

皮膚色素性病変の新しい診断法の開発

北海道大学大学院 医学研究科皮膚粘膜病学分野

松 村 哲 理

The management of skin pigmentation is an important field in cosmetology. Usually, management of pigmentation in cosmetology deals with benign skin conditions like lentigines, freckles, and post-lesional pigmentation. Among these benign pigmentary conditions, one must differentiate malignant lesions such as melanomas. Early diagnosis of melanoma is important because advanced melanoma has poor prognosis. Recently, our group developed a personal computer-based three-dimensional (3D) reconstruction system, which can visualize 3D structure of dermatopathological specimens. In this report, I employed this method to a pigmentary skin lesion, nevus pigmentosus, combined with clinical detailed observation of the lesion by digital microscopy, to investigate if this method is useful in the diagnosis of pigmentary lesions. Thirty serial sections from each block were stained with H&E. Serial images were registered using a graphics program Photoshop. After extracting the region of interest, three-dimensional images were projected using NIH-Image program. Biopsy specimens obtained from normal shoulder skin showed net-like structure of rete ridges and dermal papillae fit to each opening of the net, and biopsy specimens from normal palmar skin showed wide incurved structure of epidermis, which corresponded to the skin surface creases. In nevus pigmentosus of the sole, dermoepidermal junction area was irregularly depicted corresponding to the presence of junctional nevus cell nests. Relationship between the distribution of nevus nests and surface structure of the epidermis was also visualized. Further study is now under investigation to show the relationship between detailed clinical observation with digital microscopy and the histological three-dimensional structures of nevus pigmentosus.

1. 緒 言

コスメトロジー分野において、いわゆる「シミ・そばかす」などの皮膚色素性病変への対応は大きなテーマの一つである。しかし、一口に色素性病変といっても、その中には色素性母斑、肝斑や老人性色素斑などの良性病変に混じって、皮膚メラノーマという悪性病変があることを忘れてはならない。

皮膚メラノーマは、最も悪性度の高い悪性腫瘍の一つである。オゾン層の破壊などに伴う紫外線量の増加がメラノーマの発生頻度を高める可能性が指摘されており、実際、近年増加傾向にある。進行したメラノーマは外科的切除・化学療法・放射線療法などあらゆる治療を尽くしても治癒させることは困難であり、現在のところ、早期発見・早期治療が最善の治療手段である。早期メラノーマであれば、十分な外科的切除により治癒させることが可能であり、実際当施設では5年生存率は100%となっている。

メラノーマの早期診断のためには、臨床的像と病理組織学的所見を加味して総合的に診断することが必要であるが、病理組織標本は臨床像の一部分の断面を見るという性格上、臨床像との関連が十分検討できず、臨床像へのフィ

ードバックが十分に得られていなかったという問題があった。

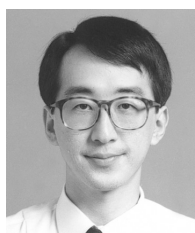
発疹の臨床像については、近年デルマトスコプやデジタルマイクロスコープなど、病変をより詳細に観察できる手段が得られるようになってきており、その有用性も報告されてきている^{1) 2)}。

病理組織学的手法については、臨床像の一部分の断面しか見られないという点を克服するためのひとつの試みとして、我々はコンピューターを用いた三次元再構築法を開発した³。これまでも三次元再構築の試みはあったが、これらの報告では専用の三次元再構築システムを用いており、どこの施設でも手軽に行えるものではなかった^{4) - 6)}。そこで、我々は一般的に手に入るパーソナルコンピューターおよび汎用グラフィックソフトを用いて三次元再構築を行った。この方法を用いると、通常の病理組織では二次元の断面としてしかとらえられない病変を、比較的容易な手順で三次元的にとらえることができる。

そこで、メラノーマの診断にこの方法を応用し、デジタルマイクロスコープにより詳細に記録された臨床像と対応させることにより、臨床像と病理組織像のギャップを埋め、より正確な早期メラノーマの診断法を確立しようと考えた。本研究では、足底の色素性母斑の病変について、病理組織学的にみられる母斑細胞巣と、肉眼的に見られる皮膚表面の皮溝との関連を、三次元的に画像化した。

2. 実 験

材料として正常皮膚を含めて切除された色素性母斑の手術標本を用いた。切除前に病変を10～50倍の倍率でデジ



A new method for diagnosis of pigmentary skin lesions.

Tetsuri Matsumura

Department of Dermatology, Hokkaido University
Graduate School of Medicine

タルマイクロスコープ（キーエンス社 VH-6300）に記録した。切除標本は型通りホルマリン固定、パラフィン包埋し、厚さ 6 μm の連続切片を 24 ～ 40 枚作成し、H E 染色した。

染色標本の画像をそれぞれデジタルマイクロスコープを用いて JPEG 画像に変換し、パーソナルコンピュータ（アップル社 Power Macintosh G3）に取り込んだ（図 1a）。取り込まれた画像をフォトタッチソフトウェア（アドビ社 Photoshop）の各レイヤーに配置した。隣り合うレイヤーの画像を不透明度 50% で合成し、それぞれの画像の主な部分（画像により表皮真皮境界部、毛包、比較的大きな血管、母斑細胞巣等）が最も一致するように画像を動かして位置あわせ（registration）を行った（図 1b→c）。この方法では Z 方向の完全な alignment は保証されないが、様々な方向に変化する主な部分を最も一致するように registration するため、Z 方向が大きくずれる可能性は低い。さらに、各画像を自動レベル調整した後に一定量のぼかしを入れ、自動選択ツールを用いて表皮を選択し切り出した（図 1d）。切り出した表皮を白に、その他の部分を黒に塗り、画像をモノクロ 2 階調に変換した（図 1e）。次に、それぞれの画像をパブリックドメインの画像解析ソフトウェア（NIH-Image : developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>）に読み込み、projection により三次元画像を作成した（図 1f）。パラメーターとしては以下のものを用いた

; slice spacing, 2.0; initial angle, 0; rotation angle increment, 5; lower transparency bound, 0; upper transparency bound, 254; surface opacity, 0; surface depth-cueing, 100; interior depth-cueing, 50; axis of rotation, x-axis; projection method, nearest point。

また、凍結標本から連続切片を作成し、その連続切片に対して S-100, HMB45, PCNA, Ki-67, CD34, CD35 に対する免疫染色および TUNEL 法によるアポトーシスの検出を試み、陽性細胞分布の三次元再構築を試みた。

3. 結 果

まず、正常皮膚の表皮真皮境界部の三次元画像化を行った。肩の正常部では、網状の形態をとる表皮突起と、その網の孔の部分に一致する真皮乳頭の形態を三次元的に画像化することができた（図 2a）。一方、手掌の皮膚では、表皮側が溝になっている部分では表皮真皮境界部も真皮側に凹になっており、表皮真皮境界部の形態が表皮の表面側の皮野・皮溝の構造と対応する様子が画像化できた（図 2b）。

次に、同様の方法を用いて、足底の色素性母斑の三次元再構築を行った。この方法では、表皮のコントラスト差を用いて表皮を切り出すため、色素性母斑の母斑細胞巣は真皮側として認識される（図 3a）。表皮側を真皮側から見ると、母斑細胞巣が入り込んでいるため、真皮表皮境界部は不規則になっている（図 3b）。真皮側を見ると、この部分で

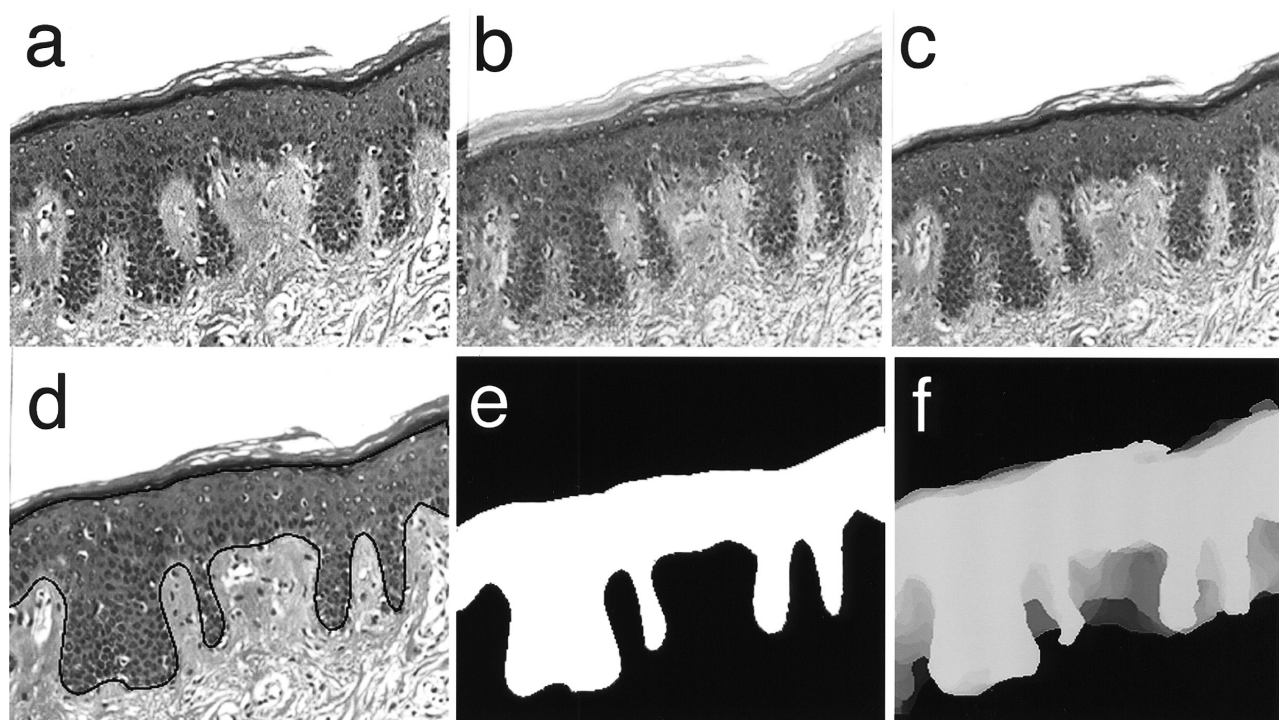


図 1 三次元再構築の方法

連続切片の画像をそれぞれコンピュータに取り込む（a）。隣り合う画像を不透明度 50% で合成し、それぞれの画像の主な部分が最も一致するように画像を動かして位置あわせを行う（b→c）。さらに、自動選択ツールを用いて表皮を選択し切り出す（d）。切り出した表皮を白に、その他の部分を黒に塗り、画像をモノクロ 2 階調に変換する（e）。最後に、それぞれの画像を NIH-Image に読み込み、三次元画像を作成する（f）。

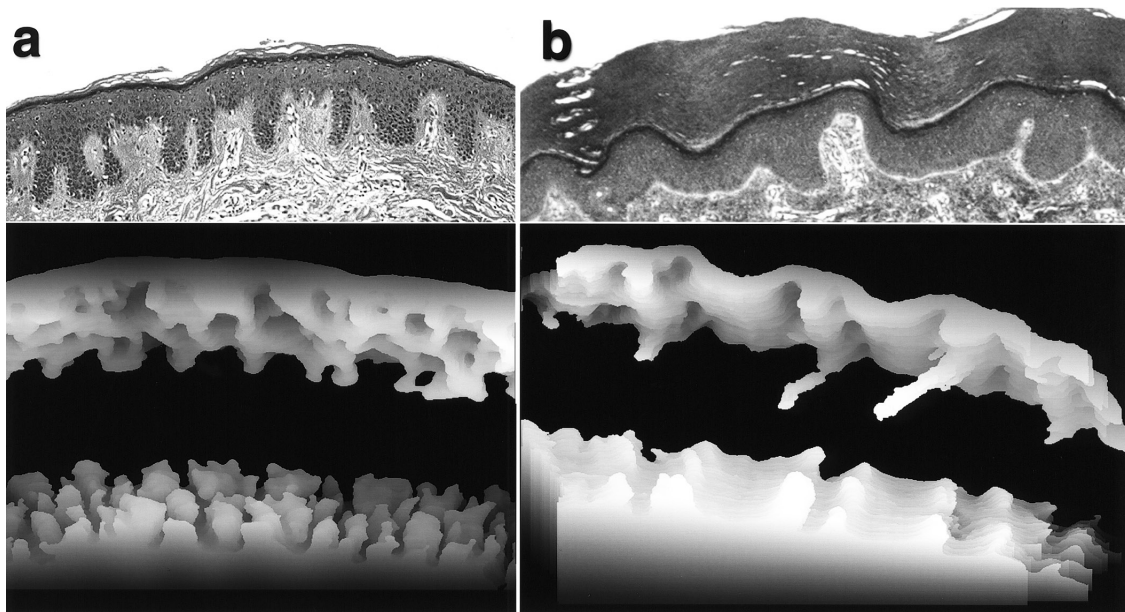


図2 三次元再構築の例

a) 肩の正常皮膚。網状の形態をとる表皮突起と、その網の孔の部分に一致する真皮乳頭の形態が三次元的に示されている。b) 手掌の皮膚。表皮真皮境界部の形態が表皮の表側の皮野・皮溝の構造と対応している様子が画像化されている。

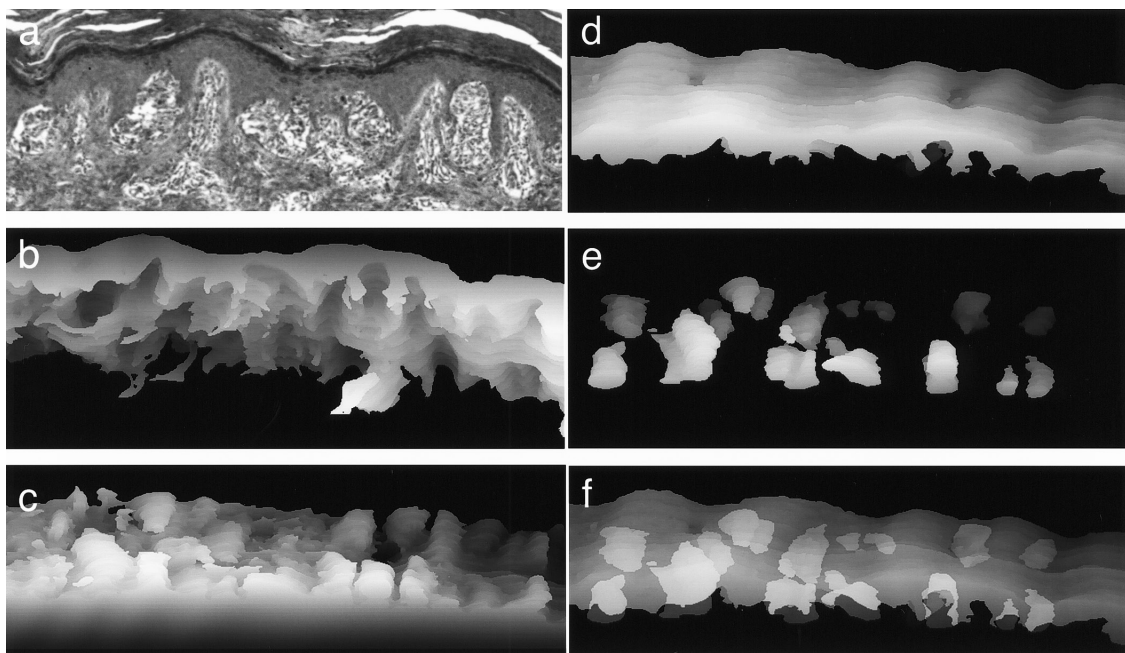


図3 色素性母斑の三次元再構築像

再構築した色素性母斑のH E像 (a)。表皮を真皮側から見た画像 (b) および真皮側の画像 (c) のみでは、母斑細胞巢の分布にははっきりとした規則性を見ることは難しい。しかし、表皮側を上から見た画像 (d) に、母斑細胞巢だけを切り出した画像 (e) を重ねると、主に皮溝の部分に沿って母斑細胞の細胞巢が分布していることがわかる (f)。

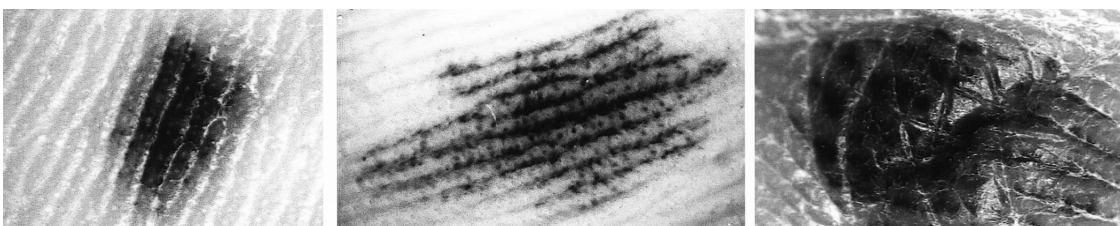


図4 色素性母斑のデジタルマイクロスコープ像

は母斑細胞巢の分布にははっきりとした規則性を見ることは難しかった(図3c)。そこで、表皮側を上から見た画像(図3d)に、母斑細胞巢だけを切り出した画像(図3e)を重ねてみたところ、表皮を表面から見た皮野・皮溝の状態と母斑細胞巢分布の関連がわかるようになった(図3f)。この方法により、部分的に例外はあるものの、主に皮溝の部分に沿って母斑細胞の細胞巢が分布していることがわかり、皮膚の表面構造と母斑細胞巢の分布に関連を見ることができた。

免疫染色標本については、多くの正確な連続切片を得ることが難しく、現在までのところ満足のいく画像は得られていない。切片の変形が少なく、脱落しにくく、染色が一定の条件で行えるような技術的な問題の解決が必要と考えられた。

4. 考 案

本研究では、病理組織の三次元再構築という方法を用いた。本法を用いると、通常は二次元の断面でしか見られない病理組織切片を、連続切片からの画像をコンピューター処理することにより、三次元形態として観察することができる。例えば、通常の二次元の切片では、表皮突起は真皮乳頭と同様に「突起」として捕らえられるが、三次元再構築することにより表皮突起は「突起」ではなく、網状の「稜」であり、表皮稜という言葉が正しいことを画像として示すことができる。

今回は、この方法を色素性母斑に応用した。色素性母斑はメラノーマとの鑑別が問題になることがあり、臨床所見上の鑑別点として、対称性、境界、色調、大きさ等が参考になるとされているが、中には肉眼的な臨床所見だけでは鑑別の難しい症例もあり、非侵襲的でより精度の高い鑑別法が必要とされている。最近では、色素性病変の臨床的な鑑別に、デルマトスコープやデジタルマイクロスコープなどの機器が応用されるようになってきており、その有用性が報告されている^{1) 2)}。将来的にこれらの方法が一般的に臨床に応用されるようになれば、色素性病変の鑑別はより精度の高いものになることが期待される。その際には、臨床的な所見と、病理学的所見の相関関係を明らかにすることが必要不可欠である。

本研究では、病理組織の三次元再構築法を色素性病変に応用することにより、色素性母斑の母斑細胞巢が、主に皮溝の部分に存在することを示すことができた。デジタルマ

イクロスコープで色々な色素性母斑を観察すると、色の付いた部位が皮膚表面構造と関連している様子がしばしば観察される(図4)。このような関連性が色素性母斑とメラノーマの鑑別に有用であるという報告があり⁷⁾、デジタルマイクロスコープで観察した臨床上的特徴が、組織学的にどのように関連しているかをとらえることは、興味のある研究テーマであると考えられる。今後は症例を増やし、デジタルマイクロスコープによる画像と、組織学的三次元再構築法を組み合わせ、病理と臨床のギャップを埋め、色素性病変の診断への応用へと発展させたいと考えている。

(文献)

- 1) Kittler H, Selteneim M, Dawid M et al. Morphologic changes of pigmented skin lesions: a useful extension of the ABCD rule for dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 558-62.
- 2) Carli P, de Giorgi V, Palli D et al. Preoperative assessment of melanoma thickness by ABCD score of dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 459-66.
- 3) Matsumura T, Sato-Matsumura KC, Yokota T et al. Three-dimensional reconstruction in dermatopathology - A personal computer-based system. *J Cutan Pathol* 1999; 26: 197-200.
- 4) Nakayama M, Takahashi H, Okamoto M et al. Three-dimensional computer-reconstructed image for studying cancer extension within the hypopharynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 117: 764-8.
- 5) Griffini P, Smorenburg SM, Verbeek FJ et al. Three-dimensional reconstruction of colon carcinoma metastases in liver. *J Microsc* 1997; 187: 12-21.
- 6) Bacharach-Buhles M, el Gammal S, Panz B et al. In psoriasis the epidermis, including the subepidermal vascular plexus, grows downwards into the dermis. *Br J Dermatol* 1997; 136: 97-101.
- 7) Oguchi S, Saida T, Koganehira Y et al. Characteristic epiluminescent microscopic features of early malignant melanoma on glabrous skin. A videomicroscopic analysis. *Arch Dermatol* 1998; 134: 563-8.