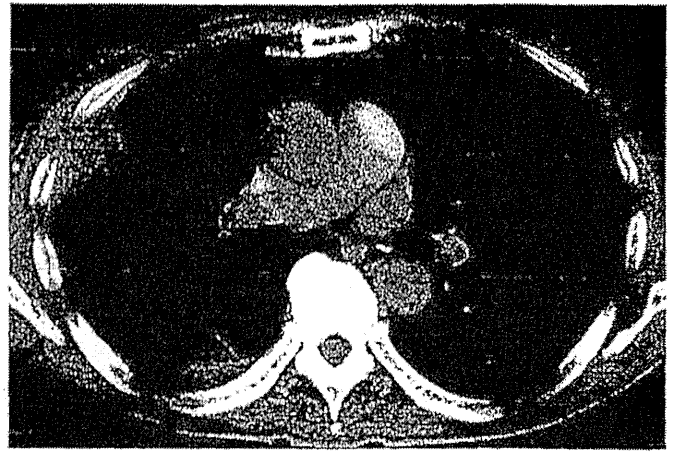
FDG-PETはリンパ節転移を含む胸腔外への遠隔転移の早期診断に有用であるのみならず、良性胸膜病変との鑑別に有用であり、感度は88.2~91%で、特異度は92.9~100%とするような報告もある²⁴⁾²⁵⁾。しかし、FDG-PETの中皮腫への応用はまだ歴史が浅く、塵肺症や陳旧性結核症例でのリンパ節のように偽陽性を示す場合も少なくないとされる。また、ごく初期の胸膜肥厚が画像上とらえられないような症例への有効性には疑問があり、今後症例を重ねて検討していく必要があると考える。

これらの中皮腫の画像所見は、癌性胸膜炎の画像診断とはほぼ同様である。癌性胸膜炎の画像診断では、胸膜に播種による不整像があるかどうか注目するが、中皮腫の診断においても同様である。ただ、中皮腫の画像診断において、異常所見の頻度が高く、比較的初期から病変をとらえやすく注意すべきなのが縦隔側の胸膜不整である(図12)。中皮腫の多く

A 単純X線写真



B 造影CT



C 造影T1強調像

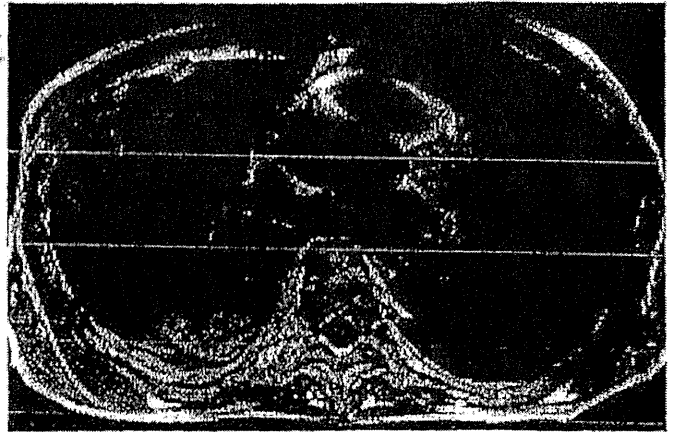


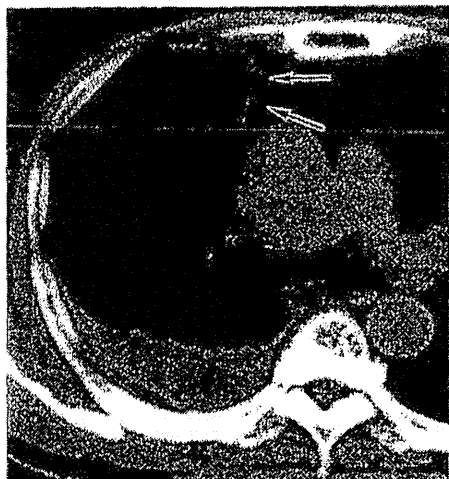
図11 70歳台, 男性 悪性胸膜中皮腫(2相型)

A: 右側胸部に腫瘤影を認め, 胸膜肥厚の所見も伴っている. 右被包化胸水により肋骨横隔膜角は鈍化し, 右下肺の透過性は低下している.

B: 右胸壁に深く浸潤する腫瘤を認め, その前側にも小結節状の播種性腫瘤を認める.

C: 右胸壁への腫瘍浸潤がCTに比し明瞭に描出されている. 右背側の腫瘤は慢性膿胸で腫瘍ではない.

A 3月(受診時)の単純CT



B 7月の造影CT



C 10月の造影CT



図12 70歳台, 男性 悪性胸膜中皮腫

A: 原因不明の右胸水で受診時. 前縦隔付近の右胸膜にわずかに不整肥厚を認める(→). 右胸水を認め, 胸膜にも軽度不整を伴っている. 背側の胸水貯留部の胸膜肥厚は非特異的で評価しづらいが, 前縦隔部の胸膜付近には胸水が貯留することが少なく, 通常炎症性変化では肥厚を起こしにくい場所である. また, 胸膜外には脂肪織しかなく, その不整の評価がしやすい部位でもあり, 中皮腫の診断において注意しておくべき部位である.

B, C: 7月(B), 10月(C)と時間の経過とともに病変の進行は明らかである(→).