黒色腫の診断法と蛍光法・HMB-45染色

——術前に確定診断した悪性黒色腫——

—ホルマリン固定パラフィン包埋同一切片の
蛍光法的・HMB-45免疫染色所見を加えて—

森嶋智津子* 森嶋 隆文* 吉沢 公人*
原 弘之* 本庄三知夫* 落合 豊子*

Summary

A violaceous erosive-elevated lesion, 16×14×8mm, occurring on the left thigh in a 20-year-old man (case 1) and a blackish erosive-raised lesion, 16×15×10mm, arising on the right lower jaw in a 31-year-old man (case 2) were examined by HPLC measurement of 5-S-Cysteinyldopa (5-S-CD) levels in gauze exudates and by the touch fluorescence method from the surface of the lesions. As a large number of fluorescent melanoma cells were observed under the fluorescence microscopy, and 5-S-CD values showed high level in gauze exudates in both 2 cases, the definite diagnosis of malignant melanoma was made before operation. Pathological findings showed superficial spreading melanoma, stage III, pT_{4a}N₁M₀ in case 1, and nodular melanoma, stage III, pT_{4a}N₁M₀ in case 2, respectively. The fluorescent melanoma cells in unstained formalin-fixed paraffin-embedded specimen were classified into 5 types. These types of cells, except for round (epithelioid) cells, were positive for HMB-45 immunostaining. From these results, it is confirmed that the findings of the touch fluorescence method and the measurement of 5-S-CD levels in gauze exudates are useful for the preoperative diagnosis of malignant melanoma, and that the observation of unstained specimen under the fluorescence microscopy is a simple and valuable method for demonstrating the melanogenic activities in melanoma cells, which are verified by the positive findings of HMB-45 immunostaining.

はじめに

我が国では悪性黒色腫の生検は禁忌とされ、診断は通常臨床的観察でなされるので、黒色腫でないのに広範囲切除術、黒色腫であるのに小

切除が行われる恐れがある。その正診率は約80%との報告がある。我々は、このような誤診例を避けるため、メラニン代謝の主要中間代謝産物である5-S-Cysteinyldopa (5-S-CD) の組織化学的証明や化学的定量による黒色腫の新しい診断法の開発を志してきた。現在、教室で行っている黒色腫原発巣の診断手順¹⁾は、(1)尿中・血中5-S-CD値を測定してstageを推定する、(2)術前診断法として湿潤性(潰瘍性)病変であれば病巣表面からのスタンプ蛍光法とガーゼ滲出液中5-S-CD値の測定、非潰瘍性病変であれ

* Chizuko MORISHIMA, Takafumi MORISHIMA, Koujin YOSHIZAWA, Hiroyuki HARA, Michio HONJOU, Toyoko OCHIAI : 日本大学皮膚科学教室

ば穿刺吸引蛍光法を行う、(3)術中迅速診断法として病巣断面からのスタンプ蛍光法と病巣中5-S-CD値の測定を行う、(4)ホルマリン固定パラフィン包埋未染標本（未染標本と略記）を蛍光顕微鏡下に観察し、メラニン産生能の証明や病型の判定の一助とする、(5)腫瘍マーカーとして血中・尿中5-S-CD値を経時的に測定することである。

最近、我々は、若年者に生じた表在拡大型黒色腫（SSM）と結節型黒色腫（NM）のそれぞれ1例を経験し、病巣表面からのスタンプ蛍光法に加え、ガーゼ滲出液中5-S-CDの測定が術前の補助診断法として有用であることを明らかにし、また未染標本を蛍光顕微鏡下に観察した後、この切片にHMB-45免疫染色を施し、蛍光性黒色腫細胞とHMB-45染色性との相関についても検討したので、症例の概要を記するとともに得られた知見について考察してみたい。

症 例 1

患 者：20歳、男性

初 診：平成6年3月2日

家族歴・既往歴：特記すべきことはない。

現病歴：中学生の頃から存していた黒色色素斑が6ヵ月前から拡大、隆起し、最近、易出血性となったため、黒色腫あるいは化膿性肉芽腫が疑われ、当科を紹介された。

現 症：左大腿中央前面に16×14×8 mm、黒褐色痂皮を付して湿潤性、紫紅色、広基性の結節がみられ、これに接して遠位側に幅2 mm、境界明確、扁平台状の黒褐色色素斑を認める（図1-A）。左鼠径部に大豆大のリンパ節2個を触知した。

術前診断：黒褐色色素斑に紫紅色の湿潤性結節が生じており、SSMの疑診で次の術前診断法を試みた。

1) ガーゼ滲出液中5-S-CD値の測定²⁾

抽出法：病変部に24時間圧迫固定して得られたガーゼをコンホルターにに入れて遠心管に装着し、4 M過塩素酸（Perchloric Acid, PCA）10 mlを加え、10分間浸漬、3,000rpm、5分間遠心し、上清をAnton and Sayreの方法でアルミナ吸着を行い、0.1N HClで溶出し、HPLCで測定した。

機器および分析条件：HPLC Jasco 880-PUと電気化学検出器840-ECを用い、分析条件は、試料量：20 μ l、カラム：Finepak（4.6mmID+250mmL+4.6mmID+150mmL）、カラム温度：40℃、流速：1.0ml/min、移動相：0.1Mリン酸緩衝液、設定加電圧：0.7V 対 Ag/AgCl である。

結 果：これまでの測定値は167.1～3,196 ng/PCAmIであり、黒色腫であれば滲出液中5-S-CD値は100ng/PCAmI以上の高値を示すと考えている。本例の5-S-CD値は698.0ng/

A

B

図1. 臨床像(A)とスタンプ蛍光法の所見・ガーゼ滲出液中5-S-CD値(B)（症例1）

PCAmI であった。

2) スタンプ蛍光法 (病巣表面)¹⁾

肉芽腫性隆起病変の表面に無蛍光スライドガラスを直接圧抵してスタンプ標本を作製し、これに20分間、formaldehyde gas 処理を行い、流動パラフィンで封入し、蛍光顕微鏡下に観察した。悪性黒色腫を思わす所見は、(1)蛍光性腫瘍細胞が多数観察されること、(2)特異蛍光は核を避けて細胞質に局在し、ときに細胞質内にメラニン顆粒がみられること、(3)蛍光性腫瘍細胞に大小不同や種々の細胞形態などの異型性がみられることである。本例の蛍光法的所見は図1-Bに示すが、緑色～黄緑色の特異蛍光を発する大小不同のある円形細胞や樹枝状細胞が多数認められた。

以上、スタンプ蛍光法の所見に加えてガーゼ滲出液中 5-S-CD の平均値は 2,334.0ng/PCAmI と高値で、本症例を悪性黒色腫と術前に診断し、広範囲切除術とリンパ節郭清術を行った。尿中5-S-CD 値は術前140.9 μ g/day、術後20.2 μ g/day であり、広範な転移はないものと考えられた。

病理組織学的所見：図1-A の挿図に示すように腫瘍は有茎性で、病巣の下層は周辺表皮の高さにほぼとどまっている。色素斑では肥厚した表皮内に pagetoid 細胞や紡錘形細胞が胞巣状～孤立性に認められる。腫瘍部の被覆表皮は萎縮性で、基底層に主として pagetoid 細胞が稠密にみられ、真皮内の黒色腫細胞の主な細胞型は類上皮細胞様細胞で、大小の球状胞巣を形成するが、胞巣内に多形細胞や紡錘形細胞が混在し、所々に核分裂像を認め、異型性が顕著である。Masson-Fontana 染色でみると、黒色腫細胞内にメラニン顆粒は乏しく、間質にメラノファージが所々に認められた。tumor thickness は5.7mm、郭清したリンパ節に転移を認めた。

以上の所見から、stage III、pT_{4a}N₁M₀の penduculated SSM と確定診断した。

ホルマリン固定パラフィン包埋未染標本の蛍光法的所見と同一切片の HMB-45免疫染色所見(原発巣)：今回の研究の目的は蛍光性黒色腫細胞の細胞型と黒色腫関連抗体である HMB-45免疫染色の染色性との相関を検討することである。

方 法：3 μ m の未染標本をキシロールで脱パラフィンし、流動パラフィンで封入し、蛍光顕微鏡下に観察する³⁾。写真撮影した後、この切片に HMB-45免疫染色を施し、蛍光顕微鏡で観察した部と同一の部を写真撮影した。蛍光性黒色腫細胞はスタンプ蛍光法の所見と異なり、特異蛍光は主として細胞質と核小体に存在し、蛍光性黒色腫細胞の細胞型を、(1)紡錘形細胞、(2)小紡錘形細胞、(3)円形細胞 (類上皮細胞様細胞)、(4)大型円形細胞 (pagetoid 細胞)、(5)多形細胞の5型に分類した。蛍光の局在は(4)の核小体核膜型の円形細胞を除けば、いずれも核小体細胞質型である。

観察所見：色素斑部では表皮は肥厚し、周辺健常皮膚と異なり、表皮層全体が緑色の蛍光を発する。表皮内の蛍光性黒色腫細胞は弱い緑色蛍光を発する大型円形細胞、黄緑色蛍光の小紡錘形細胞と緑色蛍光の紡錘形細胞の3型とからなり、いずれの細胞型も HMB-45陽性である(図2)。図3は腫瘍部の真皮内病変の所見を示すが、蛍光を発し HMB-45陽性細胞の多くは紡錘形～小紡錘形細胞であるが一部は多形細胞である。

症 例 2

患 者：31歳、男性

初 診：平成4年4月10日

家族歴・既往歴：特記すべきことはない。

現病歴：右下顎部に生下時から黒色色素斑があり、小学生の頃、径5mm位の扁平台状の黒色色素斑であったという。黒子と思い放置していたが、2年前から拡大、隆起し、出血を繰り返すようになった。また、1年前から病変部の

図2. 未染標本の蛍光法的所見(A)と同一切片のHMB-45免疫染色所見(B)(症例1, 色素斑部)

図3. 未染標本の蛍光法的所見(A)と同一切片のHMB-45免疫染色所見(B)(症例1, 腫瘤部)

下端に色素の滲み出しが生じた。

現 症：右下顎隅部に16×15×10mm, ドーム状に隆起し, 表面が全体に湿潤した黒色結節がみられる(図4-A)。この結節の下端から後側にかけて幅2mmの黒色色素斑がとりまいて認められた。所属リンパ節の特記すべき腫大は

ない。

術前診断：初診時病巣表面からのスタンプ蛍光法を行い, 乾ガーゼを24時間圧迫固定して, 翌日ガーゼ滲出液中5-S-CD値を測定することにした。図4-Bに示すように蛍光性黒色腫細胞の存在が確認され, ガーゼ滲出液中5-S-CD値

も1,471.7ng/PCAmI と高値で、術前に悪性黒色腫と確定診断した。術前の尿中5-S-CD 値は146.2 μ g/day と正常範囲で、病変の高さは10 mm であり、stage III と考え、広範囲切除術とリンパ節郭清術とを行った。

病理組織学的所見：腫瘤部表皮は概ね欠損しているが、病巣辺縁に残存する一側の表皮突起内に細胞質好酸性、大型の核を有する多形細胞が浸潤し、他側の滲み出し様色素斑では異型境界部活性がみられ、HMB-45免疫染色でみると

紡錘形～樹枝状細胞からなる。真皮内腫瘍巢の主な細胞型はメラニン顆粒に富む類上皮細胞様細胞である。tumor thickness は5.2mm, 郭清したリンパ節に転移を認め、stage III, pT_{4a}N₁M₀である。

ホルマリン固定パラフィン包埋未染標本の蛍光法的所見と同一切片のHMB-45免疫染色所見(原発巣)：図5は表皮内に浸潤する腫瘍細胞の所見を示すが、緑色～黄緑色の多形～円形の蛍光性黒色腫細胞はHMB-45陽性である。図6

A

B

図4. 臨床像(A)とスタンプ蛍光法的所見・ガーゼ滲出液中5-S-CD 値(B) (症例2)

A

B

図5. 未染標本の蛍光法的所見(A)と同一切片のHMB-45免疫染色所見(B)
(症例2, 病巣辺縁部, 表皮内病変)

図6. 未染標本の蛍光法的所見(A)と同一切片の
HMB-45免疫染色所見(B)
(症例2, 病巣辺縁部, 表皮内・真皮内病変)

は表皮内と真皮内の所見を示す。表皮内の多形細胞や紡錘形細胞は緑色～黄緑色の蛍光を発し、HMB-45免疫染色では奇怪な大型細胞で、これに紡錘形～樹枝状細胞が混在している。真皮内の弱い緑色の円形細胞はHMB-45免疫染色陰性で、メラニンが豊富である。

考 案

我々の悪性黒色腫の診断手順に、最近新たに加わったガーゼ滲出液中5-S-CD値の測定と未染標本の蛍光法的所見について考察を進めることにする。

かつて、原発巣が自然消褪した13歳女児の下肢罹患例を経験した際、鼠径部の皮下硬結の切開創の黒色分泌物中5-S-CD値を測定してみた。その値は3,300ng/mlであり、皮下硬結が黒色腫であることが示唆され、病理組織学的に転移巣であることを確認し得た。これを契機として、肉芽腫様隆起病変を被っていたガーゼ滲出液中5-S-CD値測定による黒色腫の術前診断法の開発を志した²⁾。これまでの結果を要約す

ると、今回の2例を含む皮膚色素性原発性黒色腫10例中7例(SSM 2例, NM 5例)で、滲出液中5-S-CD値の平均値は744.8ng/PCAm/l (167.1～3,196.2)と高値で、acral lentiginous melanoma 3例は検出不能であった。皮膚無色素性の原発2例と転移1例の5-S-CD値は平均953.1ng/PCAm/l (434.3～1,290.0)であった。なお、黒色腫と鑑別を要する結節潰瘍型基底細胞上皮腫10例中4例で5-S-CDは検出可能であったが、その値は平均28.0ng/PCAm/l (11.4～38.2)と低値であった。無色素性黒色腫との異同が問題となる化膿性肉芽腫5例全例、5-S-CDは検出不能であった。以上の結果から、ガーゼ滲出液中5-S-CD値が100ng/PCAm/l以上の高値を示せば、色素性あるいは無色素性病変が黒色腫である可能性が大で、本法は侵襲の少ない悪性黒色腫の術前診断法であると考えた。

藤田・森嶋³⁾は悪性黒色腫や色素性母斑の未染標本で蛍光顕微鏡下に観察されるメラニン産生細胞の蛍光は組織蛍光法(Falck & Hillarp)やスタンプ蛍光法の所見と異なって核小体と細胞質に局在し、組織化学的検索から主として5-

S-CD による特異蛍光であることを明らかにし、本法は melanotic でも amelanotic でも黒色腫のメラニン産生能の証明法として、また黒色腫と他の色素性腫瘍の鑑別診断法として簡便かつ有用な方法であることを報告した。先に我々は、滲み出し様色素斑を伴った結節型黒色腫例を経験した際、未染標本の蛍光法的所見と同一切片の HMB-45 免疫染色所見について対比してみた⁴⁾。その結果、異型境界部活性の腫瘍細胞は蛍光法では小紡錘形細胞、HMB-45 染色では樹枝状細胞として観察され、真皮上層の紡錘形細胞は強い蛍光を発し、HMB-45 陽性であったが、真皮中層の円形細胞（類上皮細胞様細胞）は蛍光を発せず、HMB-45 陰性であった。今回の 2 症例では、いずれの細胞型でも強弱があるものの蛍光を発し、円形細胞（類上皮細胞様細胞）を除けば HMB-45 染色は陽性であった。黒色腫細胞が発する特異蛍光の蛍光起因物質はメラニン代謝主要中間代謝産物である 5-S-CD であること、免疫電顕で HMB-45 の反応の場は melanosome、ことに early melanosome

であることを考慮に入れると、蛍光性黒色腫細胞と HMB-45 染色性とがかなりの確度で相関することは当然のことのように思われる。以上、未染標本の蛍光顕微鏡的観察がメラニン産生細胞のメラニン産生能の証明に簡易かつ優れた方法であることが HMB-45 免疫染色の観点から実証された。

文 献

- 1) 森嶋隆文：悪性黒色腫の 5-S-Cysteinyldopa による診断. *Skin Cancer*, 10: 9-19, 1995.
- 2) 吉沢公人, 森嶋隆文：ガーゼ滲出液中 5-S-CD 値の測定による悪性黒色腫の術前診断法. *日皮会誌*, 105: 723-731, 1995.
- 3) 藤田日出雄, 森嶋隆文：ホルマリン固定パラフィン包埋未染標本の蛍光顕微鏡的観察による悪性黒色腫の診断. *皮膚*, 37: 239-251, 1995.
- 4) 森嶋智津子, 森嶋隆文, 藤田日出雄, 他：滲み出し様色素斑を伴った足底の結節型黒色腫—蛍光法的所見と HMB-45 免疫染色所見について—. *皮膚臨床*, 37: 75-80, 1995.