

原 著

当院皮膚科での各種皮膚癌に対する sentinel node biopsy の経験

猪 爪 隆 史¹⁾, 川 村 龍 吉¹⁾, 小 川 陽 一¹⁾, 北 村 玲 子¹⁾,
岩 本 拓¹⁾, 柴 垣 直 孝¹⁾, 松 江 弘 之¹⁾, 梅 田 貴 子²⁾,
加 藤 良 平³⁾, 島 田 眞 路²⁾

¹⁾山梨大学医学部 皮膚科学講座, ²⁾同・放射線科学講座, ³⁾同・病態病理診断学講座

要 旨: 山梨大学皮膚科において, 2002年8月から2005年8月の3年間に, 皮膚原発の悪性腫瘍51例(メラノーマ, 皮膚有棘細胞癌, 付属器腫瘍, 乳房外 Paget 癌) に対してセンチネルリンパ節生検を施行した。現在, 世界的に標準となっている色素法, RI法の併用にて行い, センチネルリンパ節の同定率は98%であった。摘出したセンチネルリンパ節は最大断面の病理検討, およびメラノーマに関してはPCR法による特異的遺伝子の検出を加えて転移の有無を判定した。センチネルリンパ節の疾患別転移陽性率は, メラノーマで60%, 皮膚有棘細胞癌で4%, 皮膚付属器腫瘍で25%, 乳房外 Paget 癌で33%であった。当科でセンチネルリンパ節生検にて転移なしと診断された症例, および転移ありと診断され根治的リンパ節廓清を施行しえた症例では現在までのところ再発, 転移を認めていない。

キーワード センチネルリンパ節, 皮膚癌, 色素法, RI法, 同定率

はじめに

皮膚癌の転移は, ほとんどの症例で腫瘍発生部位が所属する体表リンパ節に起こる。したがって手術前には所属リンパ節転移の有無を十分に検索し, 臨床的に転移が認められれば通常, 十分な所属リンパ節廓清を行う。臨床的に転移が認められない場合でもそれが強く疑われる症例では, 予防的リンパ節廓清を行う場合がある。皮膚癌における予防的リンパ節廓清の有用性を示す, 統計的に信頼度の高い報告はほとんどみられないが, 最も予後の悪い皮膚癌のひとつ, メラノーマについては近年, 予防的リンパ節廓

清の有効性を否定する欧米の無作為調査の結果が相次いで報告された¹⁻³⁾。リンパ節廓清を行うと末梢の浮腫をきたし患者のQOLを障害するため, リンパ節廓清の適応決定については慎重に行わなくてはならない。そうした背景より根拠に基づいた適切なリンパ節廓清を行うための判断基準が求められてきた。

センチネルリンパ節生検は腫瘍細胞が原発巣よりリンパ行性に流れて初めて出会う所属リンパ節を生検し, 転移の有無によってリンパ節廓清を行うか否か決定する手法である⁴⁾。腫瘍周囲皮内に, リンパ管好性の色素や放射性物質を投与し, 最初に染まるリンパ節を生検する, 簡便な手技である。検査自体の侵襲が少なく, また偽陰性率(センチネルリンパ節に転移がなく, それ以外に転移が生じている可能性)が報

〒409-3898 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110

受付: 2005年8月19日

受理: 2005年10月11日

告上数%と低い。そして、体表に生じる皮膚癌は他の癌よりも比較的容易にセンチネルリンパ節が同定できるなどの利点がある。本稿では、当科で現在までに実施したセンチネルリンパ節生検の成績について報告する。

対象と方法

対象

山梨大学皮膚科では、2002年8月から2005年8月の間にセンチネルリンパ節生検を51例に実施した。全例においてインフォームドコンセントを文書にて取得した。いずれも臨床的に遠隔転移、所属リンパ節転移を認めない皮膚原発の悪性腫瘍で、内訳はメラノーマ20例(39%)、皮膚有棘細胞癌24例(47%)、皮膚付属器腫瘍4例(9%)、乳房外Paget癌3例(6%)であった。部位では、顔面、頭頸部18例(37%)、体幹7例(11%)、上肢9例(17%)、下肢11例(24%)、陰部6例(11%)であった(図3a,b)。

センチネルリンパ節同定法

センチネルリンパ節同定法は色素法とRI法を併用した。注入した色素による術後の色素残存が美容的に問題となると考えられた下眼瞼メラノーマ1例にはRI法のみを行った。RI法は手術前日に行った。 ^{99m}Tc -スズコロイド70 Mbqを皮膚癌の原発巣または原発巣切除後の創痕部周囲の皮内に29Gインスリン注射針付きシリンジを使用して、約0.1 mlずつ4箇所局注した。注射直後、15分後、1時間後にlymphoscintigraphyを行い、所属リンパ領域でRIの集積するリンパ節を確認した(図1a)。その際にガンマプローブ(NAVIGATEOR GPS)を使用してセンチネルリンパ節の正確な位置を確認し、体表部にマーキングした。色素法は ^{99m}Tc -スズコロイド投与翌日、手術室にて行った。皮膚癌の原発巣または原発巣切除後の創痕部周囲の皮内に29Gインスリン注射針付きシリンジを使用して、1%パテントブルーを原則として1 ml局注する。0.1 mlずつ約10箇所

分けて、1回につき10~12秒かけてゆっくりと注射した(図1b)。その約15分後に、前出のガンマプローブにて集積を確認した部位に切開をいれ、青染するリンパ節を摘出した(図1c)。

センチネルリンパ節転移の診断：摘出したセンチネルリンパ節転移の診断は、皮膚悪性腫瘍におけるセンチネルリンパ節生検の同定から診断までの技術的な統一を目的として発表されたThe Augsburg Consensus⁵⁾を参考にして行った。報告上最も転移が多く検出されるという正中軸最大断面にてリンパ節を半割し、ホルマリン固定、パラフィン包埋する。前出の報告では術中迅速診断は見落としが多いため推奨していない⁵⁾。両方向に複数枚組織切片を作成し、1枚目よりHE標本、2枚目以降より腫瘍特異的抗原による特殊染色(必要と認められた場合)を作成し、山梨大学病態病理診断学教室および当教室組織検討会にて診断した(図2)。腫瘍特異的抗原による特殊染色は具体的には、メラノーマではs100染色やHMB45染色、皮膚有棘細胞癌ではcytokeratin染色、乳房外Paget病ではPAS染色やCAM5.2染色を行った。

RT-PCR法を用いたメラノーマ特異的抗原遺伝子検出によるセンチネルリンパ節転移の診断

メラノーマの場合は半割、ホモジェネートしたリンパ節の半分からRNA抽出キット(日本ジーン, 東京)を用いてTotal RNAを抽出、精製した。1 μg のTotal RNAをRNA RCRキット(宝酒造, 東京)を用いてcDNAとした後、以下のメラノーマ、メラノサイトに特異的に発現する分子を増幅した。使用したプライマー配列はチロシナーゼ(284 bp)

Forward: TTG GCA GAT TGT CTG TAG CC,
Reverse: AGG CAT TGT GCA TGC TT
MART-1 (384 bp)

Forward: ATG CCA AGA GAA GAT GCT CA
Reverse: AGC ATG TCT CAG GTG TCT CG
gp100 (362 bp)

Forward: TGG AAC AGG CAG CTG TAT CC
Reverse: CCT AGA ACT TGC CAG TAT TGG C

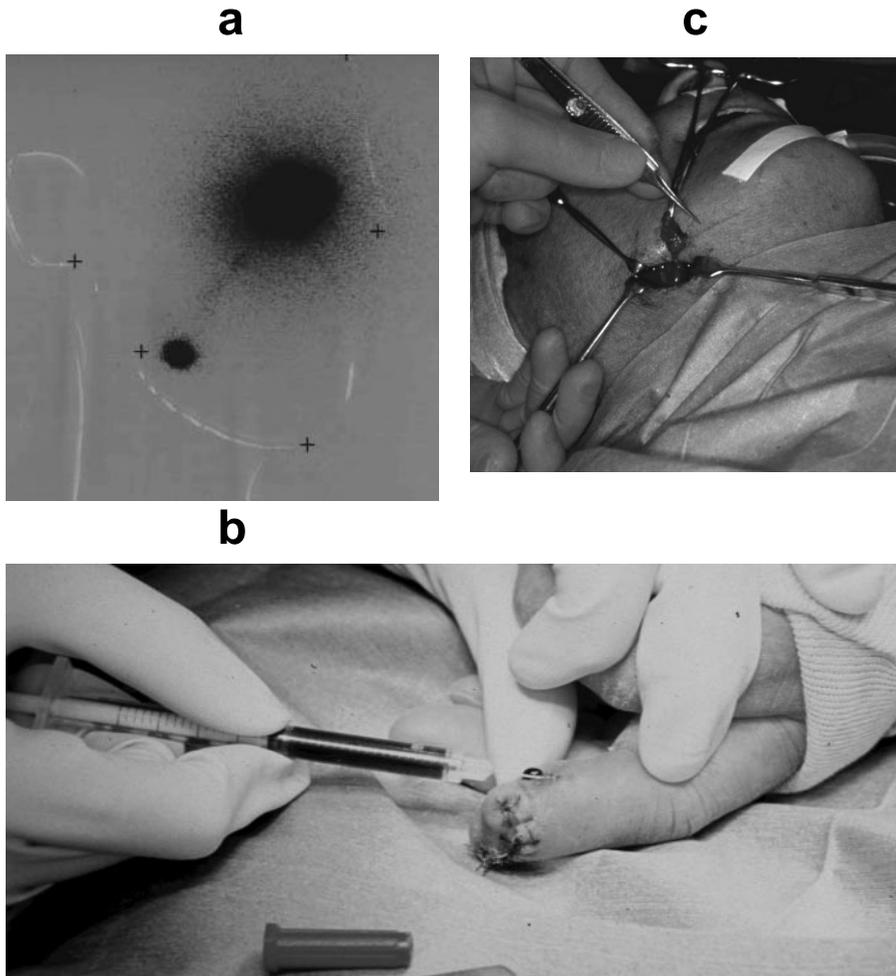


図 1a . 手術前日に ^{99m}Tc -スズコロイドを腫瘍周囲皮内 4ヶ所に投与し、約 30 分後に lymphoscintigraphy にて撮影した。白線は患者頭頸部の輪郭を示す。右上の集積は原発巣周囲皮内への RI 投与によるもの、左下の集積は、右顎下腺周囲リンパ節 1 個への集積を示す。
 b . 手術時、全身麻酔後にパテントブルーを腫瘍周囲皮内約 10ヶ所に投与した。
 c . マーキングとガンマプローブ (NAVIGATOR GPS, タイコヘルスケア, 日本) でのカウントをもとに皮切し、皮下組織を分けながら青染するセンチネルリンパ節を摘出した。

であり、陽性コントロールとして GAPDH (600 bp)

Forward : CCA CCC ATG GCA ATT TCC ATG GCA
 Reverse : TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC

も使用した。PCR の条件は 94°C : 1 分 , 55°C : 1 分 , 72°C : 2 分を 35 サイクル行った。増幅した PCR 産物は 1 % アガロースゲルで電気泳動し、UV ランプ下で写真撮影し、特異的

なバンドの有無を検討した。病理と PCR を併用する場合の診断は、病理、PCR いずれかが陽性となれば転移陽性と診断した。

治療

手術は 2 期的に行った。原発巣切除時にセンチネルリンパ節生検を施行し、その結果、転移陰性と診断された場合それ以上のリンパ節廓清は行わなかった。転移陽性と診断された場合は

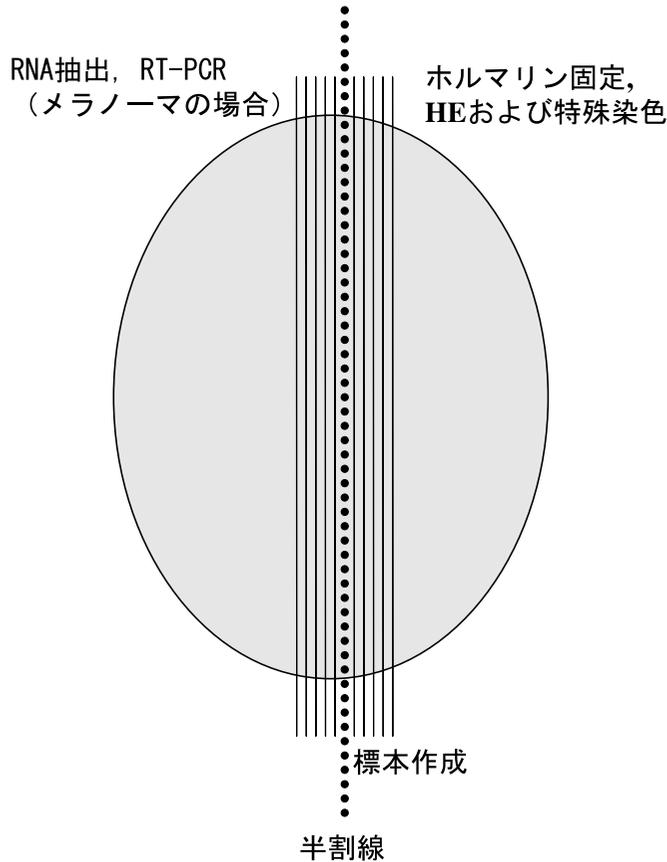


図2. 摘出したセンチネルリンパ節は長軸方向, 最大断面にて半割しホルマリン固定, パラフィン包埋した。両方もも断面より複数枚切片を作成し, 1枚目を HE 染色, 2枚目以降は必要に応じて腫瘍特異的抗原の染色も行い, 微少転移の有無を診断した。メラノーマについては半分より Total RNA を抽出, cDNA としたのち, チロシナーゼ, MART-1, gp100 特異的配列のプライマーを用いて RT-PCR による遺伝子診断を行った。

原発切除後約1～2週間以内に所属リンパ節の根治的廓清を行った。根治的廓清とは腋窩ではレベル2まで, ソケイでは深ソケイリンパ節までとした。

検討項目

検討項目として, 以下の項目を設定した。

- A 原発の部位別センチネルリンパ節同定率
- B センチネルリンパ節の疾患別転移陽性率
- C センチネルリンパ節生検に基づきリンパ節生検を施行した症例の予後

結 果

A 原発の部位別センチネルリンパ節同定率

部位別同定率は, 頭頸部 94% (17/18), 体幹部 100% (7/7), 上肢 100% (9/9), 下肢 100% (11/11) 陰部 100% (6/6) であった。センチネルリンパ節を同定できた症例においては, すべての症例で RI の集積と色素の集積が一致した。頭頸部の症例でセンチネルリンパ節を同定できなかった症例が1例みられたが, この症例では特定のリンパ節への RI 集積や色素による青染をいずれも検出できなかった。

B センチネルリンパ節の疾患別転移陽性率

疾患別センチネルリンパ節転移陽性率は、メラノーマで60% (12/20例)、有棘細胞癌で4% (1/24例)、付属器腫瘍で25% (1/4例)、乳房外Paget病で33% (1/3例)であった

(図3c)。すべての陽性例はHE染色、特殊染色両方で、センチネルリンパ節断面の同一部位に転移が検出された。メラノーマでは転移陽性と診断した12例のうち、病理診断、PCR診断いずれでも陽性となったのは7例、PCR陽性、

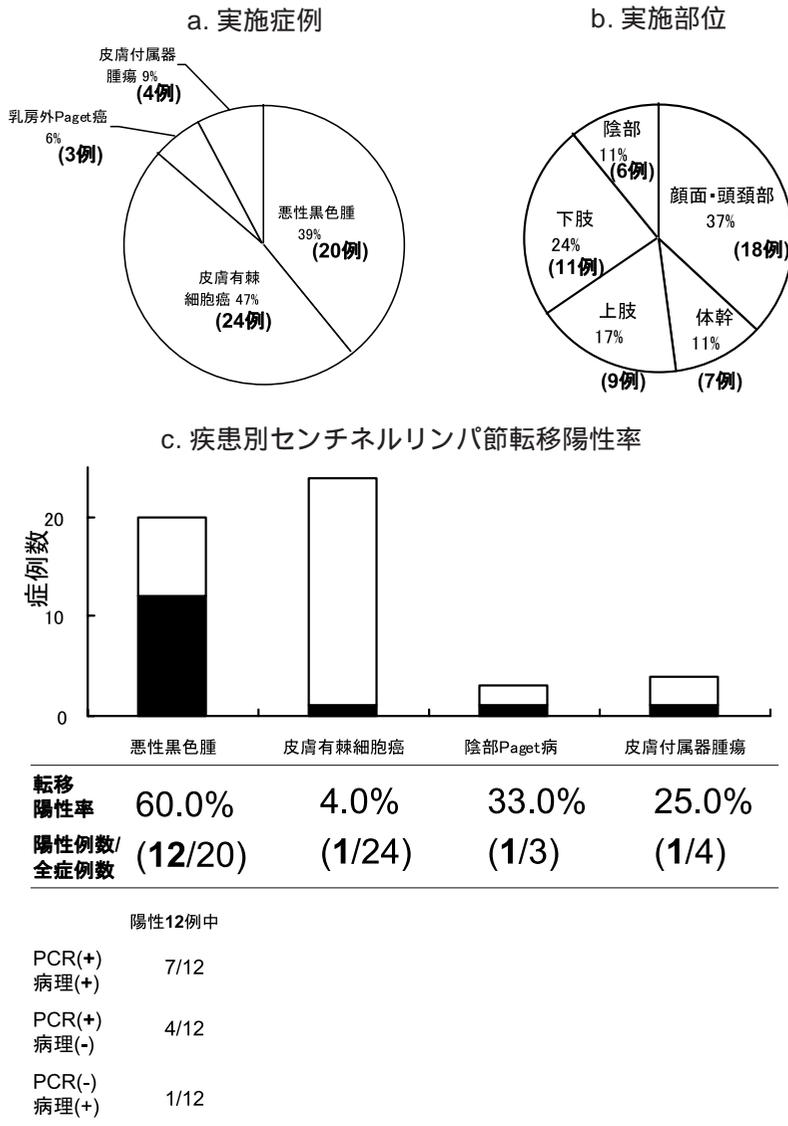


図3a. 当科でセンチネルリンパ節生検を実施した皮膚悪性腫瘍の症例数と割合を示した。

b. 当科でセンチネルリンパ節生検を実施した皮膚悪性腫瘍の部位を示した。

c. 当科でセンチネルリンパ節生検を実施した皮膚悪性腫瘍の腫瘍別センチネルリンパ節転移陽性率を示した。棒グラフでは陰性症例を白抜き、転移陽性症例を黒で示した。悪性黒色腫でセンチネルリンパ節微小転移陽性と診断した症例での、病理、PCRそれぞれの陽性パターンを下段に示した。

病理陰性となったのが4例, 病理陽性, PCR陰性となったのは1例であった。センチネルリンパ節転移陽性例はすべて所属リンパ節廓清を施行したがその中でセンチネルリンパ節以外のリンパ節で転移が検出されたのは50% (6/12例)であった (図3c)。

C センチネルリンパ節生検に基づきリンパ節生検を施行した症例の予後

当科でセンチネルリンパ節生検にて転移なしと診断された症例, および転移有りと診断され根治的リンパ節廓清を施行しえた症例では現在までのところ再発, 転移を認めていない (0/51例)。

考 察

・センチネルリンパ節の同定率

センチネルリンパ節生検はその性質上, 通常一個ないし数個のセンチネルリンパ節を正しく同定しなくてはならない。皮膚科領域でセンチネルリンパ節生検が始められた当初は色素法のみが行われ, その同定率は当時の本邦の報告で78%であった⁶⁾。近年, RI法を併用することで, 同定率は著しく上昇している。最近のメラノーマを対象とした大規模研究の報告では, 色素法とRI法の併用にて97%前後の同定率となっている^{7,8)}。本邦でも最近, 色素法のみで同定率82.4%のところRI法を併用することで100%に上昇した, との報告がある⁹⁾。当科でも色素法とRI法の併用を行っているが同定率は98%であり, こうした報告と同様の結果となった。RI法を併用することで, とくに体幹や頭頸部などリンパ流の複雑な領域に関しては, RIの併用により同定率が劇的に改善することが示されている⁹⁾。他施設での色素のみでの部位別同定率 (頭頸部0%, 上肢57%, 下肢85%)⁶⁾と比較した当科での部位別同定率 (頭頸部94%, 体幹部100%, 上肢100%, 下肢100%)をみてもこの傾向は顕著である。RI法で用いられる放射能の量は既存の放射性物質を用いる検査と比較しても少量で, 患者はもと

より年間に数十症例を施行する医師や技師への影響もほとんど無いことが示されている¹⁰⁾。注入時の疼痛を除けば安全で患者の体への負担もほとんどないため, センチネルリンパ節同定は色素法とRI法の併用が有用と考えられた。

・各腫瘍ごとの転移陽性率

センチネルリンパ節を病理学的に診断した際に発見される転移の割合については当科で検査対象にしている各種皮膚癌につき, メラノーマでは多数の, その他の癌については若干の報告がみられる。それらの報告でのセンチネルリンパ節転移陽性率と, 当科での陽性率を比較し, 若干の考察を加える。

約1,000例のメラノーマを対象にした最近の報告では, 前述のThe Augsburg ConsensusにてCochranらの提唱したメラノーマのセンチネルリンパ節病理診断法で, 約15%の症例に転移を検出している⁷⁾。同様の約300例を対象とした報告でも転移の検出率約23%である⁸⁾。しかしながらこれらの報告では従来数%前後としてきた偽陰性率がそれぞれ13%, 9%と増加している。一方で, メラノーマではセンチネルリンパ節の一部よりmRNAを抽出し, RT-PCRや定量PCRによってメラノーマ特異的遺伝子を検出する方法で, 病理では診断し得ない微小転移を検出する試みが始まっており^{11,12)}, 当科でも半割したメラノーマのセンチネルリンパ節の半分を病理学的検索, 半分をRT-PCR法にて検索し, いずれか一方で転移を認めれば転移陽性としている。メラノーマのセンチネルリンパ節のRT-PCR検索では標的遺伝子の選択にも影響されるが, 概して半数前後が陽性所見となる。当科でも陽性率はじつに60%であった。センチネルリンパ節に種々の割合で存在する母斑細胞等に由来する偽陽性が含まれるため, とされるが, 病理にて転移陰性, RT-PCRにて転移陽性と診断された症例では廓清を行わなかった場合約3年の経過で実に20%に臨床的な転移を生じている¹¹⁾。こうした背景を踏まえ, 最適なセンチネルリンパ節の転移診断法の確立が待たれるが, 当面我々は病理とRT-PCR法に

基づいた診断結果によって治療を行い、その予後について引き続き観察していきたいと考えている。

四肢、体幹に生じた皮膚有棘細胞癌を対象にしたセンチネルリンパ節生検の大規模な研究報告は今の所無いが、同じ扁平上皮癌である頭頸部癌については多数の症例をまとめた報告がある¹³⁾。227例を対象とした臨床試験ではセンチネルリンパ節同定率93%で、転移陽性率は34%であった。これは我々の皮膚有棘細胞癌のセンチネルリンパ節で検出された4%をはるかに上回る。これはこの報告で扱われている症例のほとんどが舌や口蓋などの粘膜部に原発しているためと考えられた。

皮膚科領域で扱う代表的皮膚腫瘍のひとつである乳房外 Paget 癌に対するセンチネルリンパ節生検の報告はいまのところ我々の調べ得たかぎりでは一報のみで、転移陽性率は13例中4例(30%)であった¹⁴⁾。これは我々の33%とほぼ同等であり、思いのほか高値であった。乳房外 Paget 癌はアポクリン腺由来の上皮内癌であるとの認識より予防的にリンパ節廓清を施行することは少ない。しかし転移を起こした症例では有効性のある治療法はないため、これらの結果は乳房外 Paget 癌においても積極的にセンチネルリンパ節生検を施行し、陽性例には積極的にリンパ節廓清を施行する必要性を示唆していると考えられた。

センチネルリンパ節生検の結果と予後

センチネルリンパ節生検の結果が予後を反映するか否かについては、皮膚科領域では施行症例の圧倒的に多いメラノーマについてのみ、いくつかの報告がある。最近の主な報告では、陰性群の5年生存率が、有意に陽性群を上回るとするもの⁷⁾、両者に有為な差は無いとするものがある⁸⁾。我々の経験した症例では術後の観察期間が最も長いもので約3年であるが、いずれの癌においてもセンチネルリンパ節生検で陰性と判定したもの、あるいは陽性と判断し、適切なリンパ節廓清を施行しえたもののなかで再発、転移は一例も認めていない。メラノーマに

関してはセンチネルリンパ節の同定法、診断法とその結果をもとにした治療法について近年、世界的コンセンサスが示されたものの、依然施設によって相違があると思われる。そのため予後についても多少の相違は生じうるのかも知れない。我々の施設も含め、今後、多くの施設からの予後に関する報告によって最終的に判断されるべきである。

本研究は山梨大学倫理委員会の承認を得て行われた。

文 献

- 1) Veronesi U, Adamus J, Bandiera DC *et al.* Delayed regional lymph node dissection in stage I melanoma of the skin of the lower extremities. *Cancer* 1982; **49**: 2420-2430
- 2) Cascinelli N, Morabito A, Santinami M *et al.* Immediate or delayed dissection of regional nodes in patients with melanoma of the trunk: a randomised trial. WHO Melanoma Programme. *Lancet* 1998; **351**: 793-796.
- 3) Sim FH, Taylor WF, Ivins JC *et al.* A prospective randomized study of the efficacy of routine elective lymphadenectomy in management of malignant melanoma. Preliminary results. *Cancer* 1978; **41**: 948-956.
- 4) Morton DL, Wen DR, Wong JH *et al.* Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; **127**: 392-399.
- 5) Cochran AJ, Balda BR, Starz H *et al.* The Augsburg Consensus. Techniques of lymphatic mapping, sentinel lymphadenectomy, and completion lymphadenectomy in cutaneous malignancies. *Cancer* 2000; **89**: 236-241.
- 6) 山本明史：Sentinel lymph node biopsy (歩哨リンパ節生検). *臨床皮膚科*, **55**: 72-75, 2001.
- 7) Yee VS, Thompson JF, McKinnon JG *et al.* Outcome in 846 cutaneous melanoma patients from a single center after a negative sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2005; **12**: 429-439.
- 8) Roka F, Kittler H, Cuzig P *et al.* Sentinel node status in melanoma patients is not predictive for overall survival upon multivariate analysis. *Br J Cancer* 2005; **92**: 662-667.
- 9) 野呂佐知子, 山本明史, 山崎直也, 藤沢康広, 岩田浩明ほか：悪性黒色腫の sentinel node biopsy および病理組織学的検討. *日本皮膚科学会雑誌*, **114**: 15-24, 2004.
- 10) 大塚幹夫, 山口亜紀, 古川裕利, 岸本和裕, 金子史男, ほか：悪性黒色腫患者に対する Sen-

- tinel node biopsy の経験 . 日本皮膚科学会雑誌 , **111**: 1981-1988, 2001.
- 11) Giese T, Engstner M, Mansmann U *et al.* Quantification of melanoma micrometastases in sentinel lymph nodes using real-time RT-PCR. *J Invest Dermatol* 2005; **124**: 633-637.
 - 12) Goydos JS, Patel KN, Shih WJ *et al.* Patterns of recurrence in patients with melanoma and histologically negative but RT-PCR-positive sentinel lymph nodes. *J Am Coll Surg* 2003; **196**: 196-204; discussion -5.
 - 13) Ross GL, Soutar DS, Gordon MacDonald D *et al.* Sentinel node biopsy in head and neck cancer: preliminary results of a multicenter trial. *Ann Surg Oncol* 2004; **11**: 690-696.
 - 14) Hatta N, Morita R, Yamada M *et al.* Sentinel lymph node biopsy in patients with extramammary Paget's disease. *Dermatol Surg* 2004; **30**: 1329-1334.