Spitz 母斑と結節型黒色腫の鑑別

細胞核 DNA 量分析 (cytofluorometry) と未染標本の
蛍光法・HMB-45免疫染色による Spitz 母斑と結
節型黒色腫の鑑別

涌井 史典* 森嶋 隆文* 森嶋智津子*
岡田 知善* 原 弘之* 落合 豊子*

Summary

In the study, it was determined whether cytofluorometry of nuclear DNA contents and fluorescence microscopic findings of formalin-fixed paraffin-embedded unstained specimens and immunostaining of the same specimens with HMB-45 could be used to differentiate amelanotic or melanotic Spitz nevus from amelanotic or melanotic nodular melanoma.

The mean of averaged nuclear DNA contents was $2.14 \pm 0.14C$ (2.00 to 2.39) in amelanotic Spitz nevus and $2.17 \pm 0.22C$ (1.96 to 2.62) in melanotic Spitz nevus, showing no significant difference between amelanotic and melanotic types. Histograms of nuclear DNA contents showed a diploid pattern in all cases of both amelanotic and melanotic types. The mean of averaged nuclear DNA contents was $3.64 \pm 0.52C$ (2.91 to 4.45) in amelanotic nodular melanoma and $3.22 \pm 0.55C$ (2.60 to 3.93) in melanotic nodular melanoma, showing no significant difference between the 2 types. Histograms disclosed an aneuploid pattern in all cases of nodular melanoma. The mean of averaged nuclear DNA contents in nodular melanoma was $3.43 \pm 0.56C$, which was significantly higher, as compared with $2.16 \pm 0.18C$ seen in Spitz nevus ($P < 0.0001$, Wilcoxon's test).

In terms of fluorescence microscopic findings of formalin-fixed paraffin-embedded unstained specimens and HMB-45 immunostaining, the junctional components of nodular melanoma showed fluorescence and strongly positive HMB-45. Although a portion of intraepidermal nests of spindle cells in Spitz nevus were composed of fluorescence-positive tumor cells, no fluorescence was observed in nests of epithelioid cell which were negative for HMB-45.

From these results, it was thought that precision of determination of benignancy or malignancy could be improved by a combination of cytofluorometry of nuclear DNA contents with fluorescence microscopic findings of formalin-fixed paraffin-embedded unstained specimens and HMB-45 immunostaining.

はじめに

* Fuminori WAKUI, Takafumi MORISHIMA,
Chizuko MORISHIMA, Tomoyoshi OKADA,
Hiroyuki HARA, Toyoko OCHIAI : 日本大学医
学部皮膚科学教室 (主任: 森嶋隆文教授)

1948年, Spitz¹⁾が, 小児期の悪性黒色腫は成人
のそれと異なって良性に経過することに着目

し、13例の臨床所見および病理組織学的所見の特徴を記載し、成人の悪性黒色腫と区別する意味で juvenile melanoma なる名称を提唱した。若年性黒色腫は、成人にもみられること、黒色腫なる語は一般に悪性を意味するので、近年 Spitz 母斑や spindle and epithelioid cell nevus なる名称が用いられることが多い。さて、Spitz が記載した13例のうち1例は全身転移で死亡しており、Spitz 母斑と悪性黒色腫の鑑別点について多くの記載がなされてきたが²⁾³⁾、これら鑑別表を用いても悪性黒色腫と厳密に区別しえない症例が存在することは諸家の指摘するところである。たとえば、Okun⁴⁾は melanoma resembling spindle and epithelioid cell nevus の標題のもとに3例を報告し、思春期発症例は2例で、その1例は、7人の病理学者のうち6名が Spitz 母斑とし、他の1例は、4人のうち2名が Spitz 母斑と診断したという。Goldes ら⁵⁾は melanoma masquerading as Spitz nevus として8歳の男児例を報告し、悪性黒色腫と確定診断されるまでに、リンパ節郭清術を含めて6回の病理組織学的検索がなされ、5回目までは Spitz 母斑と診断されていたという。Conners, Chalet and Ackerman⁶⁾は、Spitz 母斑の特徴とされる病理組織学的所見は悪性黒色腫にもみられ、両疾患を鑑別することは一卵性双生児を鑑別するかのごとく困難とさえ記述している。McGovern⁷⁾は、Spitz 母斑を悪性黒色腫と誤診することよりは、悪性黒色腫を Spitz 母斑と誤診することが多いとしている。

このように、両疾患の鑑別が困難な例があり、新たな観点からの研究が望まれていた。これに関する研究の主流は現在細胞核 DNA 量の分析と思われる。さきに、われわれ⁸⁾は鑑別が最も困難と思われる無色素性の Spitz 母斑と無色素性黒色腫の鑑別に細胞核 DNA 量の分析が有用か否かを検討し、その結果、細胞核 DNA 量の分析は両疾患の鑑別に有力な客観的指標になりうることを報告した。

今回、われわれは後述する症例の確定診断を

依頼されたのを契機とし、新たに色素性の Spitz 母斑と結節型黒色腫の平均核 DNA 量の測定を行い、また、ホルマリン固定パラフィン包埋未染色標本（未染標本と略記）の蛍光法と同一切片の HMB-45（HMB と略記）免疫染色所見が両疾患の鑑別に有用か否かを検討したので、ここに報告する。

方 法

I. cytofluorometryによる細胞核DNA量分析

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから40 μ mの厚切り切片を作製し、既述の方法⁸⁾に従ってスメア標本を作製し、核染色には propidium iodide を用いた。オリンパス OSP-1 蛍光顕微鏡下で一標本について200個以上の腫瘍細胞の核 DNA 量を測定し、そのヒストグラムと平均値を求めた。対照としてリンパ球を用い、その値を2Cとした。

II. 未染標本の蛍光法と HMB-45免疫染色⁹⁾

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから3 μ m切片を作製し、脱パラフィン後流動パラフィンで封入し、落射式蛍光顕微鏡（最大励起波長420nm、最大蛍光波長480～485nm）下に観察した。特異蛍光はメラニン産生細胞の細胞質と核小体に局在する。写真撮影した後同一切片に HMB 染色（Lipshaw 社、米国）を施し、蛍光顕微鏡で観察した同一の部位を写真撮影した。なお、HMB 染色ではメラニン顆粒との鑑別のために DAB に NiCl₂ を加え群青色に発色させた。

被 験 症 例

Spitz 母斑と鑑別を要する悪性黒色腫の病型は色素性あるいは無色素性の結節型黒色腫と考えられる。無色素性 Spitz 母斑の8症例と無色素性の結節型黒色腫6例は既述した論文⁸⁾の症例である。今回、新たに色素性の Spitz 母斑8例と結節型黒色腫6例を被験材料とした。

結果ならびに観察例

表 1 に Spitz 母斑と結節型黒色腫の平均核 DNA 量を色素性と無色素性に分けて一括した。無色素性 Spitz 母斑の平均核 DNA 量の平均は $2.14 \pm 0.14C$ ($2.00 \sim 2.39$)、色素性の本母斑のそれは $2.17 \pm 0.22C$ ($1.96 \sim 2.62$) で両型間に有意差はない。色素性、無色素性ともに、ヒストグラムは全例 diploid pattern を示した。無色素性の結節型黒色腫の平均核 DNA 量の平均は $3.64 \pm 0.52C$ ($2.91 \sim 4.45$)、色素性のそれは $3.22 \pm 0.55C$ ($2.60 \sim 3.93$) で両型間に有意差はなく、ヒストグラムは全例 aneuploid pattern であった。結節型黒色腫全例の平均核 DNA 量の平均は $3.43 \pm 0.56C$ であり、Spitz 母斑の平均値 $2.16 \pm 0.18C$ に比して有意に高値を示していた ($p < 0.0001$, Wilcoxon 検定)。

色素性の Spitz 母斑と結節型黒色腫の未染標本の蛍光法と HMB 染色の所見は稿を改めて記載する予定であるので、以下に代表例についてその所見とヒストグラムを呈示する。

図 1 (既述論文⁸⁾の症例 5) は 1 歳 1 ヶ月男児の左頬部に生じた $12 \times 16 \text{ mm}$ の無色素性 Spitz 母斑で、病理組織学的には mixed cell type で紡錘形細胞巢の一部に蛍光性腫瘍巢が認められた。図 1-a に示すように、一部の紡錘形細胞巢は緑色～黄緑色蛍光を発する紡錘形細胞が表皮から乳頭層にかけて流れ落ちるかのように配列し、図 1-b に示すように、これら蛍光性腫瘍細胞は HMB 陰性である。平均核 DNA 量は $2.15C$ で、ヒストグラムは diploid pattern である

表 1. Spitz 母斑と結節型黒色腫の平均核 DNA 量

1. Spitz 母斑	
無色素性 (n = 8)	$2.14 \pm 0.14C$
色素性 (n = 8)	$2.17 \pm 0.22C$
2. 結節型黒色腫	
無色素性 (n = 6)	$3.64 \pm 0.52C$
色素性 (n = 6)	$3.22 \pm 0.55C$

(図 1-c)。

図 2 は 20 歳男性の前胸部にみられた径 7 mm の色素性 Spitz 母斑例である。表皮内から乳頭層にかけて蛍光が核小体に強く細胞質では極めて弱い類上皮細胞型胞巣がみられ、胞巣の一部に黄緑色蛍光の小紡錘形細胞がみられる (図 2-a)。類上皮型細胞は HMB 陰性で、小紡錘形細胞は HMB 陽性で樹枝状形態を示す (図 2-b)。平均核 DNA 量は $1.95C$ で diploid pattern を示した (図 2-c)。

図 3 (既述論文⁹⁾の症例 19) は 22 歳女性の右上腕に発症した $6 \times 3 \text{ mm}$ の無色素性結節型黒色腫例の所見を示す。表皮直下から真皮にかけて蛍光を欠く円形細胞が稠密に浸潤し、腫瘍巢の一部に黄色蛍光の多形細胞と緑色蛍光の円形細胞が小胞巣状～個別性に認められる (図 3-a)。HMB 染色では多形細胞は強陽性で奇怪な形状を示すが、円形細胞は HMB 陰性である (図 3-b)。平均核 DNA 量は $2.91C$ で aneuploid pattern を示した (図 3-c)。

図 4 は 29 歳男性の右耳前部の $10 \times 9 \text{ mm}$ の色素性の結節型黒色腫例の所見を示す。図 4-a は異型境界部活性の所見で、紡錘形～円形～小紡錘形の蛍光性黒色腫細胞が大小の胞巣を形成し、また casting off した腫瘍細胞も蛍光を発する。HMB 染色では胞巣形成～個別性の蛍光性黒色腫細胞は HMB 強陽性で、しばしば樹枝状突起を伸ばす (図 4-b)。平均核 DNA 量は $2.60C$ 、aneuploid pattern を示した (図 4-c)。

以上の所見を踏まえて、第 12 回日本皮膚悪性腫瘍学会 CPC「メラノーマか nevus か？」に出題され、当教室に確定診断が依頼された 2 症例につき、プログラムからその概要を抜粋し、検索結果につきここに報告する。

CPC 1 : 14 歳女子の足縁に生じた黒色結節¹⁰⁾

1 年半前から出現した右足内側縁の $9 \times 9 \text{ mm}$ の表面に鱗屑を伴い、紅暈を有する黒色結節が認められ、2 mm 外方で全摘出した。病理組織学的には大型異形核と明瞭な核小体を有する胞体の豊かな腫瘍細胞が表皮真皮境界部から真

图 1. 無色素性 Spitz 母斑

图 2. 色素性 Spitz 母斑

图 3. 無色素性結節型黑色腫

图 4. 色素性結節型黑色腫

皮内に増生し、表皮内にも孤立性に散在する。核分裂像は少数で、真皮深層では全体に細胞が小型化し、色素性 Spitz 母斑と診断したという。図5-a に示すように表皮内に緑色～黄色の多形～円形の蛍光性腫瘍細胞の胞巣形成と孤立性増生とがみられ、これら細胞の多くは HMB 強陽性で、樹枝状形態や奇怪な形状を示すものが多い。有棘層内から角質層にかけて腫瘍巢の trans epidermal elimination 像がみられる(図5-b)。平均核 DNA 量は3.40C で aneuploid pattern であった(図5-c)。以上の所見は悪性黒色腫を思わせる成績であり、その後再切除と所属リンパ節郭清術が行われた。病変の残存はなく、リンパ節転移もなかったという。

CPC 5 : amelanotic melanoma との鑑別が問題となった Spitz nevus¹¹⁾

16歳女性の左大腿に生じた米粒大、表面粗雑なドーム状の紅色丘疹で、shave biopsy の結果 amelanotic melanoma が疑われ、紹介された症例である。病理組織学的には主病巣は左右略対

称性で、表皮真皮境界部から真皮にかけて楔状に存在し、表皮基底層から真皮にかけて胞巣を形成し、腫瘍細胞は胞体の明るい大型の類円形～短紡錘形の細胞で、核は比較的大型で異形性の認められるものもあり、真皮下層では maturation を示していると記載されている。図6-a は主として表皮内の所見を示し、裂隙形成を伴った大小の胞巣がみられ、これを構成する細胞は、蛍光を欠く円形細胞が主体で、これに混じて黄緑色蛍光の小紡錘形細胞がみられる。HMB 染色では円形細胞は陰性で小紡錘形細胞は弱陽性を示す(図6-b)。かかる所見は図2の Spitz 母斑の所見に類似していた。平均核 DNA 量は2.82C で、ヒストグラムは、aneuploid ではないが通常の本母斑に比し、4C のピークが大きく tetraploid pattern であった(図6-c)と報告した。所属リンパ節郭清は施行されず、shave biopsy のため、局所の再切除が行われたが、腫瘍細胞の残存はなかったという。

図5. 色素性結節型黒色腫

図6. 無色素性 Spitz 母斑

考 按

近年、マスコミを通じて黒子から癌になることが啓蒙され、色素性腫瘍を主訴として来院する患者が年々増加している。臨床像を詳細に観察することは勿論のことであるが、われわれは良性、悪性の客観的指標として術前には潰瘍性病変であれば病巣表面¹²⁾や滲出液のスタンプ蛍光法、ガーゼ滲出液中¹³⁾・痂皮中5-S-CD値の測定¹⁴⁾、非潰瘍性病変であれば穿刺吸引蛍光法¹⁵⁾、術中迅速診断には病巣断面からのスタンプ蛍光法¹⁶⁾や病巣中5-S-CD値測定¹⁷⁾を行い、摘出腫瘍の病理診断には種々の染色に加え、症例によっては未染標本の蛍光法とHMB染色⁹⁾や平均核DNA量の測定⁸⁾を行って誤診例がないように日常心がけている。これら診断法のうち、いずれの施設からの確定診断依頼例でも検索が可能なのはパラフィン包埋ブロックからの平均核DNA量の測定と未染標本の蛍光法・HMB染色であろう。

一般に、われわれは形態学的な悪性度判定の指標として光顕上核の異常所見、すなわち大小不同、分裂像、クロマチンの増量、核小体の異常などを重視している。一方、細胞核DNA量の測定は核内の染色体異常を量的変化の面からとらえようとする試みである。ヒト悪性腫瘍において腫瘍細胞の核DNA量の異常の程度と腫瘍の生物学的態度は比較的よく相関し、細胞核DNA量の測定は細胞学的悪性度を示す一つの指標になりうるということが指摘されている。大塚、Chiら¹⁸⁾¹⁹⁾は悪性黒色腫20例、Spitz母斑20例、後天性色素性母斑20例についてcytofluorometryを用いて細胞核DNA量を測定し、悪性黒色腫では全例aneuploid pattern、Spitz母斑では18例が後天性色素性母斑と同様にdiploid pattern、残りの2例がpolyploid patternであったとし、細胞核DNA量の分析が悪性黒色腫とSpitz母斑の鑑別に有用であるとしている。さきに、われわれが行ったcytofluorometry

によるDNA量の分析結果⁹⁾は無色素性Spitz母斑と無色素性黒色腫の鑑別診断に客観的情報をもたらしてくれるものであった。今回の研究では色素性のSpitz母斑と結節型黒色腫を被験材料に加えた。色素性Spitz母斑の平均核DNA量の平均は $2.17 \pm 0.22C$ で、無色素性のそれは $2.14 \pm 0.14C$ で有意差はなく、色素沈着の有無にかかわらずヒストグラムはいずれもdiploid patternであった。結節型黒色腫でも色素性と無色素性との間に有意差はなく、平均核DNA量の平均は $3.43 \pm 0.56C$ であって、Spitz母斑のそれに比して有意に高値で、ヒストグラムはaneuploid patternを呈した。以上の結果から、色素性であれ、無色素性であれ、両疾患の鑑別に細胞核DNA量の分析が極めて有用であることが示唆された。

未染標本の蛍光法でメラニン産生細胞が発する蛍光はメラニン代謝主要中間代謝産物である5-S-CDの存在に基づく特異蛍光であり、本法はメラノサイト系腫瘍のメラニン産生能の証明法として、また黒色腫と良性色素性腫瘍との鑑別診断法として簡便かつ有用な方法である²⁰⁾。さらに蛍光法と同一切片にHMB染色を施すことにより、メラノサイト系腫瘍の診断精度が向上することが明かにされている⁹⁾。HMB染色の反応の場は免疫電顕でmelanosome、ことにearly melanosomeと考えられている²¹⁾。従って、蛍光を発しHMB陽性細胞は、メラニン産生能が亢進している細胞と思われる。黒色腫の蛍光法的特徴はradial growth phaseにあるが、結節型黒色腫はこのphaseがなく、vertical growth phaseを示すと一般に考えられている。しかし、比較的早期の結節型黒色腫¹⁴⁾では表皮内病変が存在し、潰瘍形成例²²⁾でも染みだし様色素斑部に本病型の初期病変、すなわち異型境界部活性が観察される。異型境界部活性部を蛍光法でみると蛍光を発し、HMB染色では樹枝状～奇怪な形状を示す細胞が大小の胞巣を形成あるいは個別性に増生するのが特徴のようである。Spitz母斑の表皮内病変には紡錘細胞型と

類上皮細胞型胞巣とがあるが、紡錘形細胞巣のみ、その一部の紡錘形細胞が蛍光を発するが、HMBは陰性あるいは弱陽性である。以上の所見を踏まえて確定診断依頼例を検討すると、蛍光法上、CPC 1例は結節型黒色腫、CPC 5例は無色素生Spitz母斑の所見であり、細胞核DNA量の分析は、前者が悪性腫瘍、後者は良性腫瘍とのデータであった。以上の結果から、未染標本の蛍光法・HMB染色に加えて細胞核DNA量の測定を行うと、良性、悪性の判定度の精度が向上するものと考えられた。

稿を終えるにあたり、症例の使用を快く許可していただきました日本医科大学の本田光芳先生、青木見佳子先生、近畿大学の手塚正先生、泉谷敦子先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Spitz, S.: Melanomas of childhood. *AM.J. Pathol.*, 24: 591-609, 1948.
- 2) Weedon, D., Little, J.H.: Spindle and epithelioid cell nevi in children and adults. A review of 211 cases of the Spitz nevus. *Cancer*, 40: 217-225, 1977.
- 3) Paniago-Pereira, C., Maize, J.C., Ackerman A. B.: Nevus of large spindle and/or epithelioid cells (Spitz's nevus). *Arch. Dermatol.*, 114: 1811-1823, 1978.
- 4) Okun, M.R.: Melanoma resembling spindle and epithelioid cell nevus. Report of three cases. *Arch. Dermatol.*, 115: 1416-1420, 1979.
- 5) Goldes, J., Holmes, S., Satz, M., et al.: Melanoma masquerading as Spitz nevus following acute lymphoblastic leukemia: *Pediatr Dermatol.*, 1: 295-298, 1984.
- 6) Goldes, J., Holmes, S., Satz, M., et al.: Melanoma masquerading as Spitz nevus following acute lymphoblastic leukemia: *Pediatr Dermatol.*, 1: 295-298, 1984.より引用
- 7) McGovern, V.J.: Pigmented cutaneous lesions: The difficult case. *Pathol Annu.*, 13: 415-442, 1978.
- 8) 涌井史典, 森嶋隆文: Spitz母斑とamelanotic melanomaのcytofluorometryによる細胞核DNA量分析による鑑別. *日皮会誌*, 106: 271-280, 1996.
- 9) 森嶋智津子, 森嶋隆文: 悪性黒色腫と色素性母斑・類症の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—同一切片のHMB-45免疫染色との比較研究—. *日皮会誌*, 106: 119-128, 1996.
- 10) 青木見佳子, 本田光芳, 嘉陽宗隆, 他: 14歳女子の足縁に生じた黒色結節. *Skin Cancer*, 12 (1): 26-29, 1997.
- 11) 泉谷敦子, 織田知明, 瀬口得二, 他: Amelanotic melanomaとの鑑別が問題になったSpitz nevusの一例. *Skin Cancer* 11(3): 391-394, 1996.
- 12) Morishima, T., Shibata, A., Fujita, H., et al.: Preoperative diagnosis of malignant melanoma using the touch-fluorescence method. *Surgery Today*, 25: 580-586, 1993.
- 13) 吉沢公人, 森嶋隆文: ガーゼ滲出液中5-S-CD値測定による悪性黒色腫の術前診断法. *日皮会誌*, 105: 723-731, 1995.
- 14) 石川豊祥, 森嶋隆文, 森嶋智津子, 他: 痂皮中5-S-CD値測定と滲出液スタンプ蛍光法による悪性黒色腫の術前診断法—未染標本の蛍光法とHMB-45免疫染色による検討—. *皮膚*, 39: 33-41, 1997.
- 15) 森嶋隆文: 悪性黒色腫の臨床—5-S-Cysteinyl-dopaによる診断—. 穿刺吸引蛍光法, 第一版, 医歯薬出版, 東京, 1991, 126-161.
- 16) Morishima, T., Nagashima, N., Hanawa, S., et al.: Quick diagnosis of malignant melanoma with the touch fluorescence method duaring operation. *Cancer*, 57: 2037-2041, 1986.
- 17) 鮫島俊朗, 森嶋隆文: 病巣中5-S-Cysteinyl-dopa測定による悪性黒色腫の生化学的診断法について. *日皮会誌*, 99: 665-672, 1989.
- 18) 大塚藤男, 池亨仁, 上田純, 他: 皮膚腫瘍と細胞核DNA量. *皮膚臨床*, 33: 729-735, 1991.
- 19) Chi, H.I., Ishibashi, Y., Shima, A., et al.: Use of DAPI cytofluorometric analysis of cellular DNA content to differentiate Spitz nevus from malignant melanoma. *J. Invest Dermatol.*, 95: 154-157, 1990.
- 20) 藤田日出男, 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.
- 21) Taatjes, D.J., Arendash Durand, B., von Turkovich, M., et al.: HMB-45 antibody demon-

- strates melanosome specificity by immunoelectron microscopy. Arch. Pathol. Lab. Med., 117: 264-268, 1993.
- 22) Agrup, G., Björklund, A., Falck, B., et al: Fluorescence histochemical demonstration of dopa thioethers by condensation with gaseous formaldehyde. Histochemistry, 52: 179-186, 1977.