

以下に掲げる日本語版論文は前記鈴木康之亮意見書の立論の要諦をなす研究論文である。これらは四国電力の火力発電所で働いていた上甲一郎さんの亡くなった原因が悪性中皮腫であることを原告側が指摘し、裁判所に訴え、証明する必要の中から産まれたもう一つの成果である。また、全国の沢山の医師や関係者の無私の翻訳作業の賜でもある。これらの論文群は鈴木意見書と表裏一体をなすものであり、またなによりアスベスト被災で苦しむ人の実態を掴む上で貴重な資料となるものであることから収録した。なお翻訳論文中に掲載されている図・写真は割愛した。同じく参考文献も省略した。

## II 鈴木康之亮意見書添付資料Ⅲ「参考文献」翻訳

1. 悪性中皮腫の病理診断に関するもの

論評『精巣鞘膜の悪性中皮腫の新しいケース』(1)

K. Sheibani

西部医療センター、南カリフォルニア大学（カリフォルニア・アメリカ）

C. Winberg

セントジョセフ医療センター（カリフォルニア・アメリカ）

pp. 404-405

悪性中皮腫は数少ないものであるにもかかわらず、この新生物はアスベスト曝露との関係で最近不釣り合いな注目をあびている。この問題のなかで、Mochとその共同研究者は、精巣鞘膜を含む悪性中皮腫のめずらしい形態を述べている。内皮系と中皮系の細胞を区別するために作られた抗体の一式（panel）を利用して、この研究者たちは、彼らの患者の新生物が内皮系由来というよりも中皮系のものであると明確に論証している。

伝統的に中皮腫の診断は形態学的な判定基準に基づいていた。これらの組織学的判定基準は中皮腫と他の組織学的によく似た新生物との区別についてはよく述べられているが、特に胸膜を含む腺癌との区別は不可能ではないにしても、補助的な検査室実験なしでは非常に難しい。臨床的な新生物の存在と位置はよく間違われやすい。未知あるいは既知の原発巣よりの腺癌は胸膜に転移することもあり、そして、原発性の末梢肺腺癌は胸膜に発生した中皮腫と放射線学的にも臨床的にも区別不可能な特徴を表わす。同様に、組織化学的そして電子顕微鏡的検査が役に立つかも知れないが、それらも決して診断のディレンマをはっきりと解決するわけではない。

われわれやまた他の人たちも、最近、悪性中皮腫の診断に対する免疫学的アプローチの意義について論証した研究を発表している。われわれの検査室で行われた形態学的にも臨床的にも悪性中皮腫の特徴をよくそなえている500例を越す症例の免疫組織化学的評価にもとづいて、数多くの癌胎児性抗原や中間径フィラメントやレクチン、粘液物質に対するポリクローナルやモノクローナル抗体の中で、

Leu-M1 (CD-15) と CEA と Ber-EP4 のモノクローナル抗体が癌から中皮腫の上皮性サブタイプを区別するのに最も有効であることを発見した。

われわれの検査室からの最近のいくつかの報告の中で、われわれは、Leu-M1抗体の中皮腫に対する診断意義の当初の観察について確信を得た。これらの観察は、他のグループによってなされた研究結果でも実証されている。最初の報告以来われわれは、Leu-M1を中皮腫の診断のルーチーン検査の一部として用いてきた。しかしながら、次のことは強調されておかねばならない。つまり、その特異性にもかかわらず、Leu-M1は新生物のなかで通常局的に存在しており、もし、組織サンプルが小さいと陽性にならないことがあり、その新生物がLeu-M1陰性とのまちがった解釈をされることになりかねないということである。Leu-M1の染色もまた、偽陽性の間違いの原因になる。なぜならば、骨髄系の細胞はLeu-M1に免疫反応性があり、悪性中皮腫細胞に貪食された多形核白血球の染色は真陽性の免疫反応に似染色反応を起こすことがある。この現象は、新生物の壊死領域で起り、間違った判断をしないように気をつけなければならない。

Ber-EP4抗体もまた、免疫診断にルーチーンに用いられる有用な因子である。この抗体は、最初に乳癌細胞から得た細胞とマウスの免疫法により作られた。われわれは最近、Ber-EP4の出現の意義について、癌や中皮腫の一連の研究で評価した。そして、この抗原は、腺癌の80%以上において出現することがわかった。その反対に、中皮腫では、115例の中でほとんど陰性であった。最近の文献で、散発的な中皮腫例でこの抗原のきわめてfocalな出現例の報告があるが、われわれは200例以上の中皮腫を調べた結果、どの例にもBer-EP4反応は陽性にならなかった。それゆえ、われわれの経験では、Ber-EP4は有用な腫瘍マーカーであり、この抗体は中皮腫の免疫診断の中に含まれるべきである。Leu-M1と同様に、Ber-EP4も固定された組織切片に対してルーチーンに採用できるものである。

中皮腫の研究でよく使用される因子の中に、CEA関連抗原がある。最近の文献の多くは、中皮腫ではCEAは陰性であると報告しているが、また、いくつかの研究では陽性と報告しているものもある。われわれの研究では、抗CEAモノクローナル抗体を用いて、その結果中皮腫細胞による免疫反応は認められなかった。新生物の中にCEA抗原の存在を報告している研究は、ポリクローナル抗CEA抗体を

使っている。多くのポリクローナル抗CEA抗体と非特異的交差抗原との交差反応のために、非特異的と判断されるべき偽陽性反応が起こる。われわれの経験では、大多数の腺癌におけるCEA関連抗原の出現と中皮腫における非出現は価値ある鑑別の指標となる。

サイトケラチン抗体もまた中皮腫の診断によく用いられる。中皮腫の3つの主なサブタイプのすべてが、広域スペクトラムのサイトケラチンモノクローナル抗体に反応する。最近のいくつかの研究では、癌に関連するサイトケラチンの分子量と中皮腫に関連するサイトケラチンの分子量は違っていることを示唆しており、この違いは両者の鑑別に使うことができるだろう。しかしながら、われわれの経験では、抗サイトケラチン抗体は、一般的に中皮腫と癌との鑑別には有意義ではない。両方の新生物は、どちらも基本的によく似た免疫パターンの低分子または高分子のケラチンを出現させる。他方、ケラチンは、中皮腫の肉腫型と偽肉腫纖維性胸膜反応または軟部肉腫との鑑別に役立つ。肉腫性中皮腫は、適切に処理された切片において、抗ケラチンモノクローナル抗体に高度の免疫反応をしめす。反対に、軟部肉腫は、まれな例外を除いて、抗ケラチン抗体に陽性の反応は示さない。少ない数の平滑筋肉腫と滑膜肉腫が抗ケラチン抗体に陽性の反応を示すが、この反応は一般的に弱くて局所的である。

その他の多くの抗体が中皮腫の評価に利用できる。これらの抗体の中で、抗ヒト乳脂肪小葉抗体、B72.3、44-3A6、ビメンチンなどがある。そして同様に、最近みつかったK-1モノクローナル抗体がある。これは上皮系中皮腫に特異的な反応を示すものである。後者の抗体に関するデータは有望ではあるが、しかし、技術的に新鮮凍結組織切片にかぎられており、パラフィン固定した組織切片にはできない。

数多くのモノクローナル抗体の利用可能性にもかかわらず、中皮腫の免疫的診断は、除外診断のひとつにしかすぎない。なぜならば、どの抗体も、中皮腫に対して陽性であることが決定的なものではないからである。最近、抗中皮腫モノクローナル抗体が、非中皮腫性悪性腫瘍と様々な程度の交差反応を示すことが論証されている。

最後に、最近の研究は、DNA倍数性分析や細胞周期分析が、診断が組織化学や免疫組織化学や電子顕微鏡を用いてもはっきりしない場合に有用であるかも知れ

ないことを示している。実験的研究はまだ進歩中であり、その進歩は、悪性中皮腫の細胞遺伝異常や癌遺伝子の発現の潜在的な診断学的意義について評価することになるだろう。

## 論評『精巣鞘膜の悪性中皮腫の新しいケース』(2)

A. Sato

東京大学医学部病理学部（日本）

pp.406-407

精巣鞘膜の悪性中皮腫はまれな腫瘍であり、その診断は、通常臨床的にも病理学的にも難しいものである。臨床的には、それは一般的に片側性の陰嚢内の塊として認められる。良性の過形成でも類腺腫腫瘍（adenomatoid tumor）でも陰嚢水腫が進んだ場合、水腫液の化学分析や細胞学的検査を含む術前の検査は基本である。この場合、細胞検査を繰り返しても陰性となる。しかしながら、われわれの経験では、水腫液の検査をさらに進めると診断を変えざるを得なくなることがある。それゆえ、このケースの診断は再吟味が勧められる。

悪性中皮腫の細胞学的特徴は、原発部位や病気の大きさの違いにかかわらず同じである。1962年、Klempmanは、最初に悪性中皮腫の分化型と未分化型の細胞学的特徴について述べている。前者は、悪性の基準を満たしていながらも、中皮細胞の特徴を保持している。後者は、増殖しつつある中皮細胞に似ている。彼は、これらの中皮腫細胞を3つのパターンに分けている。(1) 大型または中型の分化型と未分化型の悪性中皮腫細胞の混合型、(2) 中型または小型の分化型と未分化型の中皮腫細胞をともなった不定型な中皮細胞の多量の脱落型、(3) 小型の未分化中皮腫細胞のみのグループ、である。われわれのケースでは、中型から大型の腫瘍細胞（直径で20ないし $50\mu\text{m}$ だが）は、3次元的な細胞の塊をつくっている。さらに、非定型的中皮腫細胞はそれと同じ腫瘍細胞を含んでいる。孤立した球形の腫瘍細胞の細胞質はほんやりと染色された境界域とともに明るい緑色をしている。いくつかの腫瘍細胞は湾曲した多形核を有している。核小体が優勢を占めている。

これらの非定型的中皮腫細胞は反応性のものであり、切除された腫瘍の中に組織学的に確認できる。細胞化学的、免疫細胞化学的、分子生物学的探索は、中皮腫細胞を腺癌や反応性のものから鑑別するのにさらに役立つ。

中皮性の増殖の組織学的相違のポイントは以下のとおりである。(i) 反応性あるいは良性のものがあるいは悪性なのか、(ii) もし悪性であれば、中皮由来のものか腺癌なのかである。以下の特異的な所見は重要である。(1) 外科標本における鞘膜の上皮内の変化と浸潤性の成長をする腫瘍細胞、(2) 他の部位に腺癌が存在していないこと、(3) 細胞化学的に腫瘍細胞の細胞内外にヒアルロン酸が陽性であること。腺癌と違って、細胞質にPAS陽性グリコーゲンが存在しているにもかかわらず、そのムチンはPAS染色に染まらないこと。レチクリン染色は、細胞間に様々な量のレチクリン纖維物質が存在していることを示す。(4) 電顕的には細くて長い豊富な微絨毛を持つ腫瘍細胞は蓋がはびこったような外観を呈する。(5) 免疫組織化学的所見が中皮腫と一致し、腺癌とは異なること。

この論文では、組織学的所見が非常に短く述べられている、特に鞘膜の上皮内変化について不明確である。いくつかの肉眼的、顕微鏡的写真が必要だろう。また、腫瘍細胞内において、グリコーゲンが陽性か否かもはっきりとさせるべきだろう。ヒアルロン酸は一般的に水に溶けやすく、ホルマリン固定された材料では考慮すべき量が失われているかもしれない。それは細胞質空胞内や小管状構造に蓄積しやすく、分解されることはまれである。中皮腫細胞は、ヒアルロン酸もしくはコンドロイチン硫酸を有しており、両方ともに精巣内のヒアルロニダーゼによって分解される。

悪性中皮腫の診断の難しさは、多くの免疫組織化学的研究において示されている。基本的には、中皮腫のみに反応して腺癌には反応しない、あるいは、その逆の高度に特異的な抗体が検査に用いられるべきだということは強調されておかねばならない。しかしながら、これらの抗体は、悪性中皮腫と良性の中皮細胞の反応性の増殖との鑑別には有用ではない。どの抗体も、完全な感度と特異度を提供できないから、パラフィン固定された組織標本に作用するモノクローナル抗体の一式 (panel) が使用される。いくつかの例外を除いて、悪性中皮腫は高低両方の分子量のサイトケラチンに対して細胞質が陽性に染色される。しかし、癌胎児性

抗原やLeu-M1には陰性である。さらに多くの場合において、HMFG-2やEMAが陽性であり、ビメンチンも証拠となりうる。R72.3、Ber-EP4、44-3A6は陰性である。中皮腫細胞には反応して、腺癌には反応しない抗体の同定は、確定診断に最も重要な。最近、中皮腫関連抗原の抗体が開発されつつある。しかしながら、それらはまだ一般的には用いられてはいない。結果も必ずしも一致しないこともある。腫瘍細胞との免疫反応でつくられた抗体は、どの抗原を認識しているのかはつきりしていない。肺の小細胞癌との反応で作られたモノクローナル抗体のBMA-120は、分子量200kdの抗原を認識するが、その機能も構造もいまだ不明である。研究者は、BMA-120抗原は中皮腫細胞と同様に、内皮細胞でも出現すると報告している。この論文は、BMA-120が腹膜や胸膜の中皮腫だけでなく、精巣鞘膜の中皮腫とも免疫反応すると報告した最初の論文である。

同様に、THROMBOMODULIN (TM) もまた、内皮細胞と中皮細胞の両方に免疫反応を示す。TMはトロンピンのレセプターであり、トロンピンを変換することによって潜在的な抗凝固作用を持つが、血管内皮細胞や胎盤の合胞体栄養細胞やメガカリオサイトや血小板の表面に血液凝固をコントロールするために存在している。最近、TMは、偏平上皮細胞や血管以外の体腔の表面（中皮細胞、滑膜、クモ膜）にも存在が認められている。さらに、中皮腫にもまた出現する。中皮細胞でのTMの機能は、いまだにわかつてはいない。おそらく、それは病的な浸出物とともになう条件のもとでの体腔の表面の癒着を防ぐためではないかと思われる。

類腺腫腫瘍は、生殖管に遍在する良性の新生生物である。男性では、それは副睾丸や精巣膜や精索に最もよくある腫瘍である。それは通常はルーチーン検査の際や他の原因による外科手術の際や剖検の際にたまたま見つかるが、ときどき臨床的に陰嚢水腫をともなわない小さな硬い塊として認められることもある。それはよく周囲と境界されており、そして、まれに隣接する精巣を含むこともある。組織学的には、その腫瘍は様々な構造上のパターンをもっている。太った細胞の充実性の細胞索から管腔や血管構造によく似た扁平または立方形の細胞からなる線腔様の空間まで様々である。

類腺腫腫瘍という用語は、1945年にGolderとAshによって造られた描写的なあいまいな用語である。彼らは、上皮細胞の並ぶ腺構造によく似た15の腫瘍のケース

を報告している。しかし、その腺構造の起源については考察していない。その組織形成はいろいろなところから起こるといわれている。ミューラー管あるいは中皮由来のものなどである。最近、中皮細胞の由来については一般的に承認が得られている。その根拠は、(1) いくつかのケースに見られるように、表面中皮細胞から直接由来している。(2) 組織化学的には、その腺腔はヒアルロン酸と結合した酸性のムコ多糖を含んでいる。(3) 電顕では、腫瘍細胞は際だった微絨毛やデスマゾームやトノフィラメントを有している。(4) 免疫組織化学的には、その細胞はサイトケラチンやEMAに染まるがCEAや第8因子関連抗原やUlex europeus antibodies I lectinには染まらない。さらに、この論文では、腫瘍細胞がBMA-120に陽性に染色されることを明らかにしており、それはまた中皮細胞由来であることを示唆している。同様にわれわれは、TMが類腺腫腫瘍の膜を染色することを最初に発見した。

しかしながら、組織学的に類腺腫腫瘍に似ている血管性腫瘍についてもまた記しておかねばならない。電子顕微鏡では、それは多層の基底板とWeibel-Palade小体を持っている。免疫組織化学的には、腫瘍細胞はビメンチンや第8因子関連抗原やUlexeuropues I lectinに反応するが、サイトケラチンやEMA (epithelial membrane antigen) には反応しない。この類腺腫腫瘍に似た血管性腫瘍に適切な名前をつけるのは難しい。何人かの学者は、それを類腺腫腫瘍の血管型と表現しているが、われわれは混乱を避けるために「血管腫 (hemangioma)」と呼び、類腺腫腫瘍を中皮由来のものと決めている。われわれが類腺腫腫瘍様の血管性腫瘍を組織球様血管腫 (histiocytoid hemangioma) あるいは類上皮血管内皮腫 (epithelioid hemangioendothelioma) あるいは血管腫の他のタイプと呼ぼうが、さらなる研究の積み重ねが、その臨床像や予後を明らかにするために必要である。

\*以下の図が添付されている。

図1.a) : 陰嚢水腫の吸引した細胞診では中皮腫細胞の三次元的な塊が見られる。

b) : 遊離した大型中皮腫細胞の高倍率像 (パパニコロ染色 a. $\times 200$ 、b. $\times 400$ )

図2 thrombomodulinに陽性反応を示す悪性中皮腫 (免疫染色  $\times 300$ )

図3 thrombomodulinに陽性反応を示す類腺腫腫瘍 (免疫染色  $\times 132$ )

## 『悪性中皮腫の診断における免疫病理学の増大する役割』

K. Sheibani

西部メディカルセンター、南カリフォルニア大学（ロサンゼルス・アメリカ）

Human Pathology, Vol.28, No.6 June, pp. 404-405

近年の腫瘍生物学における見事な進歩にもかかわらず、病因論や診断、治療の見地からすると悪性中皮腫は不可解な疾病のままである。さらに、絶え間なく増加する数の抗体やより新しい分子生物学的、細胞遺伝学的技術にもかかわらず、細胞やそれに関連する腫瘍の特異的なマーカーはない。特に、多くの良性及び悪性の類似物から悪性中皮腫を区別することはいまだに頭を悩ませる問題である。熟練した病理学者にとって悪性中皮腫の診断は、多くの形態学的変種があるからだけでなく、その疾患がまれであるため、各々の病理学者はわずかな症例しか見ていないので、困難を引き起こしている。さらに、中皮の表面は、形態学的には悪性中皮腫と似ていることのある転移腺癌を含め、他の悪性腫瘍の関与するありふれた部位である<sup>1-3</sup>。その腫瘍の臨床上の出現もまた誤解を招く恐れがありうる。つまり、原発性の末梢肺腺癌は、既知あるいは未知の原発部位から胸膜への転移性の癌のように、胸膜中皮腫とは鑑別できない放射線学上そして臨床上の特徴を示しうる。それゆえ、最近の研究が悪性中皮腫の診断のための補助的研究、特に免疫病理学的研究の重要性を強調するのは驚くべきことではない。形態学的に類似する腫瘍と中皮腫の鑑別に役立つ、癌関連抗原に反応性のある多くの抗体が現在利用できる。それらの診断上の重要性と応用は最近の刊行物で詳しく論じられている<sup>1-4</sup>。これらの抗体の大多数は一般に上皮由来の腫瘍に共通に存在する抗原と反応する。それゆえ、陰性反応は癌よりも中皮腫であることを支持すると考えられている。中間径フィラメント、ヴィメンチンやサイトケラチンと反応性のある抗体と、Leu-M1、BerEP4、CEA、HMFG-2、B72.3のような上皮性糖タンパクや血液型抗原と反応性のある抗体は、よく使われる試薬のひとつである。わずかにいくつかの抗原で、主な反応性は中皮性由来の腫瘍に付随すると考えられると最近説明されている<sup>3,6-9</sup>。しかし、これらの抗体は、感度が低く、正常組織と同様に良性及び悪性の非中皮腫性腫瘍と種々の程度の交差反応を見せることが示されている<sup>3</sup>。

鑑別診断に癌、悪性黒色腫、肉腫や非ホジキンリンパ腫を含む状況ではわずかひとつか2つの抗体で診断上の問題を確実に解決できるが、中皮腫の免疫病理学的診断は抗体の一式（panel）を必要とする。多くの場合、非常に特徴的な免疫反応性をもついくつかの抗体で十分だろう。抗体の選択をする場合には、感度が高く特異的であるだけでなく、費用面で効果的であるべきである。われわれの経験では、組織標本が十分な量ある場合には、診断用には粘液染色と、広いスペクトルのサイトケラチン、Ber-EP4、Leu-M1、CEAとの反応性を持つ抗体だけで、大多数の例を確実に分類できる<sup>3</sup>。

粘液染色は、中皮腫、特に上皮型の場合に、腺癌と鑑別するのに大変有用である。形態学的特徴が上皮型中皮腫か腺癌に一致する腫瘍での陽性粘液染色は、腺癌を強く支持する。一般には、しかしつねにというわけではないが、粘液陽性の腫瘍もまたひとつ以上の癌関連抗原を発現する。われわれは、陽性の粘液染色と腫瘍細胞による主な癌関連抗原との間の十分な相関関係を認めた<sup>3</sup>。

サイトケラチンは、肉腫型の悪性中皮腫の場合に、悪性の胸膜纖維性腫瘍や胸膜腔の関与する軟部組織肉腫と区別するのに大変有用である。サイトケラチン染色もまた、ケラチン陽性の悪性紡錘細胞を強調することによって、反応性の胸膜纖維症と形態学的に混同しうる纖維形成性の悪性中皮腫を鑑別する上で有用である<sup>1,3</sup>。Leu-M1、BerEP4、CEAに反応性の高いモノクローナル抗体は悪性中皮腫の研究に最もよく使われている免疫学的試薬である<sup>3</sup>。中皮腫と比べ、たいていの腺癌はこれらの抗体と免疫反応性である。一般に、腫瘍性細胞でのLeu-M1、BerEP4、CEAの存在は、中皮腫よりも癌であるとの診断を強く支持する。しかし、ある例では、さらにくわしく特徴を調べるためにには、より多くの抗体が必要とされる。稀れな例では、そのような多くの抗体をもってすら結論的な診断に達することはなく、中皮腫の免疫診断は、中皮細胞に完全に限定される免疫反応性がまだ同定されていないために、いまだに例外のひとつとなっている<sup>3</sup>。

1995年にSolerら<sup>10</sup>は、一連の胸膜悪性中皮腫と肺腺癌でのN-カドヘリンとE-カドヘリンの発現を研究した。すべての中皮腫でのN-カドヘリンの高いレベルの発現とすべての肺腺癌でのE-カドヘリンの発現を彼らは認めた。以前に報告されている上皮由来の細胞と主に反応する抗体の大半と対照的に、N-カドヘリンは悪性中皮

腫との免疫反応性が特異的であるように思われた<sup>10</sup>。報告されたデータは興味深かったが、これらの抗体は新鮮冷凍切片でしか利用することができないために、限られた臨床的応用性しかもたないように思われた<sup>10</sup>。しかし、Human Pathologyのこの号で、Hanらは、本質的に同じ研究者グループとともに、彼らの以前に報告した発見を、今回は組織切片で固定・パラフィン包埋に抵抗力のあるエピトープに明らかに反応するN-カドヘリンとE-カドヘリンに対する抗体を用いて確認し、一連の悪性中皮腫と腺癌に適用している<sup>11</sup>。パラフィンで包埋、固定した組織切片では、悪性中皮腫の診断と後ろ向きの調査研究の両方のために、カドヘリンに特異的な抗体が高い信頼性で使用されうることを、彼らの現在の研究は示唆している。一連の報告は、N-カドヘリン陰性の中皮腫1例と、N-カドヘリンに弱陽性の腺癌1例（この例は、E-カドヘリンに強く染まった）を含むが、N-カドヘリンが中皮細胞に全く感度が高いか、完全に特異的のいずれでもないことを示唆しているのだが、それにも関わらず、これらの抗体は、中皮由来の腫瘍の鑑別診断に有用であるために十分な程度の感度と特異性をもつように思われる。Hanとその同僚によって報告されたデータが期待できるが、より大きな集団の患者で、独立的な研究グループによる確認を彼らは求めている。現在、抗カドヘリン抗体が市販されていないことがそのような独立的な研究を制約しているように思われる。しかし、もしこれらの予備的結果が引き続く研究によって確認されるならば、それらは悪性中皮腫の研究と診断において期待できる飛躍的発見を表わすことになるだろう。

悪性中皮腫の種々の亜型と形態学的にそれらに似ている良性及び悪性腫瘍とのますます正確な鑑別と同様、N-カドヘリンのような各々開発される新しい抗体が中皮細胞や腫瘍の陽性と同定する期待を残している。細胞周期分析とDNA倍数性分析もまた、免疫学的研究が結論的診断を与えないそれらの場合において有効でありうることを最近の研究は示唆している<sup>12</sup>。分子生物学の技術は腫瘍病理学の最近の重要な発展を代表している。

実験的研究は、これらの技術の利用可能性と、中皮腫における癌遺伝子の発現と細胞遺伝学的異常に対する潜在的な診断及び予後上の意義を評価するために進行中である<sup>13</sup>。

われわれに正確な診断上の分類を与え、最善の治療法と予後の決定を助けるよ

うな、中皮腫に利用できる特異的な免疫学的または生物学的マーカーが利用可能になるだろうと期待される。それらのマーカーによって、このいまだ不可解な腫瘍グループとそれらが由来する組織をさらに研究することが可能となるであろう。

## 『悪性中皮腫と転移性癌の鑑別診断における胸膜生検標本での免疫組織科学の価値』

A. Grove and S.M. Paulsen

アールボルグ病院病理研究所（アールボルグ・デンマーク）

M. Gregersen

アーフス大学法医学研究所（デンマーク）

Path. Res. Pract., 190, 1994, pp. 1044-1055

### 要約

今回の研究の目的は、胸膜生検標本で悪性胸膜中皮腫と転移性の胸膜癌の鑑別診断における免疫組織科学の価値を評価することであった。悪性胸膜中皮腫（上皮型と二相型）の系列（総数39例）と転移性胸膜癌の系列（総数25例）を、Ber-EP4とCEAとLeu-MI（CD-15）に対するモノクローナル抗体で検討した。抗体が1つ、2つ、3つの場合を考慮して、悪性胸膜中皮腫（総数39例）と腺癌（総数19例）で最も感度と特異度が高い免疫組織科学のタイプを検出するように、コンピューター分析を行った。CEAとCD-15を指標として複合させた場合が、腫瘍の両カテゴリーを考慮して、最も特異度（悪性胸膜中皮腫で100%、腺癌で82.1%）と感度（悪性胸膜中皮腫で82.1%、腺癌で100%）が高かった。CEAとCD-15双方が単独での陽性の結果は、転移性腺癌の最も良い指標であった。CEAとCD-15双方やBer-EP4とCD-15双方への陰性の結果は、悪性胸膜中皮腫に100%の特異度を示した。剖検において、他の原発部位がなく、肉眼所見で悪性胸膜中皮腫と予め診断されていた9例の腫瘍において、三者のモノクローナル抗体の1つや2つもしくは3つすべてが陽性の所見が示された。（訳者注；9例中の）総数7例で電顎による検討では、1例は明らかに悪性胸膜中皮腫であり、その他の6例でも悪性胸膜中皮腫の診断を覆す結果は得られなかった。この7例で腺癌と思われる微細構造は認められず、PAS/ジアスターへの抵抗性はなく、アミラーゼ他のサーファクタント（訳注；

肺癌の一部で産成される)は認められなかった。Ber-EP4は、悪性胸膜中皮腫の中で、8例に陽性と最も高く検出された。悪性胸膜中皮腫に特異的な抗体が利用できるようになるまで、胸膜の悪性腫瘍の全例の診断を解決するためには、免疫組織化学の手法の限界が考慮されなければならない。

## はじめに

胸膜の腫瘍の大多数は、解剖学的に様々な部位に原発する腺癌の転移か、肺癌からの胸膜への直接浸潤である。いまも稀であるが、悪性胸膜中皮腫の頻度が増加してきている。他の悪性腫瘍と比べしばしば複雑であるため、悪性胸膜中皮腫の診断は困難なことがある。悪性胸膜中皮腫—上皮型や二相型—の最も重要な鑑別診断は、転移性腺癌である。しかし、肺癌(大細胞癌)と低分化の扁平上皮癌の転移もまた鑑別診断に含まれる。

中性ムチンの指標として、ヒアルロン酸と陽性のPASジアスター染色の証明が、以前は悪性胸膜中皮腫と腺癌の診断の特徴として強調されてきた。それ以降、この仮説の例外を証明したのは、わずかの研究しかない。さらに、多くの例で、これらの染色が陰性であっても、これらの悪性疾患の鑑別を行うことはできない。

中皮腫の系列に対して商業的に使用できる特異的な抗体がないことで—多くの癌が陽性に染色される抗体を持っている例外として—、悪性胸膜中皮腫は、多くの癌に特異的な抗体への陰性の反応による除外診断により診断してきた。最もよく使用してきた抗体は、CEA、CD-15、Ber-EP4、B72.3である。

一式(panel)の抗体を使用した免疫組織化学染色が、悪性胸膜中皮腫と腺癌の鑑別診断の重要な手助けとして使用してきた。極めて稀な例外を除き、悪性胸膜中皮腫と癌の免疫組織化学での比較研究は、原発部位の癌の外科的切除標本でのみ実施されたが、多くの例では、悪性胸膜中皮腫と肺の腺癌とのみ免疫組織化学的な比較がなされてきた。

小さい生検標本の使用では、転移性の胸膜癌と悪性胸膜中皮腫の鑑別診断は、多くの場合困難である。われわれの研究の目的は、胸膜生検標本での免疫組織化学での診断の価値の可能性を評価することにある。

## 材料と方法

### 組織標本

1972年1月1日から1991年12月31日までに、われわれの病理研究所に記録された、胸膜生検標本と手術標本と胸腔鏡下生検標本のすべての報告を検討した。悪性胸膜中皮腫の系列に含めた腫瘍は以下の基準を満たすものとした。

- 1) 上皮成分を持つ
- 2) 胸腔鏡及び胸腔切除術で得られた胸膜の生検標本を組織学的研究に使用する
- 3) 死亡時期までの追跡調査
- 4) 剖検で典型的な悪性胸膜中皮腫の顕微鏡所見を呈し、他の原発腫瘍の所見がないこと

転移性胸膜癌に含まれる基準は以下とする。

- 1) 胸腔鏡及び胸腔切除術で得られた胸膜の生検標本を組織学的研究に使用する
- 2a) 細胞学的診断か組織学的診断か手術標本で確認された既存の原発の悪性腫瘍
- 2b) 死亡時まで追跡され剖検により組織学的に診断された原発腫瘍

表1に示したように、悪性胸膜中皮腫（上皮型や二相性）は39例からなる。転移性胸膜癌の系列は25例からなり、簡単に表1に要約した。転移性悪性黒色腫の1例はこの研究から除外した。

全例で、フォルマリン固定やパラフィン包埋組織ブロックを使用した。2つ以上のブロックが使用できるときは、腫瘍組織が大量に得られる2つを選んだ。厚さ5ミクロンの切片は、ヘマトキシリン-エオジン染色と、ジアスターーゼの前処理のないPH2.7によるPAS/アルシアンブルー染色を行った。

### 免疫組織化学

5ミクロンの厚さのパラフィン切片は40度のestiplastで脱パラフィンし、100-70%と段階的に減少させたエタノールで再加水させた。内因性のペルオキシターゼ活性は、30分間、絶対エタノールに0.45%の過酸化水素を添加し、ブロックした最初の抗体のインキュベーション（孵卵）に先立ち、それぞれの切片は37度5分間のプロテアーゼ（Sigma Type X IV Pronase E,0.05%）とマイクロウェーブオープン

の前処理を行った（表2）。切片は表2にリストされている最初のモノクローナル抗体で一晩（16時間）インキュベートされた。すべての抗体は、0.25% Triton X100を添加した1%子牛アルブミンと0.1M pH7.4のPBS（磷酸緩衝食）で希釈された。PBS（0.1M pH7.4、に0.25% Triton X100添加）によるリンス後、切片は30分間室温でbiotinylatedウサギ抗マウス抗体（DAKO、Glostrup、Denmark 1:400希釈）でインキュベートされる。PBSでの追加のリンスの後切片は、Streptavidin（DAKO、Glostrup、Denmark 1:400希釈）とラベルしたペルオキシダーゼで室温でインキュベートされた。免疫ペルオキシダーゼ反応は、3-amino-9-ethylcarbazole（Sigma, St.Louis, Mo., USA）で発色させた。

切片は、Mayerのヘマトキシリントロイド染色で反対染色され、Kaiserのグリセロゲラチンで固定された。

免疫染色の程度は、検査した全スライド中の陽性腫瘍細胞の比率を評価するスコア方法を使用して、半定量的にグレードを決定する。なし；+<10%；++10-50%；+++>50%。染色結果の分析で+、++、+++とスコア化された腫瘍のすべてを陽性と計算した。

選択された9例では、PSPE 10 surfactant（DAKO;1:500希釈 クエン酸ナトリウム中で10分間マイクロウェーブオーブンの前処理）へのモノクローナル抗体と、1万倍希釈の抗ヒト唾液腺アミラーゼウサギポリクローナル抗体で、さらに分析を行った。アミラーゼへの免疫染色は、ジアスターで前処理した切片で実施された。

### 電子顕微鏡

電子顕微鏡のために、小さい腫瘍組織は、2%グルタールアルデヒド0.1M PBS pH7.3中で固定され、オスミウムで後で固定し、標準方法により脱水し、Eponに包埋する。選択された超薄切片は、ウラニルアセテートとクエン酸鉛で染色され、JOELlooB-TR電子顕微鏡で検査される。

選択された7例の腫瘍では、細胞質の中間径フィラメント量と微絨毛の長さ直径比に特に注意して、超微細構造が評価された。中間径フィラメントは、ない場合は0、少数の細胞内にある場合は1、多数の細胞内にある場合は2、多数の細胞内に見られ、少数の細胞では纖維束の凝集が認められた場合は3、多数の細胞内で纖

維束の凝集が認められれば4、と分類した。長さ/直径の比率の平均は最も長い5本及び最も長い10本の微絨毛を測定することによって推定した。

## 結果

転移性悪性腫瘍は、腺癌19例、扁平上皮癌5例、胚細胞腫瘍（セミノーマか胎児性癌）1例であった。腺癌の原発部位は、肺12例、乳房4例、卵巣1例、胃1例、直腸1例である。染色の結果は、表3に要約した。両系統の腫瘍は、低分子サイトケラチン（LMWCK）で染色された。Ber-EP4、CEA、CD-15は、悪性胸膜中皮腫より転移性腫瘍でより多く染色された。腺癌以外でCEAに染色された転移性腫瘍の3例は扁平上皮癌で、陽性反応は角化された細胞に限定されていた。Ber-EP4は、3例の扁平上皮癌と胚細胞腫瘍（セミノーマか胎児性癌）1例で染色された。CD15は、低分化型の扁平上皮癌以外の全腫瘍で陽性であった。

転移性腺癌と悪性胸膜中皮腫の免疫表現型の感度と特異度は、Ber-EP4、CEA、CD-15単独や2種類や3種類それぞれの場合を考慮して、コンピューターで分析された。その結果は、表4や表5に要約している。今までのいくつかの研究結果に基づくと、Ber-EP4、CEA、CD-15をマーカーとする陽性の反応は、それぞれ悪性胸膜中皮腫より腺癌に特異的とされており、後者がより陰性の反応であるとされている。最も免疫の分類が可能なマーカーやマーカーの組み合わせは、感度や特異度が共に高いものである。

剖検での肉眼的な腫瘍の形態によると悪性胸膜中皮腫と診断され、免疫表現型では癌とされた9例は、すべてサーファクタントやヒト唾液アミラーゼは陰性であった。この9例の微細構造と免疫組織化学を複合した分析結果を、表6に示す。

表6の最初（M/51）と2番目の（M/53）の患者の腫瘍の光顕と免疫組織化学と電子顕微鏡所見を、図1から7と図8から14に、それぞれ示した。

## 討論

悪性胸膜中皮腫の、手術時や剖検標本での特徴的な形態は、厚さ数cmに及び、

胸膜表面に浸潤し隣接する肺の実質を様々な程度で浸潤し、圧迫している、びまん性の腫瘍である。

悪性胸膜中皮腫と転移性胸膜癌の鑑別診断における免疫組織科学の目的を評価するには、悪性胸膜中皮腫の診断基準が明確に定義されていることが極めて重要である。結果をかく乱する免疫表現系による誤った概念を防ぐことが緊急の課題である。

今回の研究では、特徴的な肉眼での腫瘍形態をした剖検例を、悪性胸膜中皮腫として診断した。その他に、患者さんが、既往歴においてもしくは剖検において、その他の原発部位の証拠がないことが必要であった。

顕微鏡的には、腫瘍は上皮的か二相的な悪性胸膜中皮腫に合致する形態をとっていた。壊死や肺浸潤や巨細胞の出現頻度やリンパ管症の程度（鑑別診断に関連して強調される特徴）は、考慮しなかった。

免疫染色反応の解釈は、特にひとつの陽性細胞の存在を除外的ににするのかで、困難なであろう。様々な研究でのある抗体の特異度の比較は、ひとつの細胞の染色結果を腫瘍全体が陽性と解釈するのか、一定のカットオフ値を用いるのかで、明確に左右される。

今回の研究では、Ber-EP4が腺癌に対する单一のマーカーとして最も感度が高かった（84.2%）。この結果は他の研究において、腺癌に対して86から100%の陽性所見を呈した報告と合致する。著明に低頻度の染色陽性率（37%）との報告もある。

39例の悪性胸膜中皮腫の内8例（20.1%）が、抗Ber-EP4陽性に染色された。この所見は、上皮型と二相型の悪性胸膜中皮腫に限定したGaffey et alによる32.7%の頻度と合致する。陽性の腫瘍細胞が1%以下の腫瘍を除外すると、悪性胸膜中皮腫の20.4%が陽性に染色された。Ber-EP4の表現が極めて低頻度であること（0-7%）が、他の多くの研究で明らかにされてきている。われわれの1例でも、腫瘍細胞の10%以下が染色された。3と4の腫瘍は、それぞれ++や+++にスコアされた。腫瘍の2つは、CEAとCD-15に陰性であった。ひとつの腫瘍は、CEAとCD-15の共に染色された。すべての腫瘍が、サーファクタントやアミラーゼに陰性であった。腺癌への特異度（79.5%）はむしろ低く、このマーカー（訳者注；Ber-EP4）は、悪性胸膜中皮腫と腺癌の鑑別に重要ではなかった。

Gaffeyらが結論しているように、Ber-EP4の部分的な（腫瘍細胞の1%から25%に対する）反応や、よりびまん的な反応は、彼らの1例やわれわれの7例で認められており、悪性胸膜中皮腫の診断を除外しない。

電子顕微鏡（6例）で、悪性胸膜中皮腫の診断を支持する、中等度から大量の中間径フィラメントが検出された。長さ/直径の比率（LDR（5））は4.0から10.5まであり、腺癌と悪性胸膜中皮腫の鑑別診断に有効ではなかった。Dardich et alが結論するように、悪性胸膜中皮腫は様々な微絨毛形態をとるため、今回の腫瘍において微絨毛の長さ直径比で悪性胸膜中皮腫としての診断を変更するには到らなかつた。腺癌への分化を支持する、ムチンや分泌顆粒や層状封入体の所見は認められなかつた。どの腫瘍もジアスターZ抵抗性のPAS陽性顆粒を認めなかつた。

CEAに対するモノクローナル抗体は、転移性腺癌の78.9%（19例中15例）と悪性胸膜中皮腫の7.7%（3例）に染色された。CEAは、腺癌に対して最も高い特異度（87.2%）を示したが、その感度（78.9%）は、CD-15やBer-EP4を使用して得られたものと同等かやや低い結果であった。CEAに陽性の免疫反応を示した悪性胸膜中皮腫の3例中2例は+++のスコアであり、3例目は++のスコアであった。3例全例がBer-EP4も陽性であり、1例はさらにCD-15に関しても陽性であった。電顕では（2例は）腫瘍に悪性胸膜中皮腫の診断を支持する中間径フィラメントが中等度から大量に含まれていた。微絨毛の長さ/直径の比率（LDR（5））は、6.3と10.3であった。電顕では腺癌への分化を示す所見は認められなかつた。

CEAに対する抗体が悪性胸膜中皮腫と腺癌を鑑別診断する価値を持ちうるかに関して、現在までの報告では、意見が分かれている。CEAに対するポリクローン抗体は通常、非特異的な交差反応抗原（NCA）にも反応し、これがいくつかの研究で悪性胸膜中皮腫の4から20%が染色される理由とされている。悪性中皮腫の例外的な例で、CEAのモノクローナル抗体で染色されるが、多くの研究では悪性中皮腫はCEAに対して一貫して陰性を呈している。

Leu-M1（CD-15）は、われわれの研究では、転移性腺癌の78.9%（19例中15例）に染色され、悪性胸膜中皮腫の12.8%（39例中5例）に染色された。CD-15が陽性である悪性胸膜中皮腫の頻度は、Brownらが示した6%と比べ著しく高くはなかつたが、その他の研究では、悪性胸膜中皮腫ではCD-15が陰性であったものが多い。

われわれの研究の3例で、腫瘍細胞の10%以下がCD-15に染色された。しかし、3例の再評価では、反応物質は腫瘍細胞内に局在しており、腫瘍細胞の細胞質に含まれる貪食された骨髓球細胞によるものではないことが再確認された。通常の多型核白血球に豊富に反応する腫瘍もなかった。

CD-15が陽性の残りの2例の悪性胸膜中皮腫は、それぞれ++と+++にスコアされた。電顕では、2例とも腺癌の分化の兆候を全く呈さず、免疫組織学的にサーファクタントやアミラーゼの所見を認めなかつた。1例（M/36）では、高い長さ/直径の比率が悪性胸膜中皮腫の診断を強力に支持した。

ひとつのマーカーの代わりに、モノクローナル抗体を使用することの重要性は、診断手段として免疫組織化学を用いる際に、広く強調すべきである。近年Brownらは、悪性胸膜中皮腫と肺腺癌の鑑別診断に、2から3のマーカーを複合して使用した感度と特異度を報告している。その研究では、CEAとB72.3の免疫表現型が共に陽性であることは、腺癌に対し極めて高い（100%）特異度と感度（88%）を示している。共に陰性の染色結果は、悪性胸膜中皮腫に対し、極めて高い特異度（100%）と感度（88%）を示している。

われわれの研究で、CEAとCD-15が共に陽性の結果は、腺癌に対する2から3のマーカーの複合で高い特異度（97%）を示したが、感度は極めて低かった（57.9%）。CEAとCD-15が共に陰性の表現型は、悪性胸膜中皮腫に対して最も感度（82.1%）も特異度（100%）も高かつた。腺癌に対する感度の高い陽性のマーカーとしては、CEAとCD-15共に陽性の場合とBer-EP4とCD-15共に陽性の場合は腺癌に100%の感度を持ち、CEAとCD-15共に陰性の場合とBer-EP4とCD-15共に陰性の場合は悪性胸膜中皮腫に100%の特異度を示した。しかし、CEAとCD-15の複合が悪性胸膜中皮腫にも最も感度と特異度が高かつた。われわれの研究では、CEAもしくはCD-15の場合かCEAとCD-15共に陽性の所見が、転移性腺癌の最も良い免疫組織化学の複合の指標であり、陰性の反応が悪性胸膜中皮腫の最も良い指標であった。

結論として、モノクローナル抗体の少数のパネルの使用で、免疫組織化学は日常での量の少ない胸膜生検標本の解釈に、重要な役割を果たしうると思われる。CEAとCD-15及びBer-EP4とCD-15共に陰性の染色は、悪性胸膜中皮腫に100%の特

異度を示した。一方、3つのマーカーの1つや2つや3つすべてに陽性であるからと言って、悪性胸膜中皮腫を除外はできない。悪性胸膜中皮腫として診断されており、陽性の免疫表現型を呈した9例の腫瘍のすべてで、サーファクタントやアミラーゼや、腺癌の分化の微細構造が見られなかった。中間径フィラメントの量は悪性胸膜中皮腫の診断を支持し、微絨毛の長さ直径比は悪性胸膜中皮腫を除外せず、1例では悪性胸膜中皮腫の診断を強く支持した。9例の免疫表現型は多くの悪性胸膜中皮腫の免疫表現型とは異なったが、われわれはこの9例を偽悪性中皮腫型癌と診断するより、悪性胸膜中皮腫として診断することが妥当であると思う。偽悪性中皮腫型癌は肉眼的には悪性胸膜中皮腫と鑑別できないが、免疫組織科学的にはサーファクタントを産成する特徴を持ち、Ⅱ型肺胞細胞かクララ細胞の特徴を電顎で呈するからである。アミラーゼは様々な肺腺癌で見られ、同様に偽悪性中皮腫型癌として診断される腫瘍に見られる。悪性胸膜中皮腫でのアミラーゼの検討は過去に1報告しかないが、われわれの研究で悪性胸膜中皮腫にアミラーゼは見いだされなかった。

#### 賛辞

この研究は、Nordjyllands Amts Forskningsrad と Aalborg Stifts Julelotteriの助成により、行われた。

#### キーワード

免疫組織化学、胸膜、悪性中皮腫、転移性癌

\*以下の図が添付されている。

- 図1 腫瘍組織の乳頭状パターン。上皮は纖維血管索にそっている。ヘマトキシリン-エオジン、 $\times 130$
- 図2 Ber-EP4に陽性で、腫瘍組織の基底側の細胞質に特に強く染まっている。  
LSAB、 $\times 320$
- 図3 細胞質がCEAに陽性。LSAB、 $\times 320$
- 図4 CD15に表面及び細胞質が強く陽性。LSAB、 $\times 320$
- 図5 短くて鈍な微絨毛をもった腫瘍細胞の表面。 $\times 5,000$

- 図6 細胞質に中間径フィラメントをもった腫瘍細胞。×15,000
- 図7 中間径フィラメントの束をもった腫瘍細胞。×20,000
- 図8 壁側胸膜上に増殖する充実性腫瘍組織の低倍率像。×25
- 図9 充実性の索をつくって増殖する腫瘍細胞。矢印に細胞室内腔を示す。ヘマトキシリン-エオジン、×320
- 図10 EP-4に膜が陽性。LSAB、×510
- 図11 CEAに細胞質が強陽性。LSAB、×320
- 図12 表面と細胞間隙に多くの微絨毛をもつ腫瘍細胞。×6,000
- 図13 長い微絨毛をもつ細胞室内腔。×6,000
- 図14 短い束をなした中間径フィラメントを細胞室内にもつ腫瘍細胞。×20,000

表1 悪性中皮腫と転移性胸膜癌の系列

	悪性中皮腫 (n=39) 症例数	転移性胸膜癌 (n=25) 症例数
胸腔鏡による生検	29	13
胸郭切除による生検	10	12
電子顕微鏡	28	12
剖検	39	10
原発腫瘍を細胞診で診断		4*
原発腫瘍を生検で診断		5
原発腫瘍を手術で診断		10
原発腫瘍を剖検で診断		6

\*1例は剖検により診断が確定された。

表2

抗体		発売元	希釈
サイトケラチンCAM2.5	a	Becton Dickinson	1:200
Ber-EP4	a	DAKO-Denmark	1:200
CEA-A5B7	a	DAKO-Denmark	1:100
CD-15-C3D1	b	DAKO-Denmark	1:50

a=0.05% プロナゼ (Sigma type XIv Pronase E) 5min at 37°C ; b=Microwave incubation in distillate water for 10min at 700 W.

## 第二部 悪性中皮腫とはどんな病気か

表3 悪性中皮腫と転移性胸膜腫瘍の系列の中で、免疫組織化学的に陽性を呈した腫瘍数

マーカー	腺癌	その他	中皮腫
LMWCK	19/19 (100 ; 82.4-100)*	6/6 (100 ; 54.1-100)	39/39 (100 ; 91-100)
Ber-EP4	16/19 (84.2 ; 60.4-96.6)	4/6 (66.7 ; 22.3-95.7)	8/39 (20.1 ; 9.3-36.5)
CEA	15/19 (78.9 ; 54.4-94)	3/6 (50 ; 11.8-88.2)	3/39 (7.7 ; 1.6-20.9)
Cd-15	15/19 (78.9 ; 54.4-94)	5/6 (83.3 ; 35.9-99.6)	5/39 (12.8 ; 4.3-27.4)

\*括弧内は、陽性腫瘍のパーセンテージ及び95%信頼区間

表4 1つ、2つ、3つのマーカーそれぞれにおける免疫学的表現型の特異度と感度

	腺癌	中皮腫	腺癌での特異度	腺癌での感度	中皮腫での特異度	中皮腫での感度
Ber-EP4+	16	8	79.5%	84.2%		
Ber-EP4-	3	31			84.2%	79.5%
CEA+	15	3	92.3%	78.9%		
CEA-	4	36			78.9%	92.3%
CD15+	15	5	87.2%	78.9%		
CD15-	4	34			78.9%	87.2%
2つのマーカー						
Ber-EP4+CEA+	13	3	91.2%	68.4%		
Ber-EP4+CEA-	3	5				
Ber-EP4-CEA+	2	0				
Ber-EP4-CEA-	1	31			94.7%	79.5%
Ber-EP4+CD15+	12	4	88.2%	63.2%		
Ber-EP4+CD15-	4	4				
Ber-EP4-CD15+	3	1				
Ber-EP4-CD15-	0	30			100%	76.9%
CEA+CD15+	11	1	97.0%	57.9%		
CEA+CD15-	4	2				
CEA-CD15+	4	4				
CEA-CD15-	0	32			100%	82.1%
3つのマーカー						
Ber-EP4+CEA+CD15+	9	1	96.8%	47.4%		
Ber-EP4+CEA+CD15-	4	2				
Ber-EP4+CEA-CD15+	3	3				
Ber-EP4+CEA-CD15-	0	2				
Ber-EP4-CEA+CD15+	2	0				
Ber-EP4-CEA+CD15-	0	0				
Ber-EP4-CEA-CD15+	1	1				
Ber-EP4-CEA-CD15-	0	30			100%	76.9%

表5 2つまたは3つのマーカーでの少なくともひとつの腺癌への感受性をもつマーカーや、中皮腫への陰性のマーカーとして考慮した際における免疫学的表現型の特異度と感度

	腺癌への特異度	腺癌への感度	中皮腫への特異度	中皮腫への感度
2つのマーカー				
Ber-EP4/CEA	79.5%	94.7%	94.7%	79.5%
Ber-EP4/CD15	76.9%	100%	100%	76.9%
CEA/CD15	82.1%	100%	100%	82.1%
3つのマーカー				
Ber-EP4/CEA/CD15/	76.9%	100%	100%	76.9%

表6 免疫組織化学で陽性反応を呈した悪性中皮腫9例の微細構造の特徴

性／年齢	Ber-EP4	CEA	CD-15	IF*	LDR** (10)	LDR (5)
M/51	+++	+++	++	+++	5.3	6.3
M/53	++	++	-	++	8.8	10.3
M/70	+++	+++	-	ND***	ND	ND
M/70	++	-	+	+++	3.4	4.0
M/53	++	-	+	++	7.7	10.5
M/74	+++	-	-	+++	7.2	9.2
M/69	+	-	+++	ND	ND	ND
F/72	+++	-	-	+++	6.4	8.5
M/36	-	-	+	+++	13.6	16.2

\*IF：中間細胞（intermediate filaments）；\*\*LDR：纖維の長さ／直径の比；ND：施行せず

## 『E-カドヘリンとカルレチニン：中皮腫と転移性腺癌との鑑別のための免疫化学的マーカーとしての有用な組み合わせ』

G.LEERS, J.AARTS & H.THEUNISSEN  
 De Wever 病院病理部門（ハーレン・オランダ）  
 Histopathology, 32, 1998, pp. 209-216

### 抄録

目的：胸膜病変における転移性癌と中皮腫の鑑別診断に際し、抗体の組み合わせについての診断精度を評価すること。

**方法と結果：**間接的免疫ペルオキシダーゼ染色法を使用することにより、実際に入手可能な抗体、すなわちBer-EP4、MOC-31、CEA、B72.3、CD15、E-カドヘリン及びカルレチニンの特異度と感度が評価された。この技法を、胸膜病変のホルマリン固定、パラフィン包埋組織ブロックに対して用いた。21例の転移性癌（MC）と20例の悪性中皮腫（MM）患者が含まれていた。E-カドヘリン/カルレチニンの組み合わせが、最も高い特異度（MCで100%、MMで91%）と感度（MMで100%、MCで91%）が、両方の腫瘍のカテゴリーにおいて考察された。

**結論：**E-カドヘリン/カルレチニンの組み合わせは、胸膜における転移性癌と中皮腫の鑑別のための有用な一式（panel）であることを示した。他のマーカーを追加する価値は限定的である。

**キーワード：**カルレチニン、E-カドヘリン、免疫組織化学、中皮腫

### はじめに

胸膜病変の通常の組織学的検査において、主要な問題のひとつが、悪性中皮腫と転移性癌の鑑別である。この10年間、多くの研究が、特にこの鑑別診断において、選択された抗体の一式（panel）の使用によってほとんど全てが中皮腫での反応陰性と転移性癌の反応陽性となることに基づいて、免疫組織化学がもっとも重要な診断補助であることを示してきた。

今回の研究の目的は、中皮腫と転移性癌との鑑別のマーカーのパネルとして、最も正確なものを選択することであった。この目的のために、腺癌のマーカーとして最も有用と一般的に考えられている5個の流通している抗体を、われわれは使用した：それは、B72.3、CEA、Ber-EP4、MOC-31、CD15である。このパネルは、最近、上皮型の中皮腫の選択的マーカーとされている、細胞接着分子であるE-カドヘリンに対する抗体と、カルレチニンに対する抗体を備えていた。この抗体の一式は、悪性中皮腫、転移性癌及び反応性中皮細胞増殖のサンプルについてのホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックに使用された。免疫染色の全ての可能な組み合わせの結果は、これら3種の状態の診断において、最も特異的かつ感度の高い組み合わせを確立するために分析された。

## 材料及び方法

### 組織標本

全ての生検標本は、通常4%の中性に緩衝されたホルマリンに24時間つけられ、その後パラフィンに埋め込まれた。

転移性癌（n=21）の組織学的診断は、腫瘍が、以下に述べる一般的なクライテリアの少なくとも2つを満たすときには確認された：（1）ジアスターーゼ染色を伴ったPAS染色によって、多くの（3つ以上）腫瘍細胞に細胞質内のムチンの小滴が存在すること（21例の癌のうち15が認められた：表1）、及び/または、（2）Sheibaniらの提案した方法に従って、CD15及び/またはBer-Ep4及び/またはCEAに対して腫瘍が陽性染色すること（21例中20例の癌：表1をみよ）。そして、（3）原発性腫瘍と全く同じ組織学的パターンの存在があること（21例中6例の癌にみられた：表2）。

中皮腫の診断（n=20）は、臨床診断及び中皮腫と矛盾しない組織学的検査と（すでに述べた）転移性癌の除外に基づいてなされた。個々の症例における、悪性中皮腫の臨床診断のクライテリアは、免疫組織化学に焦点をおいた研究の範囲をこえるほどには、詳細な評価はできていない。20例中9例のみが剖検によって確認された。この比較的少ない例数は、われわれの病院の1993年と1994年の総剖検率が35%にすぎなかったことによる。

良性反応性中皮（n=7）の診断は、臨床診断と数年にわたって追跡された良性（しばしば炎症）の過程と矛盾しない組織学的所見との組み合わせにもとづいた。

### 免疫組織化学

6つのモノクローナル抗体と、1つのポリクローナル抗体が、本研究に使用された。それらの性格や参考事項は表3に要約した。最もよい結果を生み出すための通常の免疫染色の手順の修正も、この表に示した。パラフィン包埋ブロックより $4\mu$ 厚の切片を取り出し、シランコーティングされたスライドに載せられ、一晩中37度の恒温に保たれた。免疫染色を行うために、その切片は、キシレンによる脱パラフィン化とエタノールによる再水和がなされた。内因的なペルオキシダーゼ活性は、3%の過酸化水素を加えたメタノールに、10分間漬けることにより阻止した。

それら過程の後で、スライドは磷酸緩衝食塩水（PBS: pH7.2-7.4）中にて濯がれた。抗体のうちの3つ（表3をみよ）は前処理に酵素消化を必要とし、0.1%ペプシン／0.1N塩酸に37度15分の処理を行った。一方、CEAは0.1%I型プロテアーゼ/PBS37度15分処理を最適化のため必要とした。他の抗体は、酵素による前処理を行わなかったが、スライドは0.1モルのサイトレート緩衝液（pH=6.0）及び750Wの電子レンジにて10分間処理された。

1%ウシ血漿アルブミン/PBSによる10分間のプレインキュベーションの後に、表3に示したような適切な時間及び温度において、適切な希釈にて最初の抗体を作用させた。PBSにて洗浄された後、適切に希釈された2番目の抗体を、室温で45分間作用させた（モノクローナル抗体については、ビオチンでラベルされたヤギの抗マウス免疫グロブリンを、ポリクローナル抗体についてはビオチンでラベルされたブタの抗ウサギ免疫グロブリンを用いた。双方とも1:400希釈：DAKO A/S、Glosrup、デンマーク）。PBSによる洗浄後、これらのスライドはセイヨウワサビのペルオキシダーゼ（サイトケラチン陽性、1:600、DAKO A/S）と共に役させたストレプタビンでインキュベート（孵卵）された。PBSでの洗浄後、3.3-ジアミノベンチジン/0.002%水化ペルオキサイド液（Sigma）によって、ペルオキシダーゼ活性が測定された。最後に、切片はハリスのヘマトキシリソ液で対比染色され、脱水化され、キシレンで洗浄され、エンテランで最終的にマウントされた。免疫染色は、他人の免疫組織染色の評価を知らされず、また診断名も知らされず、ブランドで評価された。免疫反応のスコアは、表3に示した抗原決定基の局在性に制限された。それぞれの切片の染色された細胞の割合の分析により、3群に分割された：免疫反応細胞が存在しない、明らかな免疫染色陽性細胞が少數散在して存在する、強度に免疫染色陽性。腫瘍細胞における全体的な染色の強さの違いは、内部のないしは研究所内における染色手順のバリエーションの可能性のために、評価することはできなかった。免疫染色陰性か、陽性かの違いのみ評価された。

## 結果

### 免疫組織化学

### 反応性中皮細胞

全7例ともが、CEA、Ber-Ep4、MOC-31、B72.3、そしてCD15に対する抗体に陰性であった。1例において、ごく少数の中皮細胞が、CEAとBer-Ep4に対して陽性を示し、他の2例については、E-カドヘリンに、部分的に免疫反応を示すいくらかの中皮細胞がみられた。7例全例において、中皮細胞はカルレチニンに対して強い免疫反応性を示した。

### 悪性中皮腫

中皮腫の20例の異なる抗体への免疫組織化学的結果を表4に示す。それら症例の検査結果は、CEA、B72.3とCD15に対する抗体には免疫反応を示さなかった（診断クライテリアと方法を見よ）。しかしながらいくつかの症例において、染色後の免疫反応が、上皮関連抗体であるBer-Ep4（7例が陽性）、MOC31（10例が陽性、それらの6例はBer-Ep4にも陽性を示した）にみられた。その上、3例についてはE-カドヘリンに対する抗体により細胞膜の染色がみられた。全20例は、カルレチニンに対するポリクローナル抗体に対して陽性を示した。この抗体を用いる、大部分の腫瘍細胞では細胞質に陽性を示した。

### 転移性腺癌

全ての癌が、1例を除いて「材料と方法」にて示されたクライテリアを満足した。この1例は、胸膜生検によって、癌性リンパ管症と考えられたが、その症例はリンパ転移性乳癌として知られていた。転移性癌21例の免疫組織化学的結果もまた表4に要約を示した。ほぼ全例の癌で（21例中20例）、E-カドヘリンの発現が認められた。これは、細胞膜免疫染色としてみられた。これらの症例の多くが、Ber-Ep4（n=19）、MOC31（n=20）、B72.3（n=17）、CEA（n=15）に対する抗体にも陽性を示した。21例中9例に、CD15に対して免疫染色が行われた。これら腺癌のうち1例のみが、抗カルレチニン免疫染色後に陽性のシグナルが認められた。

### 免疫表現型分析

転移性癌と中皮腫との診断のための、最も特異度があり、感度が高い抗体と抗

体の組み合わせを、表5に示した。癌に対する最も特異的な单一のマーカーは、B72.3（95%）であったが、感度は81%に過ぎなかった。E-カドヘリンは腺癌の85%の特異度と、非常に高い95%という感度を示した。カルレチニンは最も特異的な中皮腫のマーカー（95%）であり、全ての中皮腫についての検査がそれに対して陽性を示した（100%）。

E-カドヘリンとカルレチニンが2種のマーカーの組み合わせとしてベストであるとされた。E-カドヘリンに対して陽性であり、カルレチニンに対して陰性である組み合わせは、100%の特異度と91%の感度を転移性癌に示した（図1A、B）。その上、逆の組み合わせ（E-カドヘリン陰性/カルレチニン陽性）もまた中皮腫の2種のマーカーとして100%の特異度と80%の感度を示すベストの組み合わせのひとつであった（図1C,D）。

腺癌に対して100%の特異度を示す3種のマーカーの組み合わせは多く存在する。86%という最大の感度を腺癌に示しうるのは、Ber-Ep4（またはMOC31）、E-カドヘリン、カルレチニンの組み合わせのときである。中皮腫に対しては、ごく少数の組み合わせのみが100%の特異度をもたらし、それらのうちで最高の感度（75%）に届いたのはB72.3（-）/E-カドヘリン（-）/カルレチニン（+）の組み合わせであった。

## 考察

転移性癌と中皮の増殖とを鑑別することは困難なこともあります。小さな胸膜生検切片材料のときは特に困難である。細胞質内の中性のムチンの証明は、上皮性である癌の中でも特に腺癌に強く表われる。鑑別における組織化学的染色の欠点は、比較的感度が悪いことと、特異度の欠如である。近年、多くの出版物が鑑別診断における免疫組織化学の重要性を示してきた。最近まで、特異的な「中皮腫」抗体はみつからず、悪性中皮腫の診断は、抗体のパネルを使って、それらが陰性であることに基づいてきた。論文においては、B72.3、CEA、Ber-Ep4、MOC-31及びCD15が最も多く記述されてきた。

モノクローナル抗体であるB72.3は、ヒト乳癌の細胞膜成分に富んだフラクションより作成されている。それは、肺、子宮内膜、卵巣、乳房、脾臓、消化管を含む多くの臓器からの腺癌から過剰に産出されている高分子糖蛋白であるTAG72と

理解されているが、反応性中皮に対しては親和性を欠いている。しかしながら、Szpak等が発見したことであるが、B72.3は、腺癌に完全に限定しているわけではない。われわれの研究でも、中皮腫の1例がB72.3に対して弱い免疫染色性を示した。

癌胎児性抗原（CEA）は、悪性中皮腫と腺癌との分離に広く使われているマーカーである。それは、大腸癌より抽出分離された腫瘍胎児性糖蛋白の1つであり、60%の炭水化物を含む200kDaの分子量を有する糖蛋白複合体とされている。われわれの研究において、21例中15例の腺癌において陽性であった。明白な免疫反応が、大腸（n=2）、肺（n=6）からの転移性癌でみられた。しかしながら、乳房（n=5）、腎（n=1）からの全ての転移では、完全に陰性であった。中皮腫の2例において、われわれは弱い限定的なCEAに対する反応を認めた。Dejmek等は、いくつかの中皮腫においては、CEA分子類似の抗原物質を含み、それはある種の流通しているCEA抗体に反応しうるものであることを示した。

Ber-Ep4は、免疫原として乳癌細胞のMCF-7 lineを使用して作成された抗体である。その抗体は、2つのグリコペプチドの半分の蛋白からなる抗原決定基と理解され、広範囲にヒトの上皮とそこから発生する腫瘍に存在するが、正常な中皮腫には存在しないと考えられている。多くの研究において、全ての種類の腺癌の87%においてBer-Ep4の発現が認められるが、乳房と腎からの腫瘍では反応性がないとされている。それとは対照的に、本研究においては、5例の乳房からの転移のうち2例（それらは腎からでもあった）は、Ber-Ep4に対して陽性であった。この抗体は高い感度（91%）を有する。しかしながら、腫瘍全体を全般的に染色したもので、部分的な陽性反応を示したものも含めても、特異度は中皮腫の35%と比較的低い。これらの現象はGaffey等の結果と類似している。

MOC-31抗体は、上皮細胞と、腺癌に存在する40kDaの細胞膜の糖蛋白と理解されている。本研究において、MOC-31はBer-Ep4と類似の反応パターンを示した：腺癌に高い感度（95%）、中皮腫に低い特異度（50%）。

CD15（Leu M1）は、細胞膜あるいは細胞内蛋白ないし脂肪に連結されたglycopeptidlact-N-fucose pentosyl III ceramideに存在する、特異的糖鎖に結合している。最初、CD15は骨髄单球性マーカーとして理解されていたが、ホジキン病における新生細胞やマクロファージ及び白血球においてもまた発現した。続いて、

Sheibaniらが、肺腺癌を含む腺癌の59%にCD15が発現することを報告した。後年、それは多くの癌やときに中皮腫に発現することが明らかとなった。本研究においては、Leu-M1は腺癌の43%に陽性で、それらの症例では強い免疫反応を示した。20例の中皮腫のうち2例において、Leu-M1抗体に対して部分的な反応がみられたが、それら2種の腫瘍の染色パターンは異なっていた。転移性癌のサンプルでは、細胞膜染色と同等に染まる細胞質が提示されたが、2例の免疫陽性である中皮腫では、少數の部分的な細胞において、淡く細胞質が示されたのみであった。

2つの新しい、パラフィン包埋組織によく反応する抗体が、E-カドヘリンとカルレチニンである。E-カドヘリンは、多くの異なるメンバー、例えばE-カドヘリン（上皮細胞に発現）、N-カドヘリン（神経細胞）及びP-カドヘリン（胎盤細胞）などを有するカドヘリンファミリーに属する。カドヘリンは、カテニンと呼ばれる $\alpha$ カテニン、 $\beta$ カテニン、プラコグロビン、ビンクリン及び $\alpha$ アクチニンを含む蛋白質の一群によって、アクチン基の細胞骨格に連結されている。E-カドヘリンは、120kDaの細胞接着分子であり、上皮に発現し、細胞間接合部に濃縮されている。E-カドヘリンの発現の減少は、結合性の欠如に関連し、消化管、卵巣、乳房、肺その他の部位の上皮性腫瘍の高度な悪性度と浸潤性を示すものである。われわれの研究において、21例の転移性癌のうち20例に、細胞膜でのE-カドヘリンの発現が、腫瘍細胞の20%以上にみられた。20例の中皮腫のうち17例は、E-カドヘリンに対して完全に陰性であった。中皮腫の2例において、部分的な細胞膜の染色（腫瘍細胞の5%以下）がみられたが、他の免疫陽性の中皮腫では、E-カドヘリンによる、より全般的な細胞質染色を呈した。これらの所見は、肺癌や悪性中皮腫において、E-カドヘリンと同じくN-カドヘリンを調査したPeralta Solerとその同僚のそれと類似のものであった。その研究では、いくつかの中皮腫においても、E-カドヘリン蛋白の低いレベルの発現が認められた。彼らは、カドヘリンを用いて効率的に細胞を個々の集団に分別することはたんに抗原の特異性の結果ではなく、個々のカドヘリン発現の量的な効果であるとしている。

カルレチニンは、カルシウムに結合した細胞質蛋白の大きな一群に属しており、そこにはS100蛋白もまた属している。それは、29kDaの蛋白であり、カルシウム結合側において作用する二重ラセン環に組み込まれた独特のアミノ酸の順位によつ

て性格づけられている。それは、中枢ないし末梢の神経組織において多量に発現される。強固で一貫した免疫反応性が、正常及び反応性の中皮においてみられる。中皮や他の非神経組織に発現するカルレチニンの生物学的意味は、まだよく分かっていない。今回の調査では、すべての中皮腫がカルレチニンに対して陽性であったが、転移性癌の95%においてはこの抗体に対する免疫反応性が欠陥していた。大腸癌からの転移の1例において、カルレチニンに対して部分的な免疫反応がみられたが、それは腫瘍細胞の1%から5%に過ぎないものであった。このことは、それら腫瘍の10%にカルレチニンに対する免疫反応を認めたDoglioni等のそれと同意できるものである。最近、調査者のグループが、ある種の漿液性卵巣癌の転移において免疫反応が陽性であることを報告している（未発表）。今回の調査においては、卵巣癌からの2例の転移（1例は漿液性、1例は卵巣外癌）は、カルレチニンに対して陰性であった。組織切片の一部に存在した正常な中皮は、陽性コントロールとして検査された。

E-カドヘリンとカルレチニンの両方とも、それらが単一のマーカーとして使われるとき、高い特異度とそれに匹敵する高い感度が存在する。E-カドヘリン (+) /カルレチニン (-) の組み合わせが、双方のカテゴリーの腫瘍において、最も高い特異度（転移性癌100%及び悪性中皮腫91%）と感度（転移性癌100%及び悪性中皮腫91%）を有した。逆の反応、すなわちE-カドヘリン (-) /カルレチニン (+) もまた高い特異度と感度（悪性中皮腫特異度100%、感度80%及び転移癌特異度80%、感度100%）を示した。

結論として、E-カドヘリンとカルレチニンの組み合わせは、悪性中皮腫と転移性癌との鑑別に有意な援助となることが明らかとなった。そしてまた、中皮腫において陽性の結果を産みだす抗体（抗カルレチニン）を含むため、病理医が“減点法診断”すなわち一連の陰性の結果のもとに結論に到達することをあてにしなくてよくなるという、適した組み合わせであるともいえる。その上、この組み合わせは、ルーチンの過程（フォルマリン固定、パラフィン包埋）による組織によく作用し、主要な腫瘍の症例に100%の特異度に到達しうる。3つないしそれ以上の抗体でなりたつ式（panel）には、もはや付加価値は存在しない。

★以下の図が添付されている。

図1 転移性癌（上段）と中皮腫（下段）のカルレチニン（A、C）、E-カドヘリン（B、C）の免疫反応

## 第二部 悪性中皮腫とはどんな病気か

表1 調査された転移性癌の診断クライテリア

症例	ムチン	CEA/Ber-Ep4/CD15	原発部位
1	+	+	大腸
2	+	+	不明
3	+	+	不明
4	-	+	腎
5	-	-	乳房
6	-	+	乳房
7	+	+	肺
8	+	+	肺
9	-	+	卵巣(漿液性)
10	-	+	乳房
11	+	+	肺
12	+	+	卵巣(卵巣外)
13	+	+	乳房
14	+	+	肺
15	+	+	乳房
16	+	+	肺
17	+	+	不明
18	+	+	不明
19	+	+	不明
20	+	+	肺
21	-	+	大腸

表2 腫瘍の属性

胸膜に限局した腫瘍	症例数	剖検確定数
転移性腺癌 (n=21)		
肺	6	4
乳房	5	2
大腸	2	
卵巣	2	1
腎	1	
不明	6	
中皮腫 (n=20)		
上皮型	2	2
二相型	16	7
肉腫型	2	

表3 抗体の属性

抗体	クローナン種	前処理	抗体希釈	培養時間／温度	検出システム	局在性参考	製造元
TAG-72	B72.3	マウス	ペプシン	1:75	1h/RT	GaMBio/Strep	細胞質 8 NeoMarkers,Fremont,USA
CEA	HIS-CEA	マウス	プロテアーゼ	1:2	1h/37°C	GaMBio/Strep	細胞質 2 CIS,France
CD15	MMA	マウス	マイクロウエーブ	1:10	1h/RT	GaMBio/Strep	細胞質 1 Beeton Dickinson,San Jose,USA
Epithelial antigen	Ber-EP4	マウス	ペプシン	1:200	1h/RT	GaMBio/Strep	細胞質 6 DAKO A/S, Glostrup,Denmark
Epithelial antigen	MOC31	マウス	ペプシン	1:50	12h/RT	GaMBio/Strep	細胞質 19 Biogenex, San Ramon,USA
カルレチニン	Polyclonal	ラビット	マイクロウエーブ	1:90	24h/4°C	SwaRBio/Strep	細胞質 18 SwAnt,Bellinzona,Switzerland
E-カドヘリン	HECD-1	マウス	マイクロウエーブ	1:500	2h/RT	GaMBio/Strep	細胞膜 17 Takara,Otsu,Japan

\*RT：室温

表4 各抗体における免疫反応性の結果

	CEA + (+/-)	BerEp-4 + (+/-)	MOC31 + (+/-)	B72.3 + (+/-)	CD15 + (+/-)	カルレチニン + (+/-)	E-カドヘリン + (+/-)
反応性中皮 (n=7)	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	5 (2)	0 (1)
(陽性率)	0 (14)	0 (29)	0 (14)	0 (0)	0 (0)	71 (29)	0 (14)
中皮腫 (n=20)	0 (2)	4 (3)	4 (6)	0 (1)	0 (2)	17 (3)	2 (1)
(陽性率)	0 (10)	20 (15)	20 (30)	0 (5)	0 (10)	85 (15)	10 (5)
転移性癌 (n=21)	11 (4)	17 (2)	18 (2)	14 (3)	99 (0)	0 (1)	17 (3)
(陽性率)	50 (18)	81 (10)	86 (10)	64 (14)	41 (0)	0 (5)	77 (14)

+ : 10%以上の細胞が陽性 +/− : 1%～10%の細胞が陽性

表5 胸膜病変における免疫染色の特異度と感度

抗体	腺癌 陽性例	中皮腫 陽性例	腺癌(%)		中皮腫(%)	
			特異度	感度	特異度	感度
<b>1種のマーカー</b>						
B72.3+	17	1	96	77		
E-カドヘリン+	21	3	85	96		
カルレチニン+	2	20			91	100
<b>2種のマーカー</b>						
Ber-Ep4+/カルレチニン-	18	0	100	82		
MOC31+/カルレチニン-	19	0	100	86		
B72.3+/カルレチニン-	17	0	100	77		
B72.3+/E-カドヘリン+	17	0	100	77		
E-カドヘリン+/カルレチニン-	19	0	100	86		
CEA-/E-カドヘリン-	1	15			96	75
B72.3-/E-カドヘリン-	1	15			96	75
B72.3-/カルレチニン+	2	19			91	95
E-カドヘリン-/カルレチニン+	0	16			100	80
<b>3種のマーカー</b>						
BerEP4+/MOC+/カルレチニン-	18	0	100	82		
BerEP4+/E-カドヘリン+/カルレチニン-	17	0	100	77		
MOC31+/E-カドヘリン+/カルレチニン-	18	0	100	82		
B72.3+/E-カドヘリン+/カルレチニン-	17	0	100	77		
CEA-/B72.3-/カルレチニン+	2	17			91	85
CEA-/E-カドヘリン-/カルレチニン+	0	15			100	75
B72-/E-カドヘリン-/カルレチニン+	0	15			100	75
E-カドヘリン-/CD-/カルレチニン+	0	14			100	70