

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 師井 洋一

平成21（2009）年3月

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」

師井洋一 2

II. 分担研究報告

九州大学 古江増隆 6

東京大学 玉置邦彦 8

岡山大学 岩月啓氏 10

群馬大学 石川 治 12

産業医科大学 戸倉新樹 14

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 16

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

研究代表者 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、病期の確実な診断が可能となり、治療としての所属リンパ節郭清術の適応を判断する貴重な所見となっている。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。

A. 研究目的

センチネルリンパ節とは、悪性腫瘍が所属リンパ節に転移する際に最初に流入するリンパ節のことである。近年の技術的進歩により、このセンチネルリンパ節を比較的簡便に同定・生検することが可能となった。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、それ以外の非センチネル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 1 mm 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（^{99m}Tc）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 ^{99m}Tc 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 1-2%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は摘出する。摘出したリンパ節は HE 標本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。陰性の場合は、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 3 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な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

3 年間で 100 例の登録を目標としているが、平成 21 年 2 月 28 日現在、群馬大学 8 例、東京大学 5 例、岡山大学 9 例、産業医科大学 15 例、九州大学 14 例の計 51 例の登録が終了しており、順調に経過している。全例でセンチネルリンパ節の同定が可能で、生検されており、技術的な問題はほとんどないものと思われた。現在のところ、これらの症例で、再発や転移は認めていない。今年度の登録症例のうち群馬大学の 1 例に、術後肺塞栓症が発症し、有害事象と考えられた。しかし、この疾患は術後の安静に起因するもので、センチネルリンパ節生検に特異的なものではない。その他の症例 50 例では、有害事象は全く認められなかった。今年度施行症例に再発や遠隔転移症例は認めていない。また同様に、偽陰性例（センチネルリンパ節を転移陰性と診断した後、所属リンパ節転移が認められる症例）は認めていない。

今後は、施行症例の予後を慎重に経過観察するとともに、適応基準に合致した症例を順次登録していく予定。臨床試験登録（試験番号：UMIN00001097）

D. 考察

1) 達成度について

昨年度で症例登録準備が終了したため、今年度より症例登録を開始したが、これまで 51 例と順調に経過している。

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ものの、一部でその有用性が疑問視されている。しかし、欧米（白人）の悪性黒色腫と本邦の悪性黒色腫は発症部位や組織型などで大きく異なっている。本邦で40-45%を占める末端黒子型は白人ではほとんど認められず、白人に多い表在拡大型は BRAF 遺伝子の変異が多く認められているが、末端黒子型ではほとんど認められない。センチネルリンパ節生検の有用性は、本邦独自で確認する必要があると考えられる。

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、悪性黒色腫患者全般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。この検査が、予後に影響を与えるのかどうかを、慎重に経過観察しながら検証していきたい。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予後改善があるかどうかを検討したい。

また、悪性黒色腫に限らず、皮膚悪性腫瘍全般に有用な検査であるため、比較的発症頻度の高い、有棘細胞癌や乳房外パジェット病にも適応を拡大したいと考えている。

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、この検査は病期診断の精度を上げるためだけではなく、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

1. Chen SJ, Nakahara T, Takahara M, Kido M, Dugu L, Uchi H, Takeuchi S, Tu YT, Moroi Y, Furue M. Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in epidermal tumours and its correlation with cyclin-dependent kinase 2. *Br J Dermatol.* 2009 160(2): 442-5.
2. Chen SY, Takeuchi S, Urabe K, Hayashida S, Kido M, Tomoeda H, Uchi H, Dainichi T, Takahara M, Shibata S, Tu YT, Furue M, Moroi Y. Overexpression of phosphorylated-ATF2 and STAT3 in cutaneous angiosarcoma and pyogenic granuloma. *J Cutan Pathol.* 2008 35(8): 722-30.
3. Chen S, Takahara M, Kido M, Takeuchi S, Uchi H, Tu Y, Moroi Y, Furue M. Increased expression of an epidermal stem cell marker, cytokeratin 19, in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2008 159(4): 952-5.
4. Chen S, Moroi Y, Urabe K, Takeuchi S, Kido M, Hayashida S, Uchi H, Uenotsuchi T, Tu Y, Furue M. Differential expression of two new members of the p53 family, p63 and p73, in extramammary Paget's disease. *Clin Exp Dermatol.* 2008 33(5):634-40.

5. Chen SY, Takeuchi S, Moroi Y, Hayashida S, Kido M, Chen SJ, To moeda H, Uenotsuchi T, Tu YT, Furue M, Urabe K. Overexpression of phosphorylated-ATF2 and STA T3 in cutaneous squamous cell carcinoma, Bowen's disease and basal cell carcinoma. *J Dermatol Sci.* 2008 51(3): 210-5.
6. Chen SY, Takeuchi S, Moroi Y, Hayashida S, Kido M, Uchi H, Takahara M, Uenotsuchi T, Tu YT, Urabe K, Furue M. Concordant over-expression of transcription factor Sp1 and vascular endothelial growth factor in extramammary Paget's disease. *Int J Dermatol.* 2008 47(6): 562-6.
7. Xie LN, Uchi H, Hayashida S, Kido M, Takeuchi S, Takahara M, Moroi Y, Furue M. Stromal CD10 expression is correlated with invasiveness and proliferation of extramammary Paget's disease. *Br J Dermatol.* 2008 158(6): 1389-91.
8. Chen SY, Moroi Y, Urabe K, Takeuchi S, Kido M, Hayashida S, Uchi H, Uenotsuchi T, Tu YT, Furue M. Concordant overexpression of p-FAK and p-ERK1/2 in extramammary Paget's disease. *Arch Dermatol Res.* 2008 300(4): 195-201.
9. Dainichi T, Moroi Y, Duan H, Urabe K, Koga T, Miyazono M, Sasaki T, Hashimoto T, Furue M. Paraneoplastic acanthosis nigricans accompanied by silent meningioma producing transforming growth factor- α . *Eur J Dermatol* 2008; 18: 721-722
10. 師井洋一. 進行期メラノーマの治療. 皮膚悪性腫瘍-診療ガイドラインとトピックス-. 医学のあゆみ. 266(3): 212-215. 2008.

2. 学会発表

1. Moroi Y, Uchi H, Takeuchi S, Takahara K, Furue M. Clinical evaluation of sentinel lymph node biopsy in malignant melanoma. 10th China-Japan joint meeting of Dermatology, Hangzhou, China, 2008. 10.31-11.2
2. 師井洋一. 皮膚がん. 九州大学がんセミナー. 2008/7/10.
3. 江崎仁一, 師井洋一. センチネルリンパ節生検で false negative を認めた悪性黒色腫の2例. 厚生労働省がん研究助成金19-7 班会議. 2008/8/2
4. 師井洋一. 悪性黒色腫の免疫療法. 日本皮膚科学会皮膚悪性腫瘍指導専門医講習会. 2008/8/9.
5. 師井洋一. 悪性黒色腫の免疫療法-基礎と臨床-. 岡山研究皮膚科フォーラム. 2008.9.25.
6. 師井洋一. 悪性黒色腫の治療. 西部支部企画講習会. 2008.10.17.
7. 師井洋一. 当科で施行した integumentectomy. 厚生労働省がん研究助成金19-7 班会議. 2008.10.25.

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

悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断

研究分担者 古江 増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 教授

研究要旨：九州大学病院皮膚科では2001年にセンチネルリンパ節生検を開始して、2008年までにトータル83症例に対して施行した。2008年の1月～2009年2月には14症例に対してセンチネルリンパ節シンチを行った。全てフチン酸によるRI法とパテントブルーによる色素法を併用した。いずれの症例でも予想された部位にセンチネルリンパ節が同定されたが、前腕のSMMの1症例では肘窩にもセンチネルリンパ節が見つかった。転移が陽性であったのは2例であった。いずれもHE染色、免疫組織化学染色（tyrosinase, MART-1, HMB45, MITF）、RT-PCR法（tyrosinase, MART-1, gp100）のいずれにも陽性で、リンパ節郭清を追加した。

A. 研究目的

悪性黒色腫症例におけるセンチネルリンパ節生検の有用性と安全性を確認する。

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、適応条件に相当し、本検査施行した症例に関して有効性及び安全性の確認試験を行う。

C. 研究結果

2008年の1月～2009年2月には14症例に対してセンチネルリンパ節生検を施行し、全例で同定可能であった。現時点で、それら症例に、再発・転移を認めていない。2007年12月に行ったメラノーマのセンチネルリンパ節生検に関するアンケート調査の結果を集計した。

- ① 貴大学（病院）では黒色腫のセンチネルリンパ節生検を行っているか
- ② 貴大学（病院）ではPCRまで行っているか
- ③ 使用している色素は何か
- ④ パテントブルーが使用できなくなったら、困るか
- ⑤ 今までにパテントブルーを使用した大体の件数と何か副作用があったかどうか、という5つの質問で、全国81施設から回答を得た。その結果、センチネルリンパ節生検を行っている施設の割合は90%、そのうちPCRまで行っている割合は15%、使用色素がパテントブルー（他の併用を含む）と回答された数は61施設、84%であった。パテントブルーの使用がもし、できなくなった

場合には「とても困る」が65%、「困る」が21%、「困らない」9%であった。各機関のパテントブルー使用件数を合計すると約2,900件で、そのうちパテントブルー使用による副作用の報告はなく0%であった。またパテントブルーがなくても困らないと回答した施設では他の色素をしようとしており、インジゴカルミンは4施設、インドシアニングリーン10施設、イソスルファンブルー1施設で使用されていた。

D. 考察

PubMedで検索できたセンチネルリンパ節生検における副作用報告について報告した。センチネルリンパ節生検による外科的合併症ではLymphedemaが2.2%に生じ、Seroma形成の報告があった。また色素法（主にパテントブルー）でアレルギー反応、特にアナフィラキシーなど12例の報告があった。他に色素投与部の壊死が1例、体液の青色化による副作用でパルスオキシメーターでの測定上のSaO₂低下、青い血管浮腫が認められた。Y法ではアルブミンを使用した例でアレルギー反応が1例に認められたのみであった。パテントブルーの発癌性について、WHOの記載ではラットに繰り返し注入した部位に肉腫を形成したとの報告が根拠になっているが、ヒトでは発癌に関する報告はない。これらのことからアレルギー反応への対応としては、パテントブルーなどを用いた色素法はできるだけ麻酔科管理で、少なくとも手術室で血管確保の上行い、麻酔医にもアレルギー反応があることを留意させることが重要であると考えられる。RI tracerは比較的安全であるが十分に注意すべきである。他の副作用全般については、RI tracerは骨シンチに使用する量よりも低容量であるが、発癌性の可能性も考慮し、集積した

部位（皮膚、リンパ節）は切除することを前提とし、色素、RIともに切除マージン内に注入することが推奨されると考えられた。

E. 結論

悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節生検は安全に施行できる検査法であり、今後はその有用性について慎重に検証していく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Chen SJ, Nakahara T, Takahara M, Kido M, Dugu L, Uchi H, Takeuchi S, Tu YT, Moroi Y, Furue M. Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in epidermal tumours and its correlation with cyclin-dependent kinase 2. *Br J Dermatol*. 2009 160(2): 44 2-5.
2. Chen SY, Takeuchi S, Urabe K, Hayashida S, Kido M, Tomoeda H, Uchi H, Dainichi T, Takahara M, Shibata S, Tu YT, Furue M, Moroi Y. Overexpression of phosphorylated-ATF2 and STAT3 in cutaneous angiosarcoma and pyogenic granuloma. *J Cutan Pathol*. 2008 35(8): 722-30.
3. Chen S, Takahara M, Kido M, Takeuchi S, Uchi H, Tu Y, Moroi Y, Furue M. Increased expression of an epidermal stem cell marker, cytokeratin 19, in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2008 159(4): 952-5.
4. Chen S, Moroi Y, Urabe K, Takeuchi S, Kido M, Hayashida S, Uchi H, Uenotsuchi T, Tu Y, Furue M. Differential expression of two new members of the p53 family, p63 and p73, in extramammary Paget's disease. *Clin Exp Dermatol*. 2008 33(5):634-40.

5. Chen SY, Takeuchi S, Moroi Y, Hayashida S, Kido M, Chen SJ, Tomoeda H, Uenotsuchi T, Tu YT, Furue M, Urabe K. Overexpression of phosphorylated-ATF2 and STAT3 in cutaneous squamous cell carcinoma, Bowen's disease and basal cell carcinoma. *J Dermatol Sci*. 2008 51(3): 210-5.
6. Chen SY, Takeuchi S, Moroi Y, Hayashida S, Kido M, Uchi H, Takahara M, Uenotsuchi T, Tu YT, Urabe K, Furue M. Concordant over-expression of transcription factor Sp1 and vascular endothelial growth factor in extramammary Paget's disease. *Int J Dermatol*. 2008 47(6): 562-6.
7. Xie LN, Uchi H, Hayashida S, Kido M, Takeuchi S, Takahara M, Moroi Y, Furue M. Stromal CD10 expression is correlated with invasiveness and proliferation of extramammary Paget disease. *Br J Dermatol*. 2008 158(6): 1389-91.
8. Chen SY, Moroi Y, Urabe K, Takeuchi S, Kido M, Hayashida S, Uchi H, Uenotsuchi T, Tu YT, Furue M. Concordant overexpression of p-FAK and p-ERK1/2 in extramammary Paget's disease. *Arch Dermatol Res*. 2008 300(4): 195-201.
9. Dainichi T, Moroi Y, Duan H, Urabe K, Koga T, Miyazono M, Sasaki T, Hashimoto T, Furue M. Paraneoplastic acanthosis nigricans accompanied by silent meningioma producing transforming growth factor- α . *Eur J Dermatol* 2008; 18: 721-722

2. 学会発表

1. Moroi Y, Uchi H, Takeuchi S, Takahara K, Furue M. Clinical evaluation of sentinel lymph node biopsy in malignant melanoma. 10th China-Japan joint meeting of Dermatology, Hangzhou, China, 2008. 10.31-11.2

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) 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

研究分担者 玉置 邦彦・東京大学大学院医学系研究科皮膚科・教授

研究要旨：東京大学病院における平成 20 年度の症例数は 5 例で、男性 3 例、女性 2 例であった。部位としては、上肢 1 例、体幹 3 例、下肢 1 例であった。Tumor thickness の分布は 0.75-1.8mm で、検出されたセンチネルリンパ節の平均個数は 1.8 個であった。今年度の症例ではセンチネルリンパ節は今のところ全て陰性であり、従って所属リンパ節の廓清は施行していない。また、センチネルリンパ節生検による有害事象は特にみられなかった。

A. 研究目的

悪性黒色腫症例におけるセンチネルリンパ節生検の有用性と安全性を確認する。

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、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。

C. 研究結果

東京大学病院における平成 20 年度の症例数は 5 例で、男性 3 例、女性 2 例であった。部位としては、上肢 1 例、体幹 3 例、下肢 1 例であった。Tumor thickness の分布は 0.75-1.8mm で、検出されたセンチネルリンパ節の平均個数は 1.8 個であった。今年度の症例ではセンチネルリンパ節は今のところ全て陰性であり、従って所属リンパ節の廓清は施行していない。また、センチネルリンパ節生検による有害事象は特にみられなかった。なお、tumor thickness が 4mm を超えると思われるものに関しては、現在一期的に廓清を行う場合が多く、このような症例に関してはセンチネルリンパ節生検を行っていない。

特記することとして、今年度の症例の中で、右上腕外側に生じた悪性黒色腫でセンチネルリンパ節が鎖骨下リンパ節であったものがあつた。この症例は原発巣を切除した後、センチネルリンパ節を行っており、その影響が出た可能性は否定し得ない。Gioffre Florio MA らの報告では乳がん 91 例中 1 例においてセンチネルリンパ節が鎖骨下リンパ節であったとしているが、悪性黒色腫に関してははっきりとしたことは分からなかった。

D. 考察

また、今年度の症例ではないが、センチネルリンパ節が陰性でその後リンパ節転移を来した例があり、現在治療中であるが、興味深い経過をたどっているので報告する。症例は 84 歳、女性。左踵部の悪性黒色腫で、18x12mm 大の角化性局面があり、その中に、前医の生検による手術痕と 2mm 大の赤色肉芽様病変が見られた。ごく一部に黒色斑が見られたが、ダーモスコピーでは余りはっきりした所見はとれなかった。原発巣の切除と併せて左鼠径部より 3 個のセンチネルリンパ節を摘出したが、全て陰性であった。なお、Tumor thickness は 1.5mm であった。切除後、2年半の経過で左骨盤リンパ節に転移を来したが、鼠径リンパ節の腫脹は現在に至るまで経過中見られていない。また、実質臓器への転移も見られていない。電子線 46Gy 照射、DTIC+IFN-beta による治療を計 7 クール行ったところ、腫瘍は徐々に縮小し、治療開始時には 60x38mm 大であったものが、治療 18 ヶ月後には 28x8mm 大に変化している。また、5-S-CD 値も 25.1nmol/L から 4.4 nmol/L と正常化した。

E. 結論

当施設におけるセンチネルリンパ節の問題点としては近隣に競合施設が多く、症例数が必ずしも充分と言えないことが挙げられる。また、費用が他施設と比較して高額のためか検査を希望されない場合が時折ある。これは申請時にガンマプローブの調達方法が不透明であったことに起因する。今後も症例を地道に積み上げて、実績を上げていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 玉置邦彦（総編集）、最新皮膚科学大系 2008-2009、中山書店、東京、2008、1-325.

2. 玉置邦彦 (総編集). インフォームドコンセントのための最新皮膚カラーアトラス A巻. 中山書店, 東京, 2008, 1-656
3. 玉置邦彦 (総編集). インフォームドコンセントのための最新皮膚カラーアトラス B巻. 中山書店, 東京, 2008, 1-712
4. Kikuchi K, Wakamatsu K, Tada Y, Komine M, Ito S, Tamaki K. Serum 5-S-cysteinyl-dopa levels in patients with psoriasis undergoing narrowband ultraviolet B phototherapy. Clin Exp Dermatol. 33(6) 750-3. 2008.
5. Fujimoto S, Uratsuji H, Saeki H, Kagami S, Tsunemi Y, Komine M, Tamaki K. CCR4 and CCR10 are expressed on epidermal keratinocytes and are involved in cutaneous immune reaction. Cytokine 44(1) 172-8, 2008
6. Kagami S, Saeki H, Tsunemi Y, Nakamura K, Kuwano Y, Komine M, Nakayama T, Yoshie O, Tamaki K. CCL27-transgenic mice show enhanced contact hypersensitivity to Th2, but not Th1 stimuli. Eur J Immunol. 38(3) 647-57. 2008

2. 学会発表

1. 帆足俊彦, Hearing Vincent J., 大原國章, 玉置邦彦. 色素細胞特異的可溶性タンパクの検討. 第107回日本皮膚科学会総会. 2008.4.18-20.
2. Hoashi T, Ohara K, Tamaki T. A case of malignant melanoma of the sole reconstructed by a distally based perforator medial plantar flap. 10th China-Japan joint meeting of Dermatology, Hangzhou, China, 2008. 10.31-11.2

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) 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

研究分担者 岩月 啓氏・岡山大学医学部皮膚・粘膜・結合織科・教授

研究要旨：今回、岡山大学皮膚科において施行してきたセンチネルリンパ節(SN)生検の概要をまとめ、特に検査実績と結果、有害事象、遺伝子診断の現況について検討した。当科では1999年7月より色素(パテントブルー)のみ用いる方法で4例、2000年7月より色素とリンパンチグラムの組み合わせで6例、さらに2002年1月からは術中の γ -detectionを組み合わせて56例、計66例に施行した。なお、2004年8月より先進医療として31例、2008年4月からは確認試験として8例に施行している。

A. 研究目的

悪性黒色腫症例におけるセンチネルリンパ節生検の有用性と安全性を確認する。

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、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。

C. 研究結果

SN生検に伴う合併症に関しては、重篤なもの認めなかった。66例中3例に、色素注射部位への色素の長期残留を認めたが、時間の経過とともに色調が薄くなっている。全例切除生検施行例で、追加切除時には周囲を剥離して一次縫縮を行っている。また手術部位は背部、臀部、肩、各1例ずつであった。

D. 考察

当科で行っている遺伝子診断の特徴として、生検リンパ節辺縁を材料としていることがあげられる。それは①最大断面を用いて組織診断するため(組織診断を優先する)と、②転移病変を最初に生じる辺縁洞が辺縁組織に含まれるため、である。当科での遺伝子診断の結果と組織診断の結果を比較すると、従来の報告と比べRT-PCRのみの陽性例が少なく、組織診断のみ陽性例が多い傾向にあった。これは①遺伝子診断に用いる組織量が少ない(リンパ節辺縁部を少量用いている)こと、②RT-PCR検出感度の違い(手技、用いる試薬などによる)などが理由として考えられた。

近日では、組織採取量をやや多めに採取するよう工夫し一部試薬を変更したためか、2005年7月以降は組織診断のみ陽性例26例中1例も認めない。一方、遺伝子診断のみ陽性となった症例が4例あったが、そのうち2例は組織を追加して切りだして免疫染色を行うことにより組織診断も陽性となった。組織診断に用いられる組織も限られた量であることを考慮すると、辺縁部を用いた遺伝子診断を併用することは合理的ではないかと考えた。なお、遺伝子診断のみの陽性例も、陰性例に比べ転移・再発率が高いとの報告が多いが、まだ結論は出ていない。我々の経験症例は少なく、経過観察期間も短いため、今後さらに比較検討を要する。

E. 結論

悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節生検は安全に施行できる検査法であり、今後はその有用性について慎重に検証していく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuji K, Hamada T, Uenaka A, Wada H, Sato E, Isobe M, Asagoe K, Yamasaki O, Shiku H, Ritter G, Murphy R, Hoffman EW, Old LJ, Nakayama E, Iwatsuki K. Induction of immune response against NY-ESO-1 by CHP-NY-ESO-1 vaccination and immune regulation in a melanoma patient. *Cancer Immunol Immunother.* 57(10) 1429-37. 2008

2. 大塚正樹, 浅越健治, 岩月啓氏. 【がんの標準的治療】皮膚がんの診断と標準的治療. 岡山医学会雑誌 120(2): 201-206. 2008.

2. 学会発表

1. 阪上陽子, 浅越健治, 岩月啓氏. ダーモスコピー上悪性黒色腫との鑑別が困難であった先天性色素性細胞母斑の自然消退例. 第24回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2008.7.4-5.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) 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

研究分担者 石川 治・群馬大学医学部皮膚科・教授

研究要旨：群馬大学医学部附属病院において「臨床的な使用確認試験」として実施した「悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断」の平成20年度集計を報告した。症例数は合計8例であり、性別は男5例、女3例であった。また、患者年齢は59才から82才で、平均71才であった。原発部位は足底3例、足趾2例、手指2例、頬部1例であり、このうち2例は爪部に発生していた。爪部、掌蹠を合わせると8例中6例が非生毛部に発症していたことになる。

A. 研究目的

悪性黒色腫症例におけるセンチネルリンパ節生検の有用性と安全性を確認する。

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、適応条件に相当し、本検査施行した症例に関して有効性及び安全性の確認試験を行う。

C. 研究結果

いずれの症例も臨床所見や検査所見から厚さ1mm以上と推定され、臨床確認試験の同意が得られた症例であり、原発巣の手術実施に合わせてセンチネルリンパ節生検を行った。使用したRI標識粒子は全例フチン酸であり、色素は全例パテントブルーを用いた。結果は8例全例でセンチネルリンパ節を同定・摘出することができた。センチネルリンパ節の部位は上肢に生じた2例では腋窩であり、頬部に生じた1例は頸部であった。下肢に生じた5例ではいずれも鼠径にセンチネルリンパ節を認めたが、このうち踵部後面に生じた1例では膝窩にもセンチネルリンパ節を同定しえた。同定されたセンチネルリンパ節の数は症例当たり1～3個であった。原発巣の病型分類では末端部黒子型が5例と最も多く、結節型、表在型、悪性黒子型が各1例であった。Tumor thicknessは0.6～3.3mm、平均2.0mmであった。センチネルリンパ節の組織学的および免疫組織学的検索では2例に顕微鏡的転移を認めたが、残りの6例には転移の所見はなかった。nested RT-PCR法によるチロシナーゼ遺伝子の検索では2例においてこれを検出した。チロシナー

ゼ遺伝子が陽性であった2例はいずれも組織学的に転移陽性であった2例と一致した。このうち1例は3個のセンチネルリンパ節すべてにチロシナーゼ遺伝子が陽性であり、この結果も組織学的転移陽性結果と一致した。転移陽性例2例には所属リンパ節郭清術を追加した。陰性例に対しての予防的リンパ節廓清術は実施していない。有害事象は1例で生じ、右下腿深部静脈血栓および肺塞栓がみられたが、ハパリン、ワーファリンの投与で軽快した。本有害事象とセンチネルリンパ節の遺伝子診断との因果関係はないと判断した。他に有害事象を生じた例はなかった。現在までのところ8例全例において再発や転移は認めていない。

D. 考察

これまでの結果をまとめるとRI法（フチン酸）と色素法（パテントブルー）を併用したセンチネルリンパ節生検で実施した8例全例にセンチネルリンパ節を同定・摘出しえた。センチネルリンパ節に組織学的転移を認めた例は全例でチロシナーゼ遺伝子を検出しており、また、チロシナーゼ遺伝子を検出しなかった例で組織学的転移が見いだされた例はなかった。したがって、センチネルリンパ節の遺伝子診断は従来の組織学的・免疫組織学的な転移の診断と同等もしくはそれ以上に転移の検出に有用である可能性があると考えられる。

E. 結論

悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節生検は安全に施行できる検査法であり、今後はその有用性について慎重に検証していく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Motegi SI, Okazawa H, Murata Y, Kanazawa Y, Saito Y, Kobayashi H, Ohnishi H, Oldenborg PA, Ishikawa O, Matozaki T. Essential roles of SHPS-1 in induction of contact hypersensitivity of skin. Immunol Lett. 121(1) 52-60. 2008

2. 学会発表

1. 茂木精一郎, 田村敦志, 石川治. リンパ管静脈吻合術による下肢リンパ浮腫の治療. 日本皮膚科学会鹿児島地方会. 2006.3.18-19

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) 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

研究分担者 戸倉 新樹・産業医科大学医学部皮膚科・教授

研究要旨：産業医科大学皮膚科において2008年に「悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断」を実施したのは15名であった。病理組織学的に転移がないにもかかわらずPCR陽性であった症例は3例あった。そのうち1例は標本の再検討にて病理組織学的に転移が確認された。また、gp100に偽陽性が多発し、in situ 症例でもみられたが、プライマーを変更したことでこの現象は見られなくなった。

A. 研究目的

悪性黒色腫症例におけるセンチネルリンパ節生検の有用性と安全性を確認する。

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、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。

C. 研究結果

実際の方法を記す。手術前日までに、Tc99m Sn-colloidを腫瘍周囲の皮内注射し、直後および2時間後に所属リンパ節領域をセンチカメラで撮像し、集積した部位にマーキングをした。手術直前には、同部位に2.5%パテントブルーを皮内注射しRI法でマーキングしていた部位に皮切を加え、青染されたセンチネルリンパ節を摘出した。摘出したリンパ節は、速やかに長軸方向に半割し（病理組織用とPCR用）、病理組織用をホルマリン固定、PCR用はRNA later® (Ambion) に浸した。RNA later液に浸したリンパ節を乱切した後、RNA抽出キット (Invitrogen) を用いてtotal RNAを抽出。1μgのtotal RNAをTaqMan® Reverse Transcription Rigaments (Applied systems) を用いてcDNAを作成した後、Primerと蛍光分子FAMを付加したProbeと、内在性コントロールの検出には、Human ACTB (β-actin) のgene expression assay kit (Applied Biosystems)、標的因子の検出には、MART-1, gp100, tyrosinase のgene expression assay kit (Applied Biosystems)を使用し、95°C15秒、60°C1分の50cyclesで目的物の増幅を行った。

男性8名、女性13名（67.47±16.03歳）
Stage 0: 3名, Ia: 2名, Ib: 1名, IIb: 1名, IIc: 2名, IIIa: 7名, IIIb: 1名, IIIc: 2名, IV: 2名, SSM: 9名, NM: 2名, ALM 7名, LMM 3名。センチネルリンパ節の遺伝子検索を施行した患者数15名（2007年は8名）。熱傷瘢痕上に生じた有棘細胞癌と悪性黒色腫の重複癌の1例を報告した。

D. 考察

有害事象を生じた例はなかった。現在までのところ15例全例において再発や転移は認めていない。

病理学的診断との乖離が2例に認められた。PCRでN1aと診断した症例のうち、3例は病理診断で転移なしと判断。そのうち連続切片を再検討すると1例で転移が確認された。これらの症例は今後、特に慎重に経過を観察する予定である。

E. 結論

悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節生検は安全に施行できる検査法であり、今後はその有用性について慎重に検証していく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshiki R, Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimauchi T, Tokura Y. IL-10-Producing Langerhans Cells and Regulatory T Cells Are Responsible for Depressed Contact Hypersensitivity in Grafted Skin. J Invest Dermatol. 129(3): 705-13, 2009

2. Mori T, Kabashima K, Yoshiki R, Sugita K, Shiraishi N, Onoue A, Kuroda E, Kobayashi M, Yamashita U, Tokura Y. Cutaneous hypersensitivities to haptens are controlled by IFN-gamma-upregulated keratinocyte Th1 chemokines and IFN-gamma-downregulated langerhans cell Th2 chemokines. *J Invest Dermatol.* 128(7): 1719-27, 2008

2. 学会発表

1. 阿部祥子, 栢島健治, 森智子, 白石紀子, 戸倉新樹. 悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節遺伝子診断への real-time PCR 法の導入. 第 107 回日本皮膚科学会総会. 2008.4.18-20

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) なし

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
玉置邦彦		玉置邦彦	最新皮膚科学大系 2008-2009 (2008)	中山書店	東京	2008	1-325
玉置邦彦		玉置邦彦	インフォームドコンセントのための最新皮膚カラーアトラス A巻	中山書店	東京	2008	1-656
玉置邦彦		玉置邦彦	インフォームドコンセントのための最新皮膚カラーアトラス B巻	中山書店	東京	2008	1-712

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
Chen SJ, Nakahara T, Takahara M, Kido M, Dugu L, Uchi H, Takeuchi S, Tu YT, Moroi Y, Furue M	Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in epidermal tumours and its correlation with cyclin-dependent kinase 2.	Br J Dermatol	160 (2)	442-445	2009
Chen SY, Takeuchi S, Urabe K, Hayashida S, Kido M, Tomoeda H, Uchi H, Dainichi T, Takahara M, Shibata S, Tu YT, Furue M, Moroi Y.	Overexpression of phosphorylated-ATF2 and STAT3 in cutaneous angiosarcoma and pyogenic granuloma.	J Cutan Pathol	35(8)	722-30.	2008
Chen S, Takahara M, Kido M, Takeuchi S, Uchi H, Tomaru Y, Moroi Y, Furue M.	Increased expression of an epidermal stem cell marker, cytokeratin 19, in cutaneous squamous cell carcinoma.	Br J Dermatol	159(4):	952-5.	2008
Chen S, Moroi Y, Urabe K, Takeuchi S, Kido M, Hayashida S, Uchi H, Uenotsuchi T, Tu Y, Furue M.	Differential expression of two new members of the p53 family, p63 and p73, in extramammary Paget's disease.	Clin Exp Dermatol	33(5)	634-40	2008

Chen SY, Takeuchi S, Moroi Y, Hayashida S, Kido M, Chen SJ, Tomoeda H, Uenotsuchi T, Tu YT, Furue M, Urabe K.	Overexpression of phosphorylated-ATF2 and STAT3 in cutaneous squamous cell carcinoma, Bowen's disease and basal cell carcinoma.	J Dermatol Sci	51(3)	210-5	2008
Chen SY, Takeuchi S, Moroi Y, Hayashida S, Kido M, Uchi H, Takahara M, Uenotsuchi T, Tu YT, Urabe K, Furue M.	Concordant over-expression of transcription factor Sp1 and vascular endothelial growth factor in extramammary Paget's disease.	Int J Dermatol	47(6):	562-6	2008
Xie LN, Uchi H, Hayashida S, Kido M, Takeuchi S, Takahara M, Moroi Y, Furue M	Stromal CD10 expression is correlated with invasiveness and proliferation of extramammary Paget disease.	Br J Dermatol	158(6)	1389-91.	2008
Chen SY, Moroi Y, Urabe K, Takeuchi S, Kido M, Hayashida S, Uchi H, Uenotsuchi T, Tu YT, Furue M	Concordant overexpression of p-FAK and p-ERK1/2 in extramammary Paget's disease.	Arch Dermatol Res.	300(4)	195-201.	2008
Chen SY, Takeuchi S, Urabe K, Kido M, Hayashida S, Tomoeda H, Uenotsuchi 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)	170-3	2008
Dainichi T, Moroi Y, Duan H, Urabe K, Koga T, Miyazono M, Sasaki T, Hashimoto T, Furue M.	Paraneoplastic acanthosis nigricans accompanied by silent meningioma producing transforming growth factor-alpha.	Eur J Dermatol	18	721-722	2008
師井洋一	進行期メラノーマの治療. 皮膚悪性腫瘍-診療ガイドラインとトピックス-	医学のあゆみ	266(3)	212-15	2008
Kikuchi K, Wakamatsu K, Tada Y, Komine M, Ito S, Tamaki K.	Serum 5-S-cysteinyldopa levels in patients with psoriasis undergoing narrowband ultraviolet B phototherapy.	Clin Exp Dermatol.	33(6)	750-3.	2008
Fujimoto S, Uratsuki H, Saeki H, Kagami S, Tsunemi Y, Komine M, Tamaki K.	CCR4 and CCR10 are expressed on epidermal keratinocytes and are involved in cutaneous immune reaction.	Cytokine	44(1)	172-8	2008

Kagami S, Saeki H, Tsunemi Y, Nakamura K, Kuwano Y, Komine M, Nakayama T, Yoshie O, <u>Tamaki K.</u>	CCL27-transgenic mice show enhanced contact hypersensitivity to Th2, but not Th1 stimuli	Eur J Immunol.	38(3)	647-57.	2008
Tsuji K, Hamada T, Uenaka A, Wada H, Sato E, Isobe M, Asagoe K, Yamasaki O, Shikama H, Ritter G, Murphy R, Hoffmann EW, Old LJ, Nakayama E, <u>Iwatsuki K.</u>	Induction of immune response against NY-ESO-1 by CHP-NY-ESO-1 vaccination and immune regulation in a melanoma patient.	Cancer Immunol Immunother.	57(10)	1429-37.	2008
大塚正樹, 浅越健治, 岩月啓氏.	【がんの標準的治療】皮膚がんの診断と標準的治療.	岡山医学会雑誌	120(2)	201-206.	2008
Motegi SI, Okazawa H, Murata Y, Kanazawa Y, Saito Y, Kobayashi H, Ohnishi H, Oldenborg PA, <u>Ishikawa O, Matozaki T.</u>	Essential roles of SHPS-1 in induction of contact hypersensitivity of skin.	Immunol Lett.	121(1)	52-60.	2008
Yoshiki R, Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimoyama T, <u>Tokura Y.</u>	IL-10-Producing Langerhans Cells and Regulatory T Cells Are Responsible for Depressed Contact Hypersensitivity in Grafted Skin.	J Invest Dermatol.	129(3)	705-13	2009
Mori T, Kabashima K, Yoshiki R, Sugita K, Shiraishi N, Onoue A, Kuroda E, Kobayashi M, Yamashita U, <u>Tokura Y.</u>	Cutaneous hypersensitivities to haptens are controlled by IFN-gamma-upregulated keratinocyte Th1 chemokines and IFN-gamma-downregulated Langerhans cell Th2 chemokines.	J Invest Dermatol.	128(7)	1719-27	2008