

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 師井 洋一

平成22（2010）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に関する研究	—————	02
師井洋一		
II. 分担研究報告		
1. 悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断	—————	06
師井洋一		
2. 悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断	—————	08
古江増隆		
3. 悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断	—————	11
岩月啓氏		
4. 悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断	—————	13
石川治		
5. 悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断	—————	15
戸倉新樹		
6. 悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節の遺伝子診断	—————	17
門野岳史		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	—————	21

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は、これを生検し、転移の有無を確認することにより、病期の正確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重要な検査となっている。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した。

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

岩月啓氏・岡山大学医学部皮膚・粘膜・
結合織科 教授

戸倉新樹・産業医科大学医学部皮膚
科・皮膚科学 教授

石川治・群馬大学医学部皮膚科・皮膚
科学 教授

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。悪性黒色腫においてはリンパ節転移の有無が予後を決する重要な因子となっており、臨床的にリンパ節腫大のない症例では、予防的リンパ節郭清術がしばしば行われてきた。しかし、予防的リンパ節郭清術の適応が、主治医の判断にまかせられており、さらに統計学的にも予防的郭清術は予後を改善しないという論文も散見されるようになった。1992 年に発表されたセンチネルリンパ節概念の登場によって、リンパ節転移の有無が低侵襲な検査によって確実に診断できるようになった。すなわち、センチネルリンパ節に転移があれば、その他の所属リンパ節にも転移がある可能性が高く、郭清術の適応となり、センチネルリンパ節に転移がなければ郭清術は不必要となる。このことより、不必要な予防的郭清術（転移がないのに郭清する）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。本人の文書による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）：インジゴカルミン 1 静注 20mg（第一三共）または 1-2%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（インジゴカルミン 3-5ml または院内調整 1-2%パテントブルー 1-2ml）を注射する。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例の登録を目標にしていたが、試験終了の平成22年3月31日現在、総登録症例は98例となり、当初の目標をほぼ達成できた。各大学病院別では群馬大学15例、東京大学11例、岡山大学20例、産業医科大学25例、九州大学27例であった。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、技術的な問題はないものと思われた。登録症例のうち群馬大学病院での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、この疾患は手術全般に認められるもので、センチネルリンパ節生検に特異的なものではない。また、その症例に関しても適切な治療により後遺症なく軽快、退院している。その他の症例97例では、重篤な有害事象は認められなかった。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）は認めていないことから、診断精度の高さを示していると思われる。

今後は、施行症例の予後を慎重に経過観察する予定。臨床試験登録（試験番号：UMIN000001097）

D. 考察

1) 達成度について

3年間で100例の登録を目標にしていたが、試験終了の平成22年3月31日現在、総登録症例は98例となり、当初の目標をほぼ達成できた。

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、微小ながら既に転移したリンパ節、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重篤な有害事象は報告されていないが、厚生労働省がん研究助成金15-10での検討においても、国内ではアレルギー反応の報告すらない。前述のように今回の試験でも重篤な有害事象も1例のみで、この検査の安全性はほぼ実証できたと考えられた。さらに、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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Moroi Y. Significance of sentinel lymph node biopsy in malignant melanoma: Overview of international data. Int J Clin Oncol,14(6): 485-489,2009.2.
- ② 師井洋一. 悪性黒色腫の治療マニュアル,福岡医学雑誌,100(2): 51-58,2009.
- ③ 師井洋一. センチネルリンパ節の同定と転移診断,新しい皮膚科検査法,実践マニュアル MB Derma,151: 136-141,2009
- ④ 師井洋一. 進行期悪性黒色腫に対する樹状細胞療法,-現状と展望-,Biotherapy,23(6): 436-440, 2009.
- ⑤ 師井洋一 樹状細胞療法 -今後の展望- Skin Cancer 24 (2): 153-158, 2009
- ⑥ 師井洋一. 化学療法 新しい投与方法-動注と外用- 日本皮膚科学会雑誌 119: 2834-2837 2009

2. 学会発表

- ① 師井洋一. 化学療法 新しい投与方法-動注と外用- 第 108 回日本皮膚科学会総会, 2009/4/24-26. 福岡
- ② 師井洋一. 樹状細胞療法,第 25 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会,2009/5/25-26, 岡山
- ③ 師井洋一. 免疫療法,第 47 回日本癌治療学会学術集会,2009/10/22-24,横浜
- ④ 師井洋一. 植皮と皮弁の使い分け 皮膚科医の立場から,第 61 回日本皮膚科学会西部支部学術大会,2009/10/24-25,別府

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 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：早期悪性黒色腫に対するセンチネルリンパ節生検は病期決定において不可欠な情報をもたらす。しかし、進行期悪性黒色腫に対する治療法は奏効率の低い化学療法以外にエビデンスのある治療法は存在しない。我々は第4期悪性黒色腫症例に対して放射線治療を試みたので報告する。

A. 研究目的

進行期悪性黒色腫症例における放射線療法の有用性を検討した。

B. 研究方法

第4期悪性黒色腫症2例に対して放射線治療を試みた。

C. 研究結果

症例1：71歳男性

主訴：嚥下障害、嘔声

現病歴：2008年10月頃から嘔声、12月から嚥下障害12月のCTで頸部から上縦隔に巨大な腫瘍鎖骨下リンパ節腫大あり、針生検でセミノーマの疑い当院放射線科紹介、入院。食道内視鏡で、黒色の隆起性病変が多発同部の生検で悪性黒色腫の診断。

検査結果：CT上、上中食道を取り囲むような巨大な腫瘍を認め、FDG-PETでも同部位の高集積を認めた。また腹腔内にも数cmの転移巣を認めた。

経過：食道閉塞を予防する目的で緩和照射を開始（3Gy 10Fr予定）したところ、腫瘍の縮小が認められ、最終的に3Gy 15Frを照射した。照射後は嚥下困難も消失した。照射後6ヶ月で腹腔内の転移巣増大等により死亡されたが、食道の通過障害は再発しなかった。

症例2：12歳女性

主訴：背部皮下腫瘍（術後）

現病歴：平成12年頃、背部正中の小豆大常色ドーム状腫瘍徐々に増大。平成13年12月：MRIで「脂肪腫」と診断。平成14年12月：弾性硬の約4cm大腫瘍、圧痛を伴う再度MRIの後、摘出術。悪性黒色腫が疑われ、平成15年1月当科紹介受診。

治療経過：平成15年腫瘍拡大切除、左腋窩郭清。平成18年左胸膜転移、切除。平成19年左胸膜転移再発。化学療法を計8クール施行しP.D.平成20年放射線療法開始。準根治照射として3Gy 20Frを照射。照射後8ヶ月PR継続中。

D. 考察

悪性黒色腫は放射線抵抗性の腫瘍として有名である。しかし、その根拠は曖昧ではっきりとしたエビデンスがある訳ではないようである。事実、近年の脳転移に対する定位照射に関しては90%の症例で腫瘍増大を抑制し、50%の症例で腫瘍縮小効果が認められてとの報告もあり、臨床の現場でもその効果は実感している。骨転移に対する緩和照射に関しても、20-80%で疼痛緩和効果が報告されている。1980年代の文献では、1回4Gy以下では奏効率が36%であるのに対し、4Gy以上では82%と1回線量を上げる事によって有効症例が増える事が示唆されている。

今回の2症例に関しても他に治療法のない症例に対して放射線照射を施行した。症例1では最低6ヶ月、症例2でも8ヶ月のPR期間を達成している。今回のPR達成には上記のように、1回線量を3Gyと増量した事が関与している可能性が高い。部位によっては照射が困難な場合も多いが、近年の照射技術の向上によりその制限も少なくなりつつある。今回は症例報告ではあるものの、照射できる条件が揃えば、進行期悪性黒色腫の症例でも治療のオプションとなりうると思われた。

E. 結論

悪性黒色腫における放射線療法は無効であると考えられてきたが、進行期症例では治療のオプションとなりうると思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Moroi Y. Significance of sentinel lymph node biopsy in malignant melanoma: Overview of international data., Int J Clin Oncol, 14(6): 485-489, 2009.

2. 学会発表

- ①. 竹井賢二郎、伊東孝通、久場洋子、江崎仁一、中原剛士、田代あかり、内博史、高畑和正、師井洋一、古江増隆、放射線治療を施行したIV期悪性黒色腫の2例。
日本皮膚科学会第 352 回福岡地方会。
2010.3.13

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、2010年3月までに総計102症例に対して施行した。2009年には14症例に対してセンチネルリンパ節生検を行った。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。転移が陽性であったのは4例であった。4例中3例は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あり、リンパ節郭清を施行したが、1例はRT-PCR法のすべてのプローブで陽性であったため、HE染色、免疫組織化学染色が陰性であったが、転移陽性と判断し、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および安全性の確認試験を行う。

C. 研究結果

2009年の1月～2009年12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・生検可能であった。重篤な有害事象は認めなかった。現時点で、2008年からの臨床試験登録症例に、偽陰性症例を認めていない。

この臨床試験以前にセンチネルリンパ節生検を施行した症例に偽陰性を認めたので、報告する。

患者 50歳男性

主訴 右前胸部の黒褐色結節

病歴 2002年、前胸部に黒色斑が出現。2007年6月、徐々に隆起し近医より当科を紹介受診。全切除生検(2mm margin)の結果、悪性黒色腫の診断(図)。2007年7月、右腋窩センチネルリンパ節3個生検施行し、転移陰性と診断した(図)。以降、外来でインターフェロンの維持療法継続。術後2年9ヶ月の2009年4月に右腋窩のリンパ節腫大。生検で転移の診断となり郭清術施行。郭清リンパ節には転移を認めなかった(0/7)。郭清術後、再び経過観察中。

D. 考察

この臨床期間中に27例のセンチネルリンパ節生検を行った。すべての症例でセンチネルリンパ節は同定可能で、重篤な有害事象もなく生検できた。この手技自体は安全に施行できるものと考えられる。

このセンチネルリンパ節生検でもっとも大きな問題となるのが、偽陰性の発生である。センチネルリンパ節が転移陰性と診断されたにもかかわらず、所属リンパ節領域に転移を認めることを示す偽陰性をいかにして少なくするかが、この検査の診断精度、信頼性をあげる決め手となる。幸い、試験期間中の偽陰性症例は認めなかったが、それ以前に施行した症例に生じたので、報告した。

偽陰性の生じた理由として以下をあげた。

①原発とリンパ節が距離的に近接しており、RIのshine through現象（原発付近に投与したRIによりリンパ節領域に集積したRIを見逃す）のため、本来のセンチネルリンパ節が隠蔽され同定できなかった。

②元来のリンパチャンネル（リンパ流）が原発巣の全切除生検によって変更され、異なるセンチネルリンパ節が生検された。

③センチネルリンパ節生検時にはリンパ節まで到達していなかった腫瘍細胞が原発巣とリンパ節間のリンパ管内に残存し、後日チャンネルの変更されたリンパ管に沿って異なるリンパ節へ到達、増殖した。

①のshine throughはシンチカメラ撮影時にもうまく原発の遮蔽ができており(図)、センチネル同定に問題はなかった。また術中にRIプローブで確かにRI集積を認め、色素法でも青染したリンパ節を確認している事から、この点が原因とは考えにくい。

②に関しては、全切除生検はマージン2mmとぎりぎりで行っており、リンパチャネルの変更の可能性は低いと考えられた。ただ、切除後の縫合はリンパ流に影響しない方向をより慎重に考慮すべきだったかも知れない。以上から、やはり、③の可能性が高いと考えられた。この症例では原発巣と所属リンパ節は近接していたことから、拡大切除、センチネルリンパ節生検時にリンパ管合併切除を考慮すべきだったのかもしれない。

センチネルリンパ節生検の偽陰性率(偽陰性症例数/真の陽性症例+偽陰性症例)は、報告によると8.6-21.0%とされている。偽陰性に関連する因子として、高齢、腫瘍厚の薄いもの、脈管浸潤の少ないもの、とされている。我々の症例は、比較的予後良好と言われるverrucous malignant melanomaであったが、腫瘍厚は3.5mmと厚めで、年齢も50歳と比較的若年であった。

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行える検査法であり、今後はその有用性について慎重に検証していく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

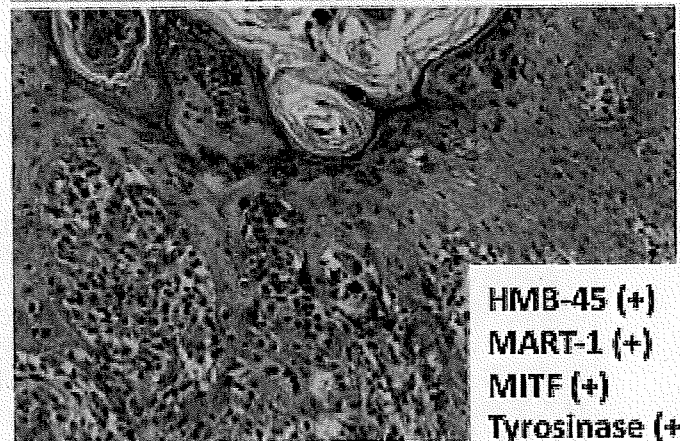
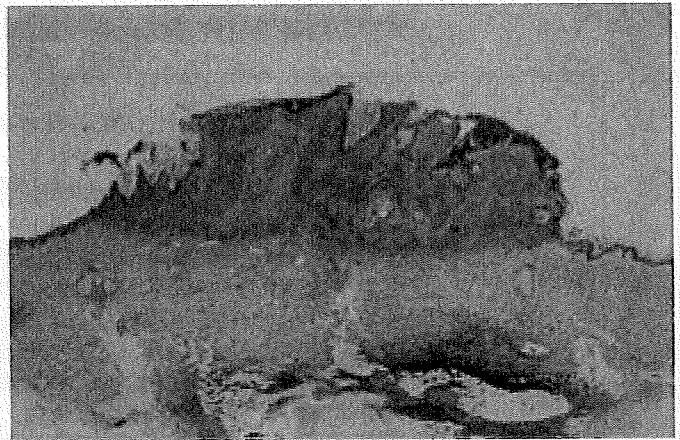
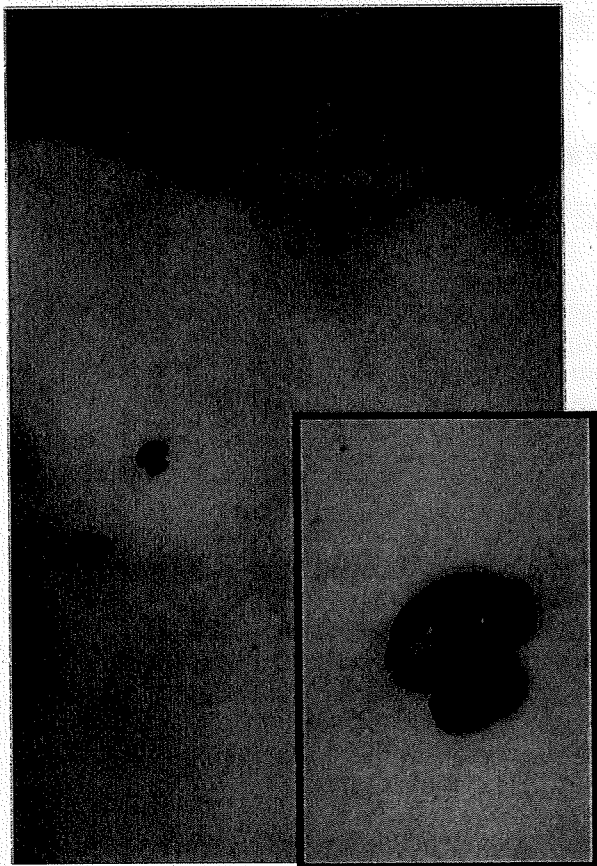
- ① Chen SJ, Nakahara T, Takahara M, Kido M, Dugu L, Uchi H, Takeuchi S, Tu YT, Moroi Y, Furue M. Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in epidermal tumours and its correlation with cyclin-dependent kinase 2. *Br J Dermatol.* 160:442-445, 2009.
- ② Chen SJ, Nakahara T, Kido M, Takahara M, Uchi H, Takeuchi S, Dugu L, Tu YT, Moroi Y, Furue M. Stromal cell-derived factor 1 expression in various skin tumours. *Br J Dermatol* 160:710-713, 2009.

2. 学会発表

- ① Nakahara T, Furue M. Cyclophosphamide enhances immune response by modulating dendritic cell subset balance and dendritic cell functions. 第13回日本がん免疫学会総会, 2009/6/24-25 小倉市
- ② Oba J, Nakahara T, Hayashida S, Moroi Y, Furue M. Expression of CD10, but not c-kit, predicts unfavorable tumor progression and survival of melanoma patients, 第34回日本研究皮膚科学会総会 2009/12/4-6, 福岡

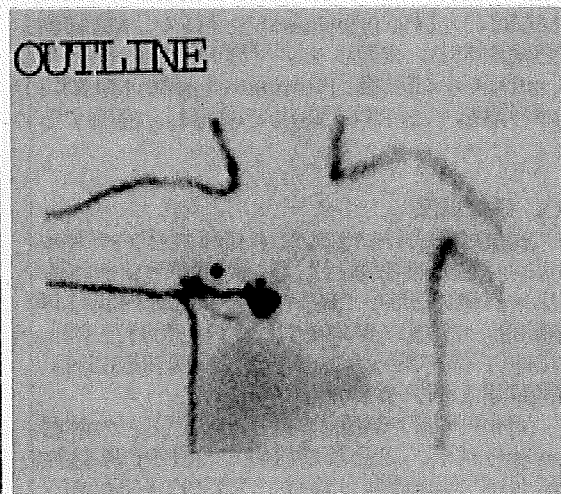
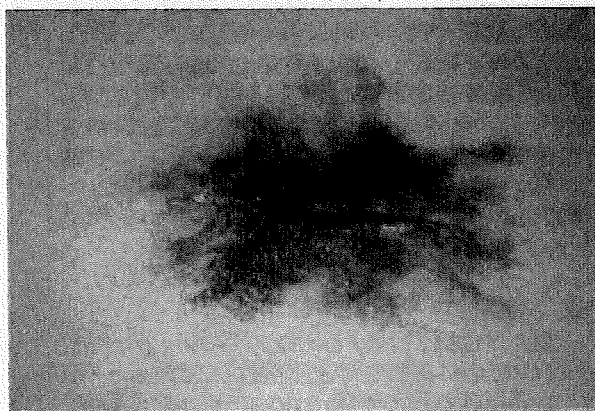
H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



HMB-45 (+)
 MART-1 (+)
 MITF (+)
 Tyrosinase (+)

Verrucous malignant melanoma: TT 3.5mm



センチネルリンパ節

右腋窩: 外側リンパ節 2個 免疫染色、RT-PCRすべて陰性
 内側リンパ節 1個 免疫染色、RT-PCRすべて陰性



pT3bN0M0 stage II B

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：2009年度岡山大学病院皮膚科において悪性黒色腫患者に施行し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。2009年1月～12月まで9例のSN生検を施行した。全例でSNを同定・摘出できた。患者内訳は男性2例、女性7例、年齢32～91歳（平均67.2歳）。原発部位は四肢5例、頭頸部2例、体幹2例であった。9例中4例がSN陽性であった。組織診断を重視し、4例中3例にリンパ節郭清を施行した。4例に組織診断とRT-PCRの結果に解離が見られた。

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。

摘出したリンパ節はHE染色および免疫組織化学染色（抗 S-100 蛋白、HMB-45 抗体、MART-1 抗体、Tyrosinase）を行い、腫瘍細胞を検出する。また、リンパ節の辺縁一部より、mRNA を抽出後、Tyrosinase, gp100, MART-1 の各遺伝子を RT-PCR 法で増幅し、検出する。

C. 研究結果

2009年1月～12月まで9例のセンチネルリンパ節生検を施行した。全例でセンチネルリンパ節を同定・摘出できた。患者内訳は年齢32～91歳（平均67.2歳）で男性2例、女性7例であった。原発部位は四肢5例、頭頸部2例、体幹2例であった。

9例中4例で組織診断とRT-PCRとの解離がみられた。組織診断陽性でRT-PCR陰性が3例、組織診断は陰性でRT-PCR陽性が1例。組織診断を重視し、9例中4例がセンチネルリンパ節陽性であった。4例中3例にリンパ節郭清を施行した。病期、年齢、基礎疾患、患者の希望を考慮し、化学療法が追加されている。

SN生検後の血液検査異常はなく、重篤な合併症は認めなかった。現在まで再発・転移は認めていない。

D. 考察

当科で行っている遺伝子診断は生検リンパ節辺縁を材料としている。その理由として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。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ている。

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。今回3例において組織診断陽性でRT-PCR陰性であった理由は、原発巣のRT-PCRは陽性であり、手技的な問題よりも、リンパ節組織の組織量が少なかったことが考えられた。

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る。

今回の症例は全例においてセンチネルリンパ節を同定・摘出できたが、組織診断と遺伝子診断の解離が多く見られた。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. Morizane S, Setsu N, Yamamoto Y, Hamada T, Nakanishi G, Asagoe K, Iwatsuki K. Ichthyosiform eruptions in association with primary cutaneous T-cell lymphomas. Brit J Dermatol 161, 115-120, 2009
2. 浅越健治、岩月啓氏. insect bite-like reaction—mantle cell lymphomaに伴って生じた例—. 皮膚病診療. 31(5) 601-604, 2009.

2. 学会発表

1. 浅越健治. 岡山大学での脈管肉腫の治療経験. ～過去15年18例の検討～. 第25回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2009. 5. 22-23.
2. 浅越健治. リンパ腫の画像診断 (PET/CT、超音波) ～リンパ節病変を中心に～. 第25回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2009. 5. 22-23.

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 21 年度集計を報告した。症例数は合計 6 例であり、性別は男 5 例、女 1 例であった。また、患者年齢は 38 才から 76 才で、平均 65 才であった。原発部位は足底 2 例、顔面 2 例、背部 1 例、胸部 1 例であった。全症例でセンチネルリンパ節を同定・摘出し、このうち 2 例は nested RT-PCR 法でチロシナーゼ遺伝子が陽性であった。有害事象のみられた症例はなかった。

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

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 6 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足底に生じた 2 例では鼠径であり、顔面に生じた 2 例は耳前部または頸部であった。背部に生じた 1 例と胸部に生じた 1 例はいずれも腋窩にセンチネルリンパ節を認めた。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表在型が 3 例と最も多く、次いで末端部黒子型が 2 例（うち 1 例は結果的に in situ）、結節型が 1 例であり、悪性黒子型の症例はなかった。Tumor thickness は in situ～6.0mm、平均 2.9mm であった。センチネルリンパ節の組織学および免疫組織学的検索では 1 例に微小転移を認めたが、残りの 5 例には転移の所見は見いだし得なかった。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 例のうち 1 例は組織学的にも一箇所のみ微小転移を検出したが、残りの 1 例では組織学的に転移を検出しえなかった。組織学的に微小転移を確認した 1 例ではセンチネルリンパ節 3 個のうち 2 個にチロシナーゼ遺伝子を検出したが、病理組織学的には 1 個のリンパ節にのみ転移を認めた。チロシナーゼ遺伝子陽性で、組織学的に転移を確認できなかった症例は tumor thickness 4.1mm の症例であり、この症例と組織学的転移を認めた症例の 2 例で所属リンパ節郭清術を追加した。チロシナーゼ遺伝子陰性で組織学的転移を認めた症例はなく、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。有害事象を生じた症例はなかった。また、現在までのところ 6 例全例において再発や転移は認めていない。

D. 考察

これら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を実施した 6 例全例において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. Hattori T, Amano H, Nagai Y, Ishikawa O. Leukemia cutis in a patient with acute monocytic leukemia presenting as unique facial erythema. J Dermatol. 35:671-674. 2008

2. 学会発表

1. 須藤麻梨子, 岡田悦子, 田村敦志, 石川治. 術後 12 年経過して転移を生じた頭皮原発 adenoid cystic carcinoma の 1 例. 第 25 回日本皮膚悪性腫瘍学会. 2009.5.22-23

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2009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10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、本年度も偽陽性が2例発生し、in situ 症例でもみられた。

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を腫瘍周囲に皮内注射し、直後および2時間後に所属リンパ節領域をシ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3名、女性6名 (64.11±10.80 歳)
Stage 0: 3名, Ia: 2名, Ib: 0名, IIb: 1名, IIc: 0名, IIIa: 1名, IIIb: 1名, IIIc: 0名, IV: 0名。SSM: 1名, NM: 1名, ALM 7名, LMM 0名。センチネルリンパ節の遺伝子検索を施行した患者数9名 (2007年は8名, 2008年は15名)。遺伝子検索における偽陽性2名。1例はin situであった。試薬へのRNAコンタミネーションが原因と考え、試薬再調製して再検討したところ陰性を確認した。

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9例全例において再発や転移は認めていない。

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. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, Tokura Y: Tumor cell expression of programmed cell death 1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 116: 1757-1766 2010.

2. 学会発表

1. 日野亮介, 栢島健治, 加藤悠, 中村元信, 八木宏明, 本庶祐, 岡崎拓, 戸倉新樹: Programmed cell death-1 ligand-1 発現はメラノーマの予後因子である. 第 13 回日本がん免疫学会総会学術大会 北九州, 2009
2. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, Tokura Y: Tumor cell expression of programmed cell death 1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. The 39th European Society for Dermatological Research Annual Meeting. Budapest, 2009.
3. 春山護人, 吉木竜太郎, 栢島利江子, 日野亮介, 尾藤利憲, 中村元信, 戸倉新樹. 熱傷瘢痕上に悪性黒色腫と有棘細胞癌が同時に生じた1例. 第25回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 岡山, 2009

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

班長研究協力者 門野 岳史・東京大学大学院医学系研究科皮膚科・講師

研究要旨：東京大学病院における平成21年度の症例数は6例で、男性5例、女性1例であった。部位としては、頭頸部1例、上肢1例、体幹2例、外陰部1例、下肢1例であった。Tumor thickness の分布は0.7-4mmで、検出されたセンチネルリンパ節の平均個数は2.3個であった。今年度の症例ではセンチネルリンパ節陽性症例が2例であり、所属リンパ節の廓清を行っている。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21年度の症例数は6例で、男性5例、女性1例であった。部位としては、頭頸部1例、上肢1例、体幹2例、外陰部1例、下肢1例であった。Tumor thicknessの分布は0.7-4mmで、検出されたセンチネルリンパ節の平均個数は2.3個であった。今年度の症例ではセンチネルリンパ節陽性症例が2例であり、所属リンパ節の廓清を行っている。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を超えらると思われるものに関しては、現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。昨年度も同様の症例を経験している。両症例共に原発巣を切除した後に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(Chir Ital 56:107, 2004)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、今年度の右上背部に生じた悪性黒色腫の症例でセンチネルリンパ節として両腋窩リンパ節に加えて、右背部と項部にinterval nodeと思われるリンパ節が検出されている。実際に病変から3方向にフチン酸コロイドが流れるのも確認された。腰より上の体幹背面においてinterval nodeが約10%に検出されているとNguyen BDにより報告されている(J Nuclear Med 44:570, 2003)。また、症例報告として、項部にセンチネルリンパ節が検出された例が報告されているが、頻度に関しては不明である(Clin Nucl Med 30:34, 2005)。本症例では転移が見られたのは右腋窩のリンパ節のみであったが、このような症例ではやはり色素法とRI法の両者が必要であることを再認識させてくれる。

E. 結論

前年度と同様であるが、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、症例数を集めるのが難し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が、これは申請時にガンマプローブを当施設で保有しておらずリースコストを計算したこと起因する。また、症例数が少ないため特にRT-PCRのテクニカルな問題もあるものと考えられる。今後も症例を地道に積み上げて、実績を上げていきたいと考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 門野岳史. 皮膚外科による治療. からの科学 262: 109-112, 2009.

2. 門野岳史. 手術が適応となる疾患・ならない疾患 知っておきたい皮膚病の常識・非常識. *Derma* 160: 33-38, 2009.
3. Miyagaki T, Sugaya M, Kagami S, Nakashima H, Ishiura N, Watanabe R, Ohmatsu H, Fujita H, Yazawa N, Kadono T, Fujimoto M, Saeiki H, Tamaki K. Increased CCL1 levels in the sera and blister fluid of patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 54: 45-47, 2009.
4. Yabunaka K, Iizaka S, Nakagami G, Aoi N, Kadono T, Koyanagi H, Uno M, Ohue M, Sanada S, Sanada H: Can ultrasonographic evaluation of subcutaneous fat predict pressure ulceration? *J Wound Care* 18: 192-198, 2009.
5. Aoi N, Yoshimura K, Kadono T, Nakagami G, Iizuka S, Higashino T, Araki J, Koshima I, Sanada H: Ultrasound assessment of deep tissue injury in pressure ulcers: possible prediction of pressure ulcer progression. *Plast Reconstr Surg* 124:540-550, 2009.

2. 学会発表

1. 岡田麻子, 門野岳史, 中島広子, レパヴァー・アンドレ, 常深祐一郎, 前川武雄, 多田弥生, 菅谷誠, 菊池かな子, 玉置邦彦. 臨床的に境界不明瞭で特異な経過をたどった悪性黒色腫の1例. 第25回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会. 2009.5.22-23.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
Moroi Y.	Significance of sentinel lymph node biopsy in malignant melanoma: Overview of international data.	Int J Clin Oncol	14	485-489	2009
師井洋一	悪性黒色腫の治療マニュアル	福岡医学雑誌	100	51-58	2009
師井洋一	センチネルリンパ節の同定と転移診断, 新しい皮膚科検査法, 実践マニュアル	MB Derma	151	136-141	2009
師井洋一	進行期悪性黒色腫に対する樹状細胞療法- 現状と展望 -	Biotherapy	23	436-440	2009
師井洋一	樹状細胞療法 -今後の展望 -	Skin Cancer	24	153-158	2009
師井洋一	化学療法 新しい投与方法- 動注と外用 -	日本皮膚科学会雑誌	119	2834-2837	2009
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	442-445	2009
Chen SJ, Nakahara T, Kido M, Takahara M, Uchi H, Takeuchi S, Dugu L, Tu YT, Moroi Y, Furue M.	Stromal cell-derived factor 1 expression in various skin tumours.	Br J Dermatol	160	710-713	2009
Morizane S, Setsumi N, Yamamoto Y, Hamada T, Nakanishi G, Asagoe K, Iwatsuki K	Ichthyosiform eruptions in association with primary cutaneous T-cell lymphomas.	Br J Dermatol	161(1)	115-120	2009
浅越健治, 岩月啓氏.	insect bite-like reaction - mantle cell lymphoma に伴って生じた例 -	皮膚病診療	31	601-604	2009