

200717019 A

研究報告書表紙レイアウト

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 師井 洋一

平成20 (2008) 年 4月

研究報告書目次レイアウト

目 次

I. 総括研究報告		
悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断	-----	2
師井洋一		
II. 分担研究報告		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	6
IV. 研究成果の刊行物・別刷		
	なし	

悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断

（主任）研究者 師井 洋一 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 准教授

研究要旨：早期悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節を生検し、転移の有無を確認することにより郭清術の適応を決定することが可能となった。摘出したリンパ節の診断においては、通常のHE染色に加えて免疫組織学的に検討し、さらには1または3種のメラニン産生関連酵素の遺伝子を指標にRT-PCR法を併用して診断精度の向上に努める。この検査により、予後の向上が期待でき、5施設共同でその有用性と安全性を検討する。

（分担研究者）

古江増隆・九州大学大学院医学研究院
皮膚科学分野・教授

戸倉新樹・産業医科大学医学部皮膚科
・教授

石川治・群馬大学医学部皮膚科・教授

玉置邦彦・東京大学大学院医学系研究
科皮膚科・教授

岩月啓氏・岡山大学医学部皮膚・粘膜
・結合織科・教授

A. 研究目的

従来主治医の経験にゆだねられていた早期悪性黒色腫のリンパ節廓清の適応が、このセンチネルリンパ節生検によって明確に判断できるようになった。このことより、不必要な予防的廓清術（転移がないのに廓清する）は回避できるようになり、患者のQOL向上に大きく貢献する。さらに、臨床的には腫脹のないリンパ節であっても微小転移が検出される可能性が高まり、従来なら何もせずに経過観察となっていた症例についても、転移したリンパ節、すなわち取り残していた腫瘍細胞を摘出することになり、予後の向上にも貢献するものと考えられる。また、従来なら手術不能と判断されるような全身状態不良の症例でも、比較的侵襲の少ないこの検査は可能となる。きわめて微小なセンチネルリンパ節内の転移の場合、この検査だけでも治療効果が期待でき（センチネルリンパ節微小転移陽性のほとんどの症例では、その後の廓清で、それ以外のリンパ節に転移が認められることはまれである）、この場合も予後向上に貢献できる。また、これまでも国内、海外からも色素に対するアレルギー反応以外有害な事象は報告されていないが、術中の安全性はもとより、術後も十分か

つ慎重に経過観察を行い、長期的な安全性も検証していく予定である。以上の、有効性・安全性に関して、個人情報の保護に留意しつつ、計5施設での共同で、検証する。

B. 研究方法

「悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断」として、高度先進医療の認可を受けていた、岡山大学医学部・歯学部附属病院、群馬大学医学部附属病院、東京大学医学部附属病院、産業医科大学病院および申請者の所属する九州大学病院において、以下に掲げる適応条件に相当し、本検査施行した症例に関して有効性および安全性の確認試験を行う。

被験者の適格基準及び選定方法：選択基準：臨床的（術前の診察や画像検査による）にリンパ節や内臓臓器に転移がない悪性黒色腫患者で、かつ、以下の条件のいずれかを満たすもの。1）触診、ダーモスコピー、エコー、CT、MRIなどの画像検査によって原発巣の厚さが1mm以上あるいは原発巣の浸潤が真皮内に及ぶと予測される場合。2）原発巣表面にびらん潰瘍を伴う場合。除外基準：何らかの転移病巣を持つ場合。重篤な肝腎機能低下のある患者。妊婦、妊娠している可能性のある婦人、授乳中の婦人。本検査に関して同意がえられない場合。主治医が適応なしと判断した場合。被験者の選定：選択基準を満たす原発巣を持つ悪性黒色腫患者について、原発巣以外の臓器転移の有無について検索し、理学的・画像的に転移がない場合に本検査についての説明を行う。本人の同意がえられれば本検査の対象とする。

治療計画：使用する医薬品：1）生体色素（リンパ節の同定のため）：1%パテントブルー-V（院内調整）、2）RI標識コロイド

(リンパ節の同定のため)：フチン酸 テクネシウム(99mTc)注射液 など

施行手順：原則として手術前日に原発巣周囲の皮内に99mTCで標識したフチン酸(富士フィルムRIファーマ)を0.4ml (= 37MBq/0.1ml)注射する。ガンマカメラやガンマプローブでRI集積部(センチネルリンパ節の存在部位)を同定し、マーキングする。手術当日は、原発巣周囲の皮内に生体色素(院内調整1%パテントブルー)を1-2ml注射する。再度ガンマプローブでRI集積部を確認後、同部に皮膚切開を加え、脂肪織内に青染するリンパ管とセンチネルリンパ節を確認。ガンマプローブでセンチネルリンパ節であることを確認した後に摘出する。摘出したリンパ節はHE標本およびおよび免疫組織化学染色(抗S-100蛋白、HMB-45抗体、MART-1抗体など)を行い、腫瘍細胞を検出する。また、リンパ節の一部を凍結保存し、mRNAを抽出後、黒色腫に特異的に発現するTyrosinase, gp100, MART-1などの各遺伝子をRT-PCR法で増幅し、検出する。以上の方法でセンチネルリンパ節に転移陽性と診断された症例に関しては、リンパ節郭清を可能な限り行う。陰性の場合、廓清を行わず、経過観察とする。実施期間：平成19年12月3日から平成22年3月31日。予定症例数：100例(協力施設分を加えた数)。有効性及び安全性の評価：全ての症例について、術後、原発巣、所属リンパ節領域の定期的な診察(原発巣周囲の再発・転移、新たな新生物発生の有無)および、全身の画像検査を最低5年間を行う。有効性(リンパ節の同定率、転移率、術後の再発率、生命予後など)と安全性(生体色素や99mTCによる有害反応の有無と内容)を評価し、記録として残すと共に、定期的に全症例について有効性と安全性についてのまとめを行う。

モニタリング体制及び実施方法：症例の適応と有効性、安全性については定期的に開催される部局内の症例検討会で評価を行う。さらにまた、当施設内の第三者組織(有限責任中間法人九州臨床研究支援センター(略称：CReS九州))により本試験の適切性に関する評価も受ける。また、本試験参加施設の代表者が集まる定期的(年度内に1-2回)な報告会にて各施設における試験結果を報告し、有効性(リンパ節の

同定率、転移率、術後の再発率、生命予後など)と安全性(試験後の色素の皮膚内における残存等)について評価を行う。被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法：九州大学病院医療安全管理委員会作成の医療事故防止マニュアル、および各所属機関の同様マニュアルに基づき対応する。

試験に係る記録の取扱い及び管理・保存方法：電子カルテ上および本試験専用の調査票に詳細を記載し、厳重に管理し、試験終了後5年間保存する。調査記録は適宜、症例報告書の集積・管理を委託する「有限責任中間法人九州臨床研究支援センター(略称：CReS九州)」に郵送され、集積・管理・保管される。

(倫理面への配慮)上記の他、九州大学及び施行各施設において倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

厚生労働省がん研究助成金15-10(主任研究者：斎田俊明、信州大学医学部皮膚科)の平成15年から18年までの検討では、340症例中、330例(97.1%)でセンチネルリンパ節が同定された。センチネルリンパ節に転移がなく、根治的リンパ節廓清を省略できた症例は207例(全症例の60.8%)あったが、その後に残存リンパ節に転移を生じてきたものは5例(2.4%)のみであった。センチネルリンパ節生検によって、従来であれば予防的リンパ節廓清を受けなければならなかった患者の約60%は生検のみで済み、患者の身体的負担を大幅に軽減できたということになる。当科で施行したpT1以上の49例について詳細に検討した。同定率は49例中47例の95%で全国平均と大差なかった。49例中11例をセンチネルリンパ節転移と診断し、うち9例に根治的廓清を施行したが、偽陰性症例を1例認めた。免疫染色では抗Tyrosinase抗体による染色が感度92%、特異度79%で最も有用と考えられた。一般に汎用されているHMB45染色は、特異度は高いものの感度(67%)が低かった。RT-PCR法はおおむね良好な感度(すべて82%以上)で、補助診断として有用であるが、MART-1に関しては偽陽性が多く、特異度(59%)が低かった。

また、被験者の安全性についても、当科および共同研究施設で施行した全199症例において、問題となる有害事象は経験していない。

今回の研究以前に、今回申請と同一の方法で悪性黒色腫に対して施行してきたセンチネルリンパ節生検症例数は各施設で以下の通りである。九州大学病院皮膚科（64例）、東京大学病院皮膚科（10例）群馬大学病院皮膚科（31例）、岡山大学病院皮膚科（54例）、産業医科大学病院皮膚科（40例）。

臨床試験登録（試験番号：UMIN000001097）も終了し、症例の登録準備が整ったため、適応基準に合致した症例を順次登録していく予定。

D. 考察

1)達成度について

今年度で症例登録の準備は終了した。来年度より症例登録を行う予定。

2)研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

欧米では診療のスタンダードとなっている。今回の臨床試験・研究によって安全性・有用性が確認できれば、本邦でも広く適用される手技、検査となり、悪性黒色腫患者が受ける恩恵は大きい。

3)今後の展望について

これまでの経験から極めて安全に行える検査・手技であるが、さらに症例を積み重ねて安全性の確認を行いたい。また、前述の、郭清術不可能な高齢者等で、この検査自体で、予後・無病期間の延長などベネフィットがあるかどうかを検討したい。

E. 結論

センチネルリンパ節は悪性腫瘍が最初に転移するリンパ節と考えられ、その生検により、病期を確定し、所属リンパ節の郭清の適応を決定できる。また、この検査は診断精度を上げるだけでなく、侵襲の大きい郭清術が不可能な症例においてもこの検査は可能であり、臨床的に腫脹のないリンパ節であっても微小転移が検出される可能性

が高まる。従来なら無処置で経過観察となっていた症例についても、転移したリンパ節、すなわち取り残していた腫瘍細胞を摘出することになり、予後の向上にも貢献するものと考えられる。この検査について安全性・有用性が明らかとなれば、予後不良の悪性黒色腫患者が受ける恩恵は大きい。

F. 健康危険情報

これまでに、海外から色素に対するアレルギー反応以外有害な事象は報告されていない。さらに前述の、厚生労働省がん研究助成金15-10出の検討においても、国内ではアレルギー反応の報告すらない。術中の安全性はもとより、術後も十分かつ慎重に経過観察を行い、長期的な安全性も検証していく予定である。以上の、有効性・安全性に関して、個人情報の保護に留意しつつ、計5施設での共同で、検証する。

G. 研究発表

1. 論文発表

斎田俊明, 真鍋求, 竹之内辰也, 清原隆宏, 山本明史, 清原祥夫, 高田実, 山崎直也, 師井洋一, 神谷秀喜, 八田尚人, 宇原久, 幸野健, 鹿間直人, 土田哲也, 古賀弘志. 皮膚悪性腫瘍診療ガイドライン, 日皮会誌 117 : 1855-1925, 2007. .

Lin N, Uchi H, Moroi Y, Fukiwake N, Dainichi T, Takeuchi S, Takahara M, Tu Y, Furue M, Urabe K. Significance of the expression of phosphorylated signal transducer and activator of transcription-3, -Akt, and -cyclin D1 in angiosarcoma. J Dermatol Sci 48(1):64-66.2007.

Lin N, Moroi Y, Uchi H, Fukiwake N, Dainichi T, Takeuchi S, Takahara M, Tu Y, Furue M, Urabe K. Significance of the expression of phosphorylated-STAT3, -Akt, and -ERK1/2 in several tumors of the the epidermis. J Dermatol Sci. 48(1):71-73.2007

Lin N, Uchi H, Moroi Y, Fukiwake N,
Dainichi T, Takeuchi S, Takahara M, Tu Y,
Furue M, Urabe K. Expression of the p38
MAPK, NF-kappaB and cyclin D1 in
extramammary Paget's disease. J Dermatol
Sci. Mar;45(3):187-192

Chen SY, Takeuchi S, Urabe K, Kido M, H
ayashida S, Tomoeda H, Uchi H, Dainichi
T, Takahara M, Shibata S, Furue M, Moroi
Y, Tu YT. Overexpression of phosphorylate
d ATF2 and STAT3 in eccrine porocarcinom
a and eccrine poroma. J Dermatol Sci 2007
Sep 13;

2. 学会発表

師井洋一,内 博史,上ノ土武,占部和敬,古江
増隆. リンパ流の変更を認めた悪性黒色腫
の2例. 第49回高知地方会. 2007/2/3

師井洋一,権藤寿喜,友枝裕人,安川晋輔,上ノ
土武,古江増隆,吉田雄一,高橋聡. 小児悪性
黒色腫の一例. 第22回日本皮膚外科学会. 2
007/6/9-10

師井洋一. センチネルリンパ節転移検出に
おける標的蛋白. メラノーマ班会議. 2007/
8/4

師井洋一,古江増隆. センチネルリンパ節転
移検出における標的. 第50回高知地方会. 2
007/9/1-2

師井洋一. センチネルリンパ節生検おける
問題点 -副作用報告のまとめ-. メラノー
マ班会議. 2007/10/30

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
師井洋一, 竹之内辰也, 神谷秀喜	基底細胞癌	日本皮膚悪性腫瘍学会・斎田俊明編	科学的根拠に基づく皮膚悪性腫瘍診療ガイドライン[第1版]	金原出版	東京	2007	60-88
師井洋一	熱傷に対する処置・凍傷に対する処置	岩本幸英編	外傷の初期治療の要点と盲点	文光堂	東京	2007	240-3, 246

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Liu H, Takeuchi S, Moroi Y, Lin N, Urabe K, Kokuba H, Imafuku S, Dainichi T, Uchi H, Furue M, Tu Y	Expression of minichromosome maintenance 5 protein in proliferative and malignant skin diseases.	Int J Dermatol	46(11):	117	2007
Okada J, Imafuku S, Tsujita J, Moroi Y, Urabe K, Furue M	Case of adult T-cell leukemia/lymphoma manifesting marked purpura.	J Dermatol	34(11)	782-5	2007
Chen SY, Takeuchi S, Urabe K, Kido M, Hayashida S, Tomoeda H, Uchi H, Dainichi T, Takahara M, Shibata S, Furue M, Moroi Y, Tu YT.	Overexpression of phosphorylated ATF2 and STAT3 in eccrine porocarcinoma and eccrine poroma.	J Dermatol Sci.	49(2)	170-173	2007
Lin N, Uchi H, Moroi Y, Fukiwake N, Dainichi T, Takeuchi S, Takahara M, Tu Y, Furue M, Urabe K	Significance of the expression of phosphorylated signal transducer and activator of transcription-3, -Akt, and -cyclin D1 in angiosarcoma.	J Dermatol Sci	48(1)	71-3	2007
Takeuchi S, Furue M.	Dendritic cells: ontogeny	Allergol Int.	56(3)	215-23	2007

Kido M, Takeuchi S, Hayashida S, Urabe K, Sawada R, Furue M	Assessment of abnormal blood flow and efficacy of treatment in patients with systemic sclerosis using a newly developed microwireless laser Doppler flowmeter and arm-raising test.	Br J Dermatol	157(4)	690-7	2007
Dainichi T, Uchi H, Moroi Y, Furue M	Stevens-Johnson syndrome, drug-induced hypersensitivity syndrome and toxic epidermal necrolysis caused by allopurinol in patients with a common HLA allele: what causes the diversity?	Dermatology.	215(1)	86-8	2007
Miyachi Y, Katayama I, Furue M.	Suplatast/tacrolimus combination therapy for refractory facial erythema in adult patients with atopic dermatitis: a meta-analysis study.	Allergol Int.	56(3)	269-75	2007
Imafuku S, Yoshimura D, Moroi Y, Urabe K, Furue M.	Systemic varicella zoster virus reinfection in a case of angioimmunoblastic T-cell lymphoma.	J Dermatol.	34(6)	387-9	2007
Fukiwake N, Moroi Y, Urabe K, Ishii N, Hashimoto T, Furue M.	Detection of autoantibodies to desmoplakin in a patient with oral erythema multiforme	Eur J Dermatol	17(3)	238-41	2007
Imafuku S, Tashiro A, Furue M	Ciclosporin treatment of psoriasis in a patient with chronic hepatitis C	Br J Dermatol	156(6)	1367-9	2007
Ogawa S, Uchi H, Fukagawa S, Takeuchi S, Nakahara T, Kato M, Kokuba H, Furue M.	Development of atopic dermatitis-specific communication tools: Interview form and questionnaire and answer brochure.	J Dermatol.	34(3)	33-8	2007
Lin N, Uchi H, Moroi Y, Fukiwake N, Dainichi T, Takeuchi S, Takahara M, Tu Y, Furue M, Urabe K	Expression of the p38 MAPK, NF-kappaB and cyclin D1 in extramammary Paget's disease.	J Dermatol Sci.	45(3)	187-92	2007