

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22591222

研究課題名(和文)非生毛部に生じた悪性黒色腫に対する表皮基底面の走査型電子顕微鏡学的観察

研究課題名(英文)Morphological study of acral melanoma on the basal cell layer by scanning electron microscope

研究代表者

吉田 雄一(Yoshida, Yuichi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：70335975

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):走査型電子顕微鏡による形態観察では、足底に生じた色素細胞母斑では表皮基底面上に均一に分布する腫瘍細胞がみられるが、悪性黒色腫では基底面に露出する腫瘍細胞はみられず、表皮細胞の間隙から腫瘍細胞が認められた。免疫組織化学染色では、色素細胞母斑では基底層から突出するように腫瘍細胞の胞巣が認められたが、悪性黒色腫では基底膜に接する腫瘍細胞の胞巣は少なかった。以上の所見から、悪性黒色腫では基底層に局在する腫瘍細胞が基底膜から離れた部位に存在し、皮丘部で増殖した後に横行突起に進展し、真皮内へ浸潤する可能性が示唆された。我々の研究結果は、悪性黒色腫と色素細胞母斑との鑑別に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文):On the morphological observation by scanning electron microscope, tumor cell nests of nevi were homogeneously distributed on the surface of basal cell layer in the epidermis. In contrast, those of melanomas were not seen on the surface, but were seen from opening spaces between epidermal cells. On immunohistochemical examination, although tumor cell nests of nevi were recognized adjacent to the basement membrane, there were few melanoma cells in the basal cell layer. Based on these findings, it is most likely that melanoma cells are located on the different place in the basal cell layer compared with nevus. In addition, it has been suggested that melanoma cells proliferate in the intermediate ridge of the epidermis at first, then migrate to transverse ridge and finally invade into the dermis.

The results of our study seem to be useful to distinguish melanoma from nevus.

研究分野：皮膚腫瘍

キーワード：電子顕微鏡 皮膚がん 悪性黒色腫 ダーモスコープ 形態観察 免疫組織化学染色

1. 研究開始当初の背景

近年、皮膚の悪性腫瘍は増加傾向にある。その中でも特に悪性黒色腫は診断の遅れから一旦進行すると極めて予後不良となるため、早期診断が必要不可欠である。本邦においては掌蹠が悪性黒色腫の好発部位であり、acral lentiginous type が約 40%を占める。しかしながら、掌蹠には良性の色素細胞母斑も 5-10%の頻度で生じるため、その鑑別が問題であった。

ダーモスコピーを用いた診断法では、非生毛部(掌蹠)において悪性黒色腫では parallel ridge pattern (感度 86%, 特異度 99%)、色素細胞母斑では parallel furrow pattern を呈する。悪性黒色腫でみられる所見は皮丘部表皮突起の腫瘍細胞の増殖と角層内のメラニンを反映し、色素細胞母斑でみられる所見は皮溝部表皮突起の母斑細胞と角層内のメラニンを反映するとされる。これまでに行われた走査型電子顕微鏡(以下、走査電顕)による表皮基底面の観察では、足底では部位(荷重部、円蓋部、辺縁部)により表皮突起の大きさや横行突起の幅の違いがあり、これが良性の色素細胞母斑のダーモスコピーパターンを反映していることが分かっていた。しかしながら、走査電顕を用いて真皮側から悪性黒色腫の腫瘍細胞の分布を詳細に観察した報告はなかった。そこで、我々は日本人に多い非生毛部(掌蹠)に生じた悪性黒色腫(早期・進行期病変)と色素細胞母斑の腫瘍細胞の分布、進展の様子を走査電顕により真皮側から観察し、ダーモスコピーでみられる特徴的な所見との関連を詳細に検討することとした。

2. 研究の目的

非生毛部(掌蹠)において悪性黒色腫では parallel ridge pattern、色素細胞母斑では parallel furrow pattern という特徴的な所見を呈するが、その理由は完全には明らかに

されてない。

今回我々は掌蹠に生じた悪性黒色腫の真皮を基底膜から剥離し、走査電顕を用いて表皮基底面から詳細な観察を行うことにより、悪性黒色腫や色素細胞母斑がそれぞれ皮丘部と皮溝部の表皮突起に分布する理由を検討する。

3. 研究の方法

(1) 非生毛部(掌蹠)に生じた色素性病変(悪性黒色腫と色素細胞母斑)の臨床像について、その発生部位(荷重部、円蓋部、辺縁部など)、大きさ、特徴などの所見を記録する。

(2) ダーモスコピーにより悪性黒色腫と色素細胞母斑の色素沈着のパターンを観察する。

(3) 切除した組織をホルマリン固定後、さらに 2.5%グルタルアルデヒドで再固定する。固定した試料を燐酸緩衝液で十分に洗浄し、60 に加温した 6N 水酸化ナトリウムで 10-15 分間処理することにより、基底膜や膠原線維を消化し、表皮を真皮から剥離する。1%四酸化オスミウムと 2%タンニン酸を用いて試料を処理し、導電性を与える。その後、エタノール系列で脱水し、t-ブチルアルコールによる凍結乾燥を行う。乾燥後の試料を白金スパッタコーティングした後、走査電顕(日立)による観察を行う。

(4) ホルマリン固定後のパラフィン包埋切片を用いて HMB45、Melan A 抗体を用いた腫瘍細胞の染色、CK14 抗体を用いた表皮基底細胞の免疫組織化学染色を行い、表皮内の腫瘍細胞の局在を明らかにする。

なお、本研究を実施するにあたり、当施設の倫理委員会の承認を受けた上で、患者に十分な説明を行い、同意が得られた場合に限り、試料を研究に用いることとした。

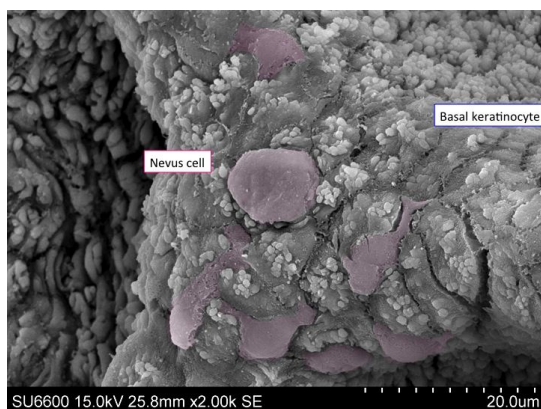
4. 研究成果

足底に生じた色素性病変で、悪性黒色腫と診断された9名、色素細胞母斑の9名において検討を行った。

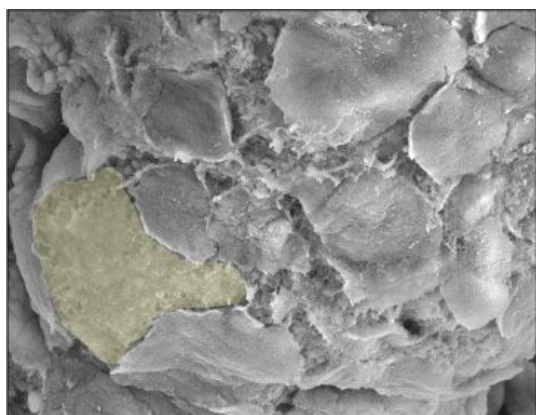
(1) 悪性黒色腫では4名が表皮内がん (in situ)、5名が浸潤がんであった。ダーモスコピーでは全例 parallel ridge pattern を示していた。一方、色素細胞母斑では基本構造は parallel furrow pattern であったが、荷重部では fibrillar pattern、円蓋部では lattice like pattern がみられた。

(2) 走査電顕を用いた表皮基底面の観察により、以下の所見がみられた。

色素細胞母斑では表皮突起の表面に母斑細胞と思われる平滑な母斑細胞が敷石状に均一に分布し、一部では集簇している像がみられた (下図1)。

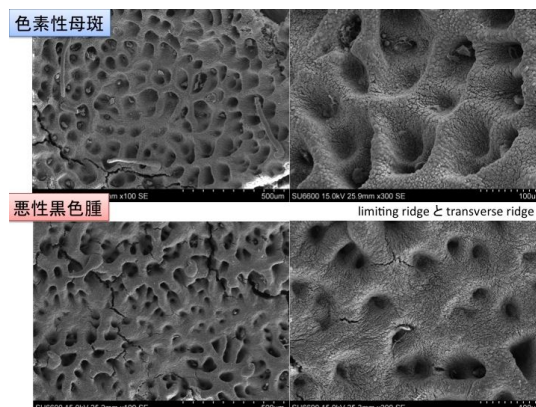


悪性黒色腫では表皮突起の表面に露出する腫瘍細胞は少なく、基底細胞間のわずかな裂隙から突出する像がみられた (下図2)。



特に汗腺周囲の表皮突起の基底細胞は全体

的に平坦化するとともに細胞間隙が開大していた。また、limiting ridge と intermediate ridge の間に認められる横行突起の幅が広くなり、複雑に分枝する像がみられた (下図3)。



以上の結果から、色素細胞母斑の腫瘍細胞は表皮基底層の真皮に接する位置に存在するが、早期の悪性黒色腫において腫瘍細胞は皮丘部の基底層よりやや表皮側に分布することが分かった。

(3) ホルマリン固定後のパラフィン包埋切片を用いて HMB45、Melan A、CK14 抗体による免疫組織化学染色による検討を行った。その結果、色素細胞母斑では多くの例で基底層からあたかも突出するように基底膜に接する腫瘍細胞の胞巣が認められた。一方、悪性黒色腫では色素細胞母斑と比較して基底膜に接する腫瘍細胞の胞巣は少なく、基底層内の角化細胞間に多くの腫瘍細胞がみられた。以上すべての研究結果から、悪性黒色腫ではそもそも色素細胞母斑と比較して基底層において腫瘍細胞の局在する位置自体に違いがあるのではないかと考えられた。つまり、悪性黒色腫では、腫瘍細胞は基底膜からやや離れた部位に存在し、まず皮丘部の表皮突起内で増殖した後、水平方向 (横行突起) に向かって進展し、最終的に真皮に浸潤するのではないかと推測された。

足底に生じた色素性病変は良悪性の診断が難しい例があり、今回の我々の研究成果は、

悪性黒色腫と色素細胞母斑の早期診断・治療に有用であると考えられた。

鳥取大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10304213

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Yamada N, Yoshida Y, Shiomi T, Tanaka M, Yamamoto O, Early dermoscopic detection of lentigo maligna within a lesion of pigmented contact dermatitis, Eur J Dermatol, 査読有, 24(5), 2014, 626-628
DOI:10.1684/ejd.2014.2407.

[学会発表](計 2 件)

山田七子、吉田雄一、山元 修、足底色素性病変の表皮基底面の形態観察、第10回中国研究皮膚科セミナー、2014年10月11日、岡山国際交流センター(岡山市)

山田七子、吉田雄一、山元 修、足底色素性病変の表皮基底面の形態観察、第137回日本皮膚科学会宮崎地方会、2014年3月9日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 雄一(YOSHIDA YUICHI)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：70335975

(2)研究分担者

山田 七子(YAMADA NANAKO)