

ものを「治癒」とした。次にプレドニン投与量が10mg/day以下で、その他の文献報告上天疱瘡治療に有効な薬剤の投与を行わず皮疹の新生がまれなものあるいは、経過観察のみで、皮疹・粘膜疹の新生のない状態が1年未満のものを「寛解」とした。またそれら以外の症例を「アクティブ」とした。

結 果

治癒が15例(21.7%) (うちPV10例(19.2%)、PF5例(29.4%))、寛解が26例(37.7%) (うちPV23例(44.2%)、PF3例(17.6%))、アクティブが28例(40.6%) (うちPV19例(36.6%)、PF9例(53.0%))であった(図1)。

次に、経過中にアフレルシスを行っているか否か比較したところ、全体では35例(50.7%) (うちPV28例(53.8%)、PF7例(41.2%))にアフレルシスが施行されていた(図2)。PVでアフレルシスを行った28例のうち、治癒が2例(7.1%)、寛解が11例(39.3%)、アクティブが15例(53.6%)であった(図3)。一方、PVでアフレルシスを行っていない24例では、治癒が8例(33.3%)、寛解が12例(50.0%)、アクティブが4例(16.7%)であった。PFでアフレルシスを行った7例のうち、治癒が1例(14.3%)、寛解1例(14.3%)、アクティブ5例(71.4%)であった(図4)。PFでアフレルシスを行っていない10例では、治癒4例(40.0%)、寛解2例(20.0%)、アクティブ4例(40.0%)であった。

PVはアフレルシスを行った症例で施行後に有用効果が認められたものは28例中22例(78.5%)で、またPFでアフレルシスを行った症例で施行後に有用効果が認められたものは7例中5例(71.4%)であり、アフレルシスがPV・PFに有用であることは明らかであった。

PV・PFとも、アフレルシスを試行した症例では初診時あるいはアフレルシス施行前の重症度スコアが高く(PV平均8.7、PF平均6.9)、一方アフレルシスを試行しなかった症例では重症度は低かった(PV平均5.0、PF平均4.2)。即ち重症例にアフレルシスが併用されていることが確認された。これは国民健康保険のアフレルシスへの適用は、ステロイドなどの他剤が副作用などのため用いられない重症例に施行が許可されることによる。

考 察

天疱瘡患者の予後については、重症度別治療指針とそれに準じたステロイド剤の適正な投与量の指針が出され²⁾、また、免疫抑制剤や血漿交換療法等の治療法が普及し、早期寛解導入と長期寛解維持が可能となっている。今回われわれは天疱瘡全体で21.7%、病型別ではPVの19.2%、PFの29.4%を治癒と判定し得た。佐久間らは1997年に本邦の116施設を対象に行った調査で、380人のうち経過観察のみの(治癒と想定された)例は僅か11人(2.9%)としている³⁾。われわれの治癒の基準と単純には比較できないが、かなりの格差が見られたことは事実と思われる。これは、天疱瘡患者のみならず、医師も、我々も含め天疱瘡研究班関係者ですら本疾患は治らない疾患であるとの認識が強く、そのため臨床症状がなく、また天疱瘡抗体が検出されない状態になっても、ただだらと少量のステロイド剤を継続しているためではないかと考える。

天疱瘡に対するアフレルシス療法は、本邦では小川らが初めて施行し⁴⁾、現在ではその有用性は広く認められているが、高額精密機器でありその臨床応用に高い専門知識と技術が要求されるため、全国規模では普及されていない。現在では、他の治療法に反応しないあるいは他の治療法が施行できない、いわゆる重症症例に対して健康保険適応もされており、本疾患に対する療法と

して確立し、良い治療効果を挙げている^{5,7)}。今回アフェレシスを行った人の治癒、寛解例がさほど多くないのは、重症例ほどアフェレシスを施行しているという背景がその一因と考える。実際に重症度スコア別の解析を行ってみると、アフェレシスを行わずにアクティブと判定されたグループは、経過中の重症度スコアが比較的低いことが明らかとなった。

また PF 全体の 53.0% がアクティブのグループに入っている。アフェレシスを行ったグループでも、なお 71.4% がアクティブであり、今回の結果では必ずしも PV より予後が良いとは限らないといえよう。

今回の解析により、死亡率も高く、不治の病と言われていた天疱瘡が、重症度別治療指針の適用とアフェレシスの積極的導入などの適切な治療により救命され、さらには寛解・治癒そして社会復帰へと導くことができることが明らかになったと思われる。

参考文献

- 1) 増谷 衛、稲葉 裕、小川秀興：寛解と判定された天疱瘡患者の検討、厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班稀少難治性皮膚疾患分科会、平成 11 年度研究報告書、95-102、2000
- 2) 小川秀興：厚生省特定疾患稀少難治性皮膚疾患調査研究班、平成 4 年度研究報告書、173-180、1992
- 3) 佐久間正寛、池田志孝、稲葉 裕、小川秀興：本邦における天疱瘡患者の quality of life について（第一報）、日皮会誌：110、283-288、2000
- 4) 小川秀興、森岡真治、榛沢信子：天疱瘡の血漿交換療法、順天堂医学、25：421-425、1979
- 5) Takamori K, Yamada H, Ogawa H：Plasma exchange is an effective treatment for pemphigus vulgaris Summary of 32 cases of pemphigus vulgaris. In Therapeutic plasmapheresis (IX) (Koga N, Nakagawa S, eds). ICAOT Press. Cleveland, 1991, pp-46-51
- 6) Yamada H, Yaguchi H, Takamori K, Ogawa H：Plasmapheresis for the treatment of pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. In Therapeutic apheresis 1：178-182, 1997
- 7) 矢口 均、山田裕道、高森建二、小川秀興：自己免疫性水疱症とアフェレシス—水疱性類天疱瘡に対する血漿交換療法（Bag 式遠心分離法、二重膜濾過血漿交換療法）について—、日本アフェレシス学会誌、19: 180-183、2000

Prognostic severance of pemphigus patients who have been treated at Department of Dermatology, Juntendo University School of Medicine

Ikeda S, Komiyama E, Ogawa H: Department of Dermatology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

In order to access the prognosis of the patients with pemphigus, we examined the disease course and treatment methods of the patients who have been treated at our OPD. As results, 21.7% of the patients (19.2% of pemphigus vulgaris (PV) patients and 29.4% of pemphigus foliaceus (PF) patients) were found to be free from the disease (without symptom and circulating pemphigus antibody, and not require any treatment for more than 1 year). Also there was no significant difference in the number of the patients at remission phase or disease-free phase between plasmapheresis-treated

group and non-treated group. Furthermore, the number of the PF patients at remission phase or disease-free phase was not so high as compared to that of PV patients. At any late, these results indicated that immediate remission or disease free condition could be achieved by appropriate treatment in many of pemphigus patients.

表1 天疱瘡における寛解の基準（文献(1)より抜粋）

プレドニン投与量 10mg/day 以下で、他に有効性を報告されている治療法を行っていない患者で、

- ①皮膚病変の面積：紅斑、水疱などの active な皮疹なし
- ②ニコルスキー現象：陰性
- ③水疱の新生：なし または稀に少数
- ④抗体価：40～320 倍以下
- ⑤口腔粘膜疹：なし または 5%以下

表2 天疱瘡における治癒

1. 寛解、即ち

- ① 紅斑・水疱の新生なし
- ② ニコルスキー現象：陰性
- ③ 口腔粘膜疹：なし または 稀にあり

2. ステロイド、DDS、免疫抑制剤、金製剤の全身投与及び血漿交換療法を一年以上行っていない

（1、2を共に満たすものを治癒とする）

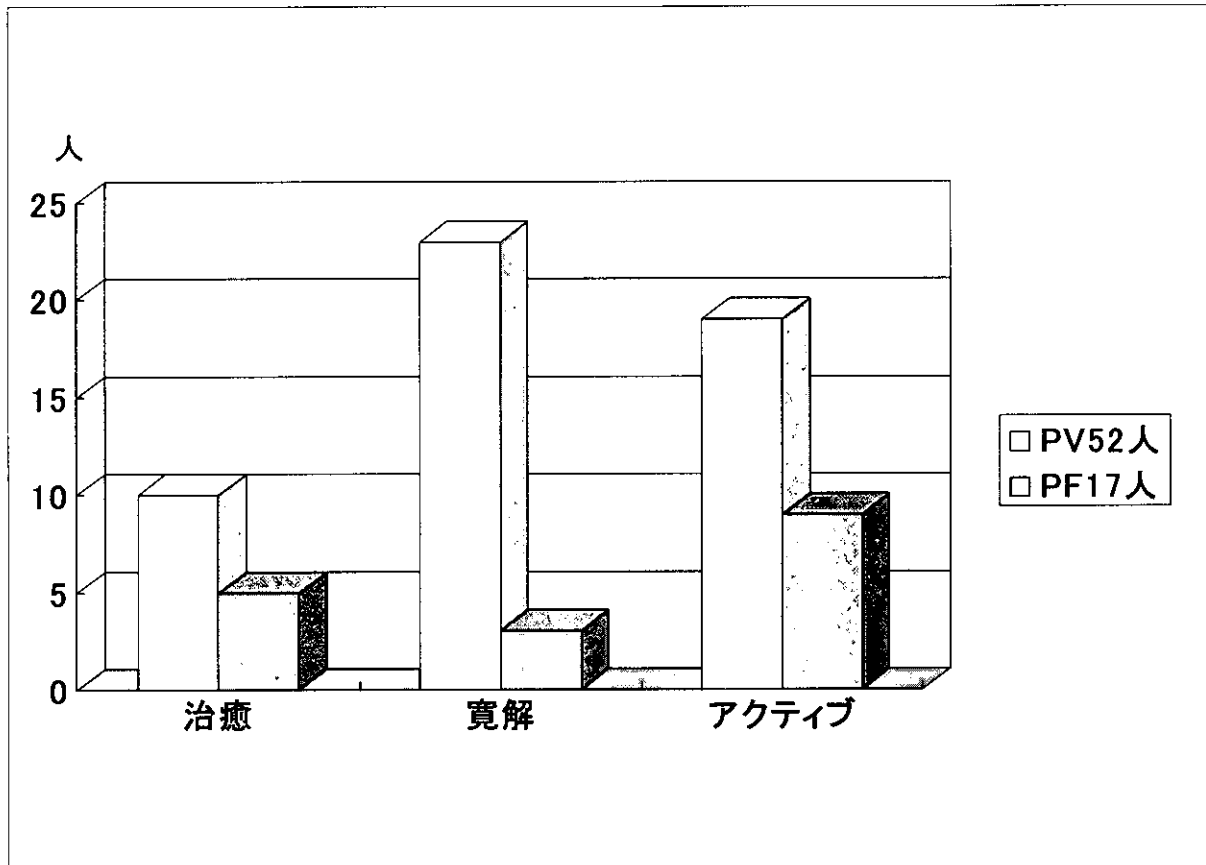


図1 PV PFにおける治癒および寛解

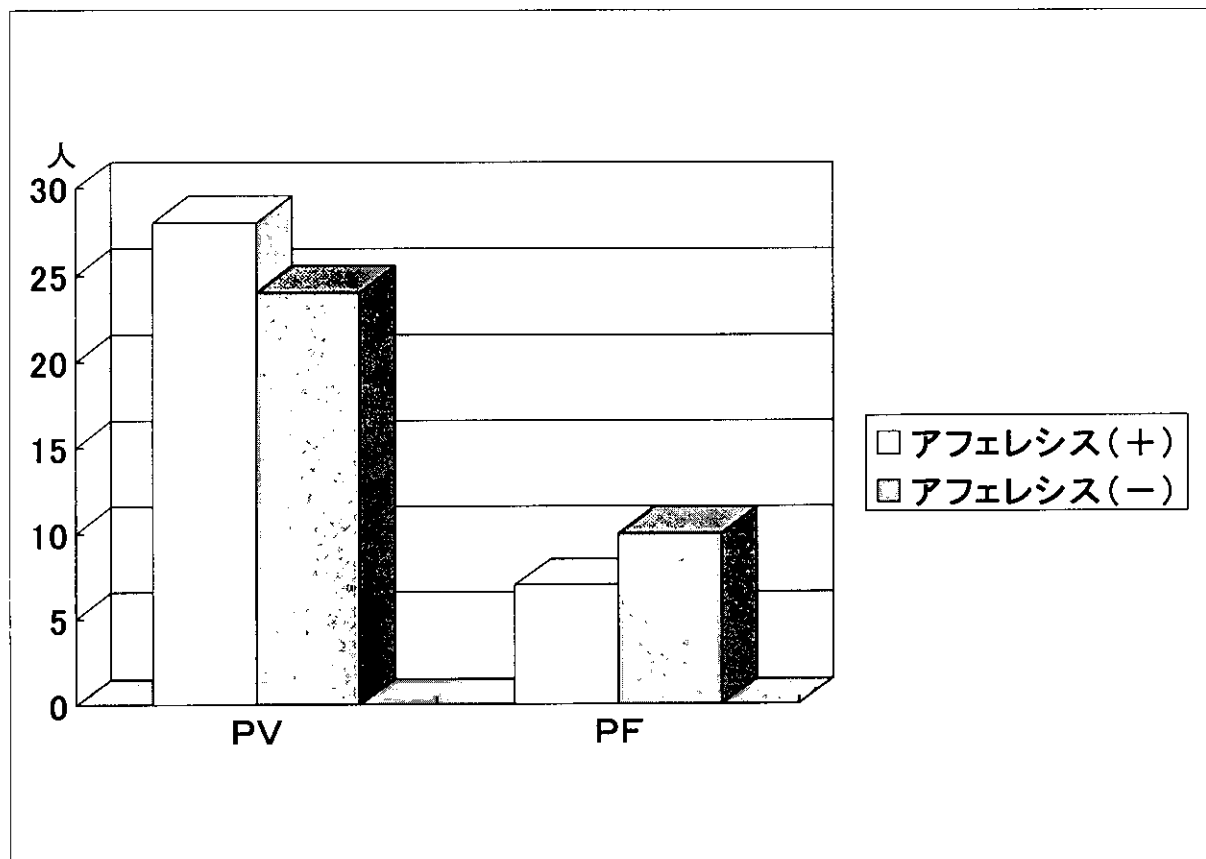


図2 病型別アフェレシス療法施行の有無

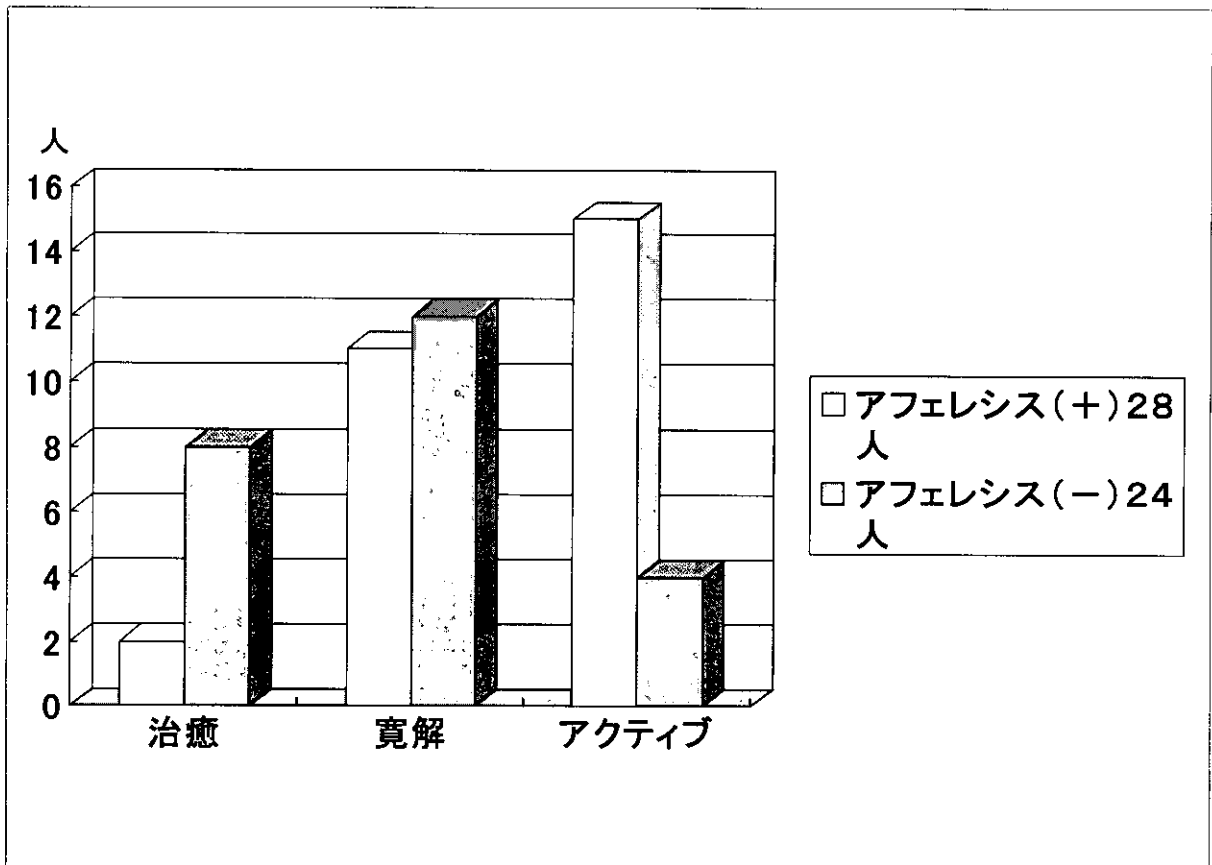


図3 PVにおけるアフェレシス療法施行の有無と病勢の相関 (計52人の解析)

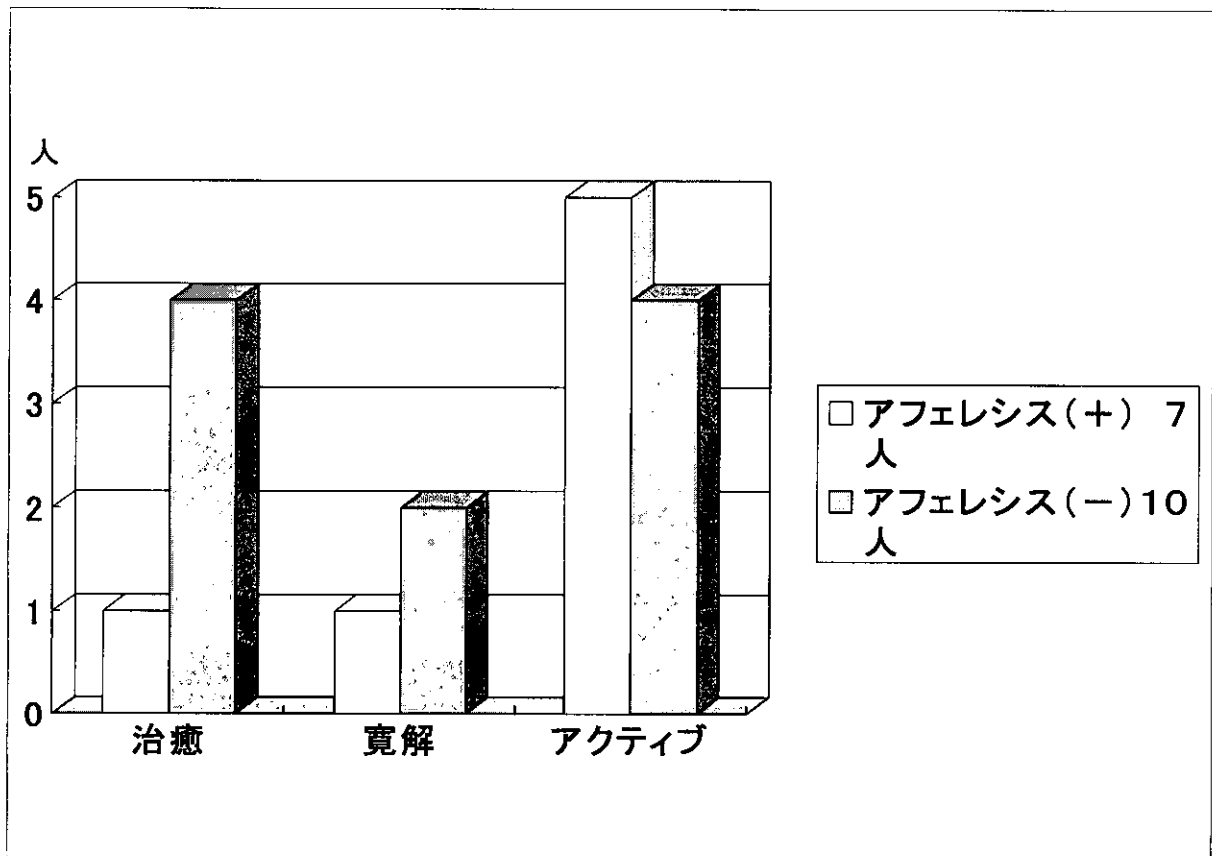


図4 PFにおけるアフェレシス療法施行の有無と病勢の相関 (計17人の解析)

3) 自己免疫性水疱症および膿疱性乾癬におけるステロイド使用と ステロイド骨粗鬆症に対する予防の実態

協力研究者：古川 福実（和歌山県立医大皮膚科）

要 旨

自己免疫性水疱症や膿疱性乾癬におけるステロイド骨粗鬆症も、副作用の一つとしてよく知られているが、予防については未だ本邦にはガイドラインがなく、その実態も明らかでない。現状を理解するために、皮膚科医師約400名にアンケート調査を行った。内服ステロイドの投与患者数は、開業医では勤務医に比べて医師一人あたり3倍近くのステロイド投与患者数があった。ステロイドを長期間（3ヶ月以上）投与している患者数についても、同様な傾向が認められた。薬疹・中毒疹、自己免疫性水疱症、膠原病に対する投与例がとくに多く、次いで、血管炎、その他の自己免疫関連疾患、痒疹、慢性湿疹、アトピー性皮膚炎、乾癬などの順に投与例が多かった。全医師の26.6%がステロイド骨粗鬆症の症例を経験し、20.2%がステロイドによる骨折を経験していた。予防的な骨粗鬆症治療を実施するのは、42.7%の医師であった。そのうち、投与期間を考慮し予防的治療を開始する医師がもっとも多かった。米国リウマチ学会はすでにガイドラインを公表しているが、これと、我が国におけるステロイド骨粗鬆症の管理の実態との間には、まだまだ大きな開きがあるようである。今後、わが国においても、ステロイド骨粗鬆症の治療に関するエビデンスを確立し、その管理内容を向上させる必要があると考えられる。

はじめに

自己免疫性水疱症において、副腎皮質ホルモンの内服治療は標準的治療の一つである。膿疱性乾癬においても、全国調査をみるとかなりの頻度で使用されており、有用性も確認されている。一方で、副腎皮質ホルモン剤による副作用は周知であり、感染症、胃腸障害、ムーンフェイス、瘰癧などに対して予防あるいは早期の対策が講じられている。ステロイド骨粗鬆症も、副作用の一つとしてよく知られているが、予防については未だ本邦にはガイドラインがなく、その実態も明らかでない。今回、我々は自己免疫性水疱症および膿疱性乾癬におけるステロイド使用とステロイド骨粗鬆症に対する予防の実態を明らかにするために、アンケート調査を行った。この報告では、皮膚疾患全般についてその傾向を述べる。

方法・結果

調査対象は、静岡県、和歌山県、長崎県の3県下の皮膚科医会に所属する開業医および勤務医399名であった。2001年5月から6月に、郵送により質問状を送り、回答を得た。合計218名（回答率54.8%）から回答が得られた。勤務形態別の内訳は、勤務医が81名、開業医が135名であった。勤務医のうち皮膚科専門医が60.5%、開業医のうち皮膚科専門医が62.2%であった。回答の得られた全218名のうち206名（94.5%）が内服ステロイドの投与を実施していると回答した。内服ステロイドの投与患者数を調査したところ、勤務医では1医師あたり月平均14.9例の患者に内服ステロイドを投与しているのに対して、開業医では月平均48.3例と、開業医では勤務医に比べて医師一人あたり3倍近くのステロイド投与患者数がある実態が浮き彫りとなっ

た。また、ステロイドを長期間（3ヶ月以上）投与している患者数についても、同様な傾向が認められ、勤務医では1医師あたり7.6例の長期投与患者を担当しているのに対し、開業医では平均16.5例と、2倍以上の患者数であることが明らかになった。

次に、ステロイド投与の対象となっている疾患についてみると、薬疹・中毒疹（勤務医16.7%、開業医18.5%）、自己免疫性水疱症（20.6%、12.0%）、膠原病（18.9%、12.5%）に対する投与例がとくに多く、次いで、血管炎、その他の自己免疫関連疾患、痒疹、慢性湿疹、アトピー性皮膚炎、乾癬などの順に投与例が多いことが明らかになった。また、前述したように、開業医では勤務医に比べて1医師あたりのステロイド投与患者数が多かったが、疾患別の割合で見ると、開業医では、慢性湿疹やアトピー性皮膚炎に対する投与が、勤務医に比べて多いことが明らかになった。一方、病院で管理することが多い膠原病や自己免疫性水疱症については、勤務医による投与が多いことが示された。

ステロイド骨粗鬆症の経験の有無について調査したところ、回答の得られた全医師の26.6%がステロイド骨粗鬆症の症例を経験し、20.2%がステロイドによる骨折を経験していることが明らかになった。これに対して、X線もしくは骨密度測定による定期的な骨粗鬆症チェックを行っている医師の割合は14.2%と、定期チェックを行う医師は少ない実態が明らかになった。しかし、ステロイド投与患者に対して予防的な骨粗鬆症治療を実施するかとの問いに対しては、全体で42.7%の医師が「実施する」と回答している。

「ステロイド投与患者に対して予防的な骨粗鬆症治療を実施する」と回答した医師のうち、「どのような基準で予防的治療を開始するか」という設問に回答した66例について、その詳細を検討した。まず、「投与期間を考慮し予防的治療を開始する」と回答した医師は66名中53名（80.3%）であった。プレドニゾロン投与期間として、4週を目安にすると回答した医師が、30.2%であり、最も多かった。次いで、12週、24週を目安とした治療開始が多かった。「ステロイド投与開始と同時に予防的治療を開始する」と回答した医師は66名中21名（31.8%）であった。プレドニゾロンの1日投与量を目安として、30mg/日以上、と回答した医師が57.1%と、最も多く、次いで10mg/日以上が23.8%であった。最後に「ステロイドの総投与量を目安に治療開始する」と回答した医師については、その数が最も少なく、66名中5名（7.6%）であった。その内訳は、プレドニゾロン総投与量300mg/日以上と回答した医師が2名、20mg/日以上、400mg/日以上、500mg/日以上が各1名という結果であった。ステロイド骨粗鬆症の予防的治療に用いる薬剤の種類については、64名中61名（95.3%）の医師が活性型ビタミンD₃を使用すると回答した。この設問は併用薬に関する複数回答が可能であり、活性型ビタミンD₃に次いでビタミンK₂、ビスホスホネートが多いことが明らかになった。

考 察

米国リウマチ学会における「ステロイド骨粗鬆症の予防と治療のガイドライン（2001年度改訂）」では3ヶ月間のステロイド療法（プレドニゾロン5mg/日）を開始する患者に対して、生活指導、運動療法、さらにビタミンD₃やビスホスホネートによる薬物療法による予防的治療を推奨している。こうしたガイドラインと、我が国におけるステロイド骨粗鬆症の管理の実態との間には、まだまだ大きな開きがあるようである。今後、わが国においても、ステロイド骨粗鬆症の治療に関するエビデンスを確立し、その管理内容を向上させる必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 岡田奈津子、吉川邦彦：皮膚科領域におけるステロイド療法と骨への影響；ステロイド骨粗鬆症の診断と治療：147-154、1999
- 2) MC Hochberg, et al.: Arthritis Rheum 1996 ; 39: 1791-1801
- 3) R Eastell et al.: J Intern Med 1998 ; 244: 271-292
- 4) JD Adachi et al.: Semin Arthritis Rheum 2000 ; 29: 228-251
- 5) L Buckley et al.: Arthritis Rheum 2001 ; 44: 1496-1503

Questionnaire survey on corticosteroid-induced osteoporosis in intractable skin diseases

Fukumi Furukawa, MD

Department of Dermatology, Wakayama Medical University, Wakayama Japan

Corticosteroid is frequently used in the dermatological fields. There are many side effects of corticosteroid including gastrointestinal inflammation and ulcers, infections, osteoporosis and so on. Of these side effects, the preventative therapies for osteoporosis are not fully established because we have not evidences enough for evaluation. Therefore, we did the questionnaire studies on corticosteroid in the practical dermatological treatment to almost 400 dermatologists in Nagasaki, Shizuoka and Wakayama in Japan. Over 90% administered corticosteroids to the patients, but the preventative therapy was performed by less than 50% of them. In addition, steroid-induced osteoporosis and bone-fracture were experienced in 20-30% of them. Based on these resultus, we propose that the preventive guideline for steroid-induced osteoporosis should be soon established.

IV. 表皮水疱症

1) 先天性表皮水疱症の難治性潰瘍に対する羊膜移植の試み

協力研究者：池田志孝（順天堂大学皮膚科）

班長：小川秀興（順天堂大学皮膚科）

共同研究者：溝口将之、Borisut Sanmano、須賀康（順天堂大学皮膚科）

はじめに

羊膜の医療材料としての臨床応用は、1910年にDavisらの報告した皮膚移植に始まり¹⁾、その後、1970年代前半より熱傷や静脈瘤性症候群による皮膚潰瘍に積極的に使用されるようになった^{2) 3)}。最近では、眼科領域において、癬痕性角結膜疾患に対する眼表面再建術として羊膜移植が積極的に行われ、その有効性が多数報告されている^{4) 5)}。羊膜移植は、生体の各組織の中で最も拒絶反応の顕著に認められる皮膚においては最終的に拒絶されるものの、Biological dressingとしては優れた臨床効果が報告されている。胎盤組織はドナーにとって不要なものであり、法律上も排泄物と考えられ、妊婦が不利益を被ることはなく、倫理的にも問題はない。そこで今回、長期にわたり存在する先天性表皮水疱症の難治性皮膚潰瘍に対して羊膜移植を試みたので報告する。

対象および方法

症例：28歳、男性。家族歴に特記すべきことなし。生下時よりほぼ全身に水疱、潰瘍形成を繰り返し、手指は癒着して棍棒状変化を呈した。臨床的、組織学的、電顕的所見から劣性栄養障害型表皮水疱症と診断した。多発する潰瘍面に対し潰瘍治療薬による軟膏療法、被覆剤により保存的治療を行っていたが、両下腿に広範囲な潰瘍面が残存するため、平成13年6月より両下腿の8×4.5cm、12×10cm大の潰瘍面に対し羊膜移植を施行した。

羊膜の採取、保存：

羊膜は全身合併症のない正常妊婦からの帝王切開での採取のみとした。また、事前に母体のウイルス感染症等を除外した。羊膜の処理、保存過程は全て無菌的操作で行い、洗浄、保存には抗生剤を使用した。羊膜の採取は、まず胎盤から用手的に羊膜組織を剥離し、生食で洗浄した後、抗生剤含有PBSで3回洗浄し血液成分を除去した。その後、適当な大きさにトリミングし、50%グリセロール/DMEMの保存液で1回洗浄した後、保存液中で-80℃のフリーザー中で凍結保存し、保存羊膜は使用直前に解凍した。

羊膜移植：

移植面の細菌感染に対して、まず抗生物質含有軟膏などを用いて治療を行った。移植に際しては、まず、創面を消毒した後、出血のないことを確認してから上皮側が上になるように潰瘍面を羊膜で被った。縫合は行わず、ソフラチュールガーゼをのせた後に滅菌ガーゼで保護し、包帯固定を行った。浸出液がなければそのまま1週間固定し、1週間後に羊膜を交換した。これらの操

作は外来で行った。

結 果

右下腿前面の8×4.5cm大の潰瘍面(図1、a)は、羊膜移植後3日目には浸出液が減少し、血管の新生を認めた(図1、b)。治療開始3週間後には潰瘍面の約50%が上皮化し(図1、c)、6週後には上皮化が完了した(図1、d)。左下腿前面の12×10cmの潰瘍面(図2、a)も羊膜移植後3日目には浸出液は減少し、血管の新生を認め(図2、b)、治療開始3週間後には中央部と周囲より上皮化が認められ(図2、c)、10週後には上皮化が完了した(図2、d)。また、いずれにおいても治療開始直後より疼痛の軽減を認めた。

考 案

羊膜を用いた組織再建術は、瘢痕性角結膜症に対する外科的アプローチとして、近年眼科領域において注目されている。羊膜の基底膜はラミニン、IV型コラーゲンなどから成り生体内で最も厚い基底膜であるといわれている。眼表面ではこの基底膜を足場として上皮細胞が羊膜上を進展する点で、羊膜下に上皮化を促す皮膚潰瘍面に対する biological dressing としての羊膜移植とはその原理が異なるが、最近では、基質としてのみならず、皮膚同様に「カバー」として用いる方法が注目されてきており、その応用範囲を広げてきている。羊膜移植における羊膜の作用機序については現状では不明な点が多いが、これまで羊膜の特性についていくつかの報告がある。羊膜にはEGF、KGF、HGF、VEGF等の上皮化、創傷治癒を促進する種々の因子が含まれ、さらにそれらは凍結保存後も羊膜上皮に含まれていることがわかっており、羊膜が組織修復過程におけるこれら成長因子の供給源として働いていると考えられる⁹⁾。さらに羊膜には炎症抑制作用があり、また、羊膜と接触することにより潰瘍面の protease 活性が著明に低下する事が報告されており、種々の protease inhibitor の存在が指摘されている⁹⁾。Protease 活性が上昇している表皮水疱症の潰瘍面に対してそういった側面から作用している可能性が考えられる。また、当初、羊膜は低い抗原性から拒絶されないと考えられてきたが、その後は羊膜における HLA-class I 抗原の発現が報告され、この結果から HLA が発現されないために羊膜組織が拒絶反応を惹起しにくいとは考えにくく、羊膜における免疫学的特異性が示唆されている。羊膜は classical HLA-class I 抗原である HLA-A、B、C のほかに HLA-G という特殊な HLA を発現している⁹⁾。HLA-G が発現されると、ホスト・リンパ球は HLA-G を認識できないか、認識しても負のシグナルが働き、リンパ球は不活化され、NK 細胞における傷害活性は抑制されることが知られている⁹⁾。また、羊水中には IL-10、TGF-β などの免疫抑制サイトカインが存在し、羊膜にもそれらの m-RNA が確認されている。

羊膜の作用機序、免疫学に関しては、今後解明されるべき問題が多数残されているが、羊膜は種々の側面から創傷治癒を促進すると考えられ、羊膜移植は従来の治療に抵抗性の難治性皮膚潰瘍に対して試みてもよい治療法の1つであると考えられる。今後は羊膜に関する基礎的研究の成果が蓄積されるに伴い、皮膚科領域における羊膜の臨床応用の幅が広がることを期待したい。

参考文献

- 1) Trelford JD, Trelford-Sauder M: The amnion in surgery, past and present, *Am J Obstet Gynecol*, 134: 833, 1977
- 2) Colocho G, Graham WP, Greene AE, Metheson DW, Lynch D: Human amniotic membranes as a physiologic wound dressing, *Arch Surg*, 109: 307, 1974
- 3) Bennett JP, Matthews R, Faulk WP: Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion, *Lancet* i : 1155, 1980
- 4) Kim JC, Tseng SCG: Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*, 14: 473, 1995
- 5) Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, Sinozaki N, Shimazaki J: Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome, *Am J Ophthalmol*, 122: 38, 1996
- 6) Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, et al : Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane, *Curr Eye Res*, 20: 173, 2000
- 7) Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY: Amniotic membrane patching promotes healing following acute corneal alkali burn, *Exp Eye Res*, 70: 329, 2000
- 8) Hammer A, Hutter H, Blaschitz A, et al: Amniotic epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G, *Am J Reprod Immunol*, 37: 161, 1997
- 9) Le GAL FA, Riteau B, Sedlik C, et al: HLA-G mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes, *Int Immunol*, 11: 1351, 1999

Clinical trial of human amniotic membranes on ulcerated skin surface in epidermolysis bullosa

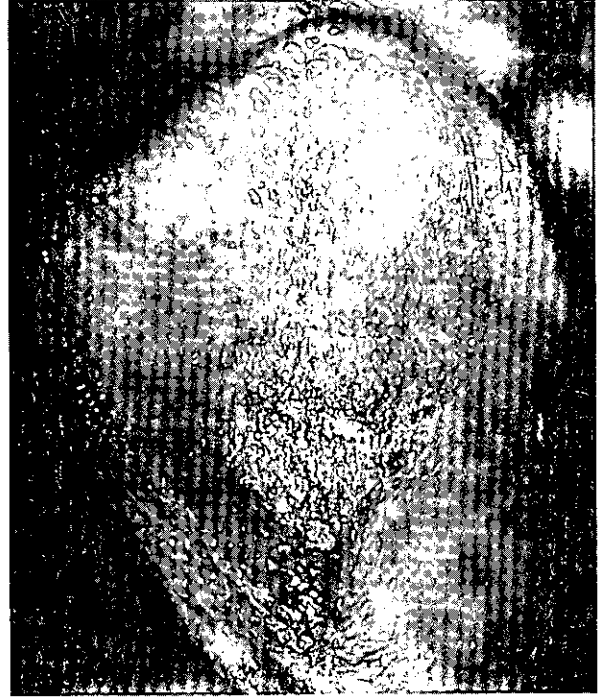
Shigaku Ikeda, Masayuki Mizoguchi, Borisut Sanmano, Yasushi Suga and Hideoki Ogawa

Juntendo University School of Medicine, Department of Dermatology

Recently ophthalmologists have been using amniotic membrane (AM) for treatment of corneal defects. They suggested that AM produce some factors which promote epithelial healing processes and had gained favorable outcome. Human AM is also used as a biological dressing of several skin conditions (for example, chronic leg ulcers and burn patients). We report a dystrophic epidermolysis bullosa case that had treated by using AM. The membranes were placed on 2 sites of ulcers on patient's lower extremities, epithelial side up, and changed every week. Successful heal with complete re-epithelization was achieved at the sixth and tenth week of both lesions. This result indicates that human AM, as a biological dressing, is effective for treatment of ulcers in epidermolysis bullosa.



a : 移植前



b : 3日後

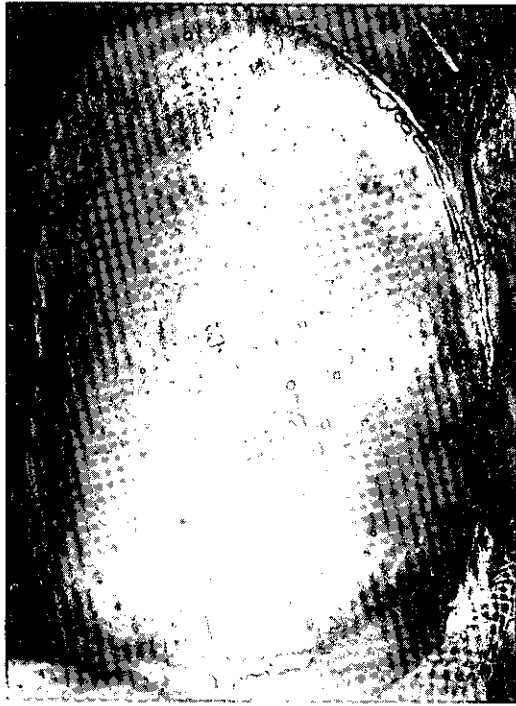


c : 3週後

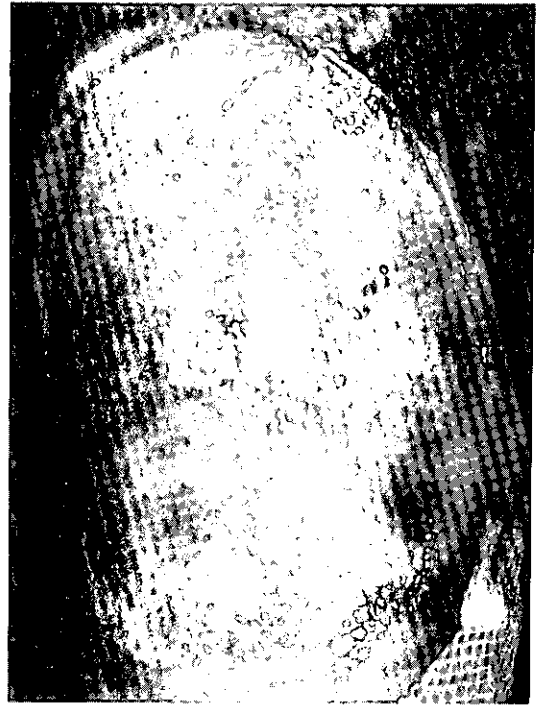


d : 6週後

图1 右下腿



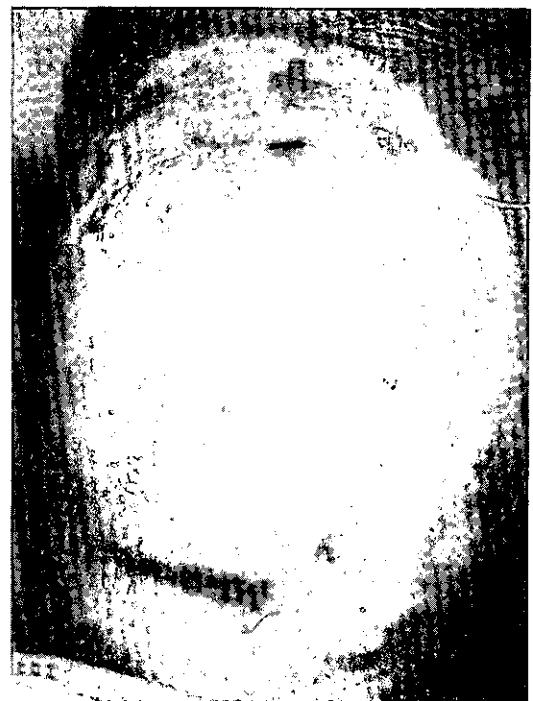
a : 移植前



b : 3日後



c : 3週後



d : 10週後

図2 左下腿

2) 生体皮膚への高効率・低侵襲性遺伝子導入法の開発

分担研究者：玉 井 克 人（弘前大学医学部皮膚科）
協力研究者：池 田 志 学（順天堂大学医学部皮膚科）
分担研究者：金 田 安 史（大阪大学大学院遺伝子治療）
班 長：小 川 秀 興（順天堂大学医学部皮膚科）

はじめに

先天性表皮水疱症を始めとする難治性遺伝性皮膚疾患に対する治療法が無い現在、遺伝子治療法の開発が切望されている。一般に、遺伝子治療を行うためには、1) 遺伝子導入法の開発、2) 遺伝子発現ベクターの作成、3) 有効性の検討、4) 安全性の確認、といった諸問題を解決しなくてはならない。

皮膚科領域の遺伝子治療を進める際に特に困難なのは、生体皮膚への広範囲な遺伝子導入法の開発である。皮膚は外界からの異物の侵入を防ぎ、内部環境の恒常性を維持するために進化した臓器である。それ故、皮膚には角層という強靱なバリアー機構が発達し、分子量 500~1000 を超える分子は基本的に通過できない。DNA は 1 塩基で分子量約 300 であり、遺伝子治療に用いるベクターは少なくとも数千から 1 万塩基対、分子量数百万の高分子である。皮膚疾患に対する有効な遺伝子治療法を確立するためには、高分子 DNA を高効率に皮膚に導入する方法を開発する必要がある。今回われわれは、超音波と皮膚の化学処理を組み合わせ、広範囲生体皮膚に直接遺伝子導入する方法を開発したので報告する。

方 法

生後 10 週の SD ラットをネブタールで麻酔し、背部皮膚剃毛・アセトン脱脂後、ルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミド DNA pGL3 溶液 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ PBS) を塗布。DNA 溶液浸透後 24 時間待って、塗布部皮膚を 5 mm パンチバイオプシーにて採取し、cell lysis buffer (Clontech®) $400 \mu\text{l}$ でホモジネートを作成、その $30 \mu\text{l}$ を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。また、同様に処理したラット皮膚に DNA 溶液を塗布直後、治療用超音波発生装置を用いて種々の強さの超音波を 10 秒間照射し、24 時間後に同様に皮膚を採取してルシフェラーゼアッセイを行った。さらに、ラット皮膚を 70%グリコール酸で 10 分間処理した後、同様の DNA 溶液浸透効果をルシフェラーゼアッセイにて検討した。

結 果

DNA 溶液単純塗布のみでは、ルシフェラーゼ活性は殆ど検出されなかった (図 1)。DNA 溶液塗布後、塗布部皮膚に種々の強さで超音波を照射した結果、 $50\text{J}/\text{cm}$ までは超音波の強度依存性にルシフェラーゼ活性が増強し、単純塗布に比較すると数百倍の遺伝子導入効率の増強が得られた (図 1)。しかし、 $100\text{J}/\text{cm}^2$ ではルシフェラーゼ活性は減少し (図 1)、肉眼的にも超音波エネルギーによる皮膚組織障害 (熱傷) が認められた。

さらに遺伝子導入効率を高める目的で、70%グリコール酸で 10 分間皮膚を処理し、角層のい

わゆるケミカルピーリングを施行した。その結果、角層は未処理皮膚に比べて明らかに変性し、皮膚表面から遊離した。表皮顆粒層細胞の一部にも空胞変性が認められたが、有棘層、基底層には殆ど影響は見られなかった(図2)。ケミカルピーリングのDNA導入効果に与える影響を、単純塗擦および超音波処理それぞれの場合で比較検討した。その結果、ケミカルピーリング単独では単純塗擦と比較して優位な導入増強効果は認められなかった。しかし、ケミカルピーリングと超音波処理の組み合わせでは、超音波処理単独の10倍強の遺伝子導入増強効果が得られ、これは単純塗擦と比較すると10000倍以上の増強効果であった。

考 察

今回われわれは、超音波とケミカルピーリングを組み合わせることにより、角層バリアーを通過させて高分子DNAを生体皮膚に効率よく導入することが可能となることを初めて見いだした。今回の実験で用いた超音波発生装置は既に臨床の場でリウマチや顎関節症の組織癒着を改善する目的で用いられているものである。また、ケミカルピーリングは、とりわけ皮膚科領域で、皮膚のしみ、しわを取る目的で広く用いられつつある技術であり、安全性が確立されつつある。既に臨床応用されているこれらの技術を組み合わせることにより、これまで不可能であった広範囲生体皮膚への高分子DNA導入が可能となり、今後この方法が生体皮膚への高分子デリバリー技術として、遺伝子治療を始めとする種々の治療法に利用し得ると考えられる。

難治性遺伝性皮膚疾患、例えば先天性表皮水疱症に対して、現時点では有効な治療法はなく、手指の癒着、食道狭窄、有棘細胞癌の発生といった臨床症状の進行をくい止めることはできない。今回われわれが開発した技術を応用することにより欠損した遺伝子を補うことができれば、これらの難治性皮膚疾患に悩む多くの患者のQOLの向上、さらには生命予後の改善が可能になるかもしれない。

謝 辞

著者の研究班班員としての業務遂行にあたり、多くの事務的な作業を補助していただいた、弘前大学医学部皮膚科医局秘書、神輝美殿に深謝致します。

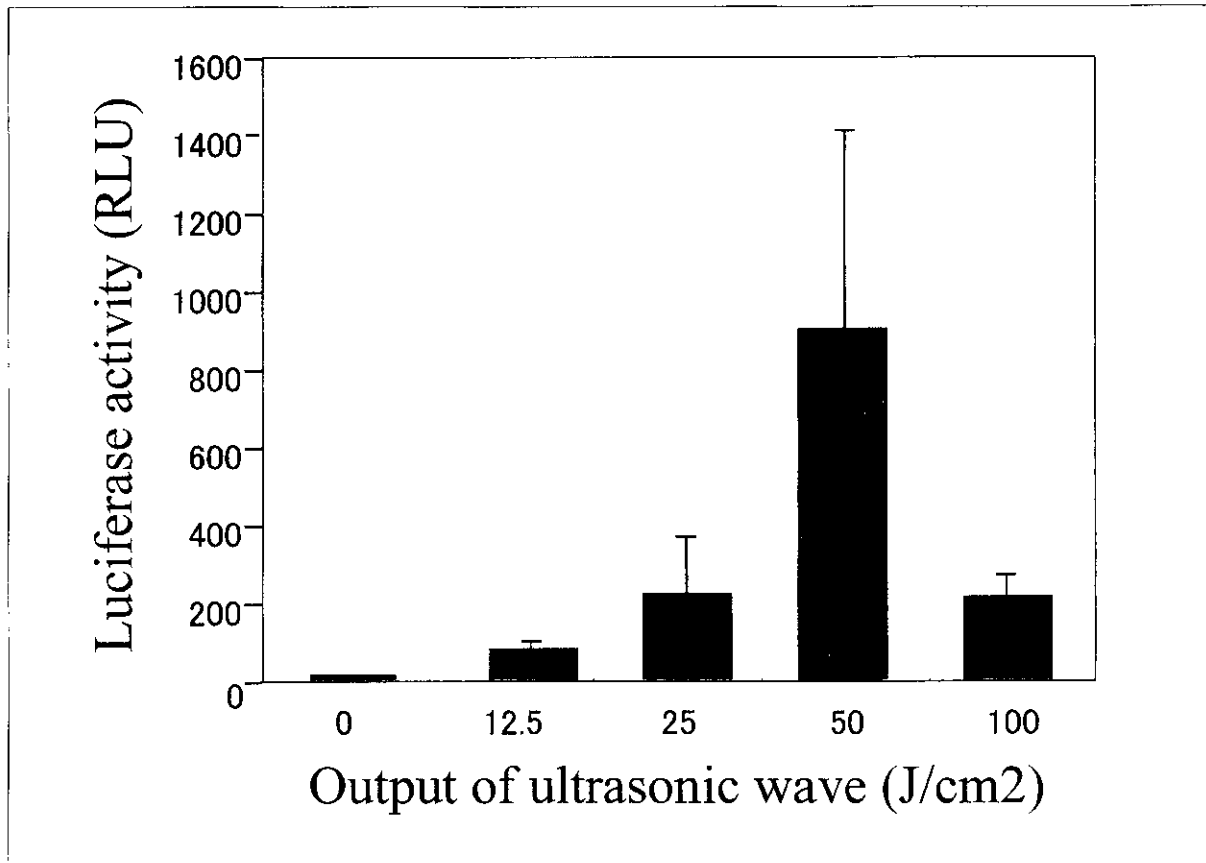
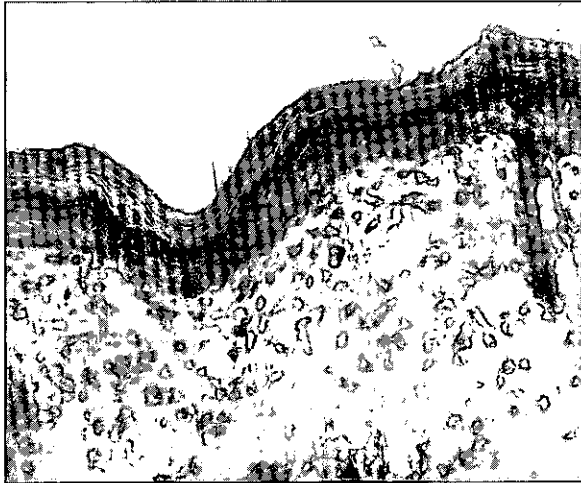


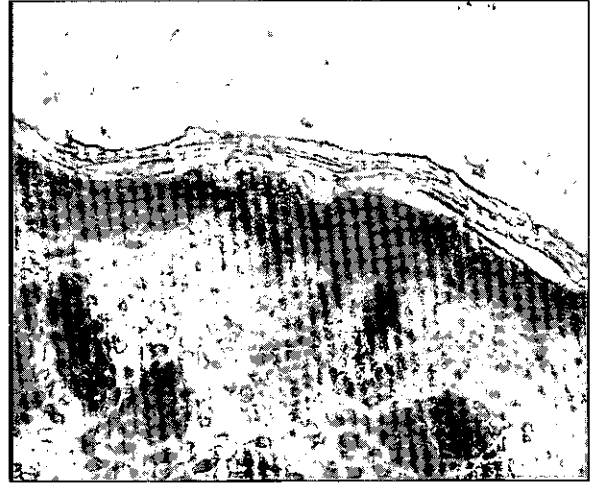
図1 遺伝子導入効率と超音波強度との関係

ラット皮膚に DNA 溶液を単純塗布後、種々の強さで超音波を照射し、遺伝子導入に対する超音波の効果を検討した。50J/cm²で最も高い導入効率を得られ、それ以上では組織の障害（熱傷）により導入効率は減少した。

正常ラット皮膚



70%グリコール酸、10分



HE stain, x400

図2 ケミカルピーリングによる表皮角層の変化

正常ラット皮膚を70%グリコール酸で10分間処理することにより、角層の変性、剥離、表皮顆粒層の空胞変性が観察された。

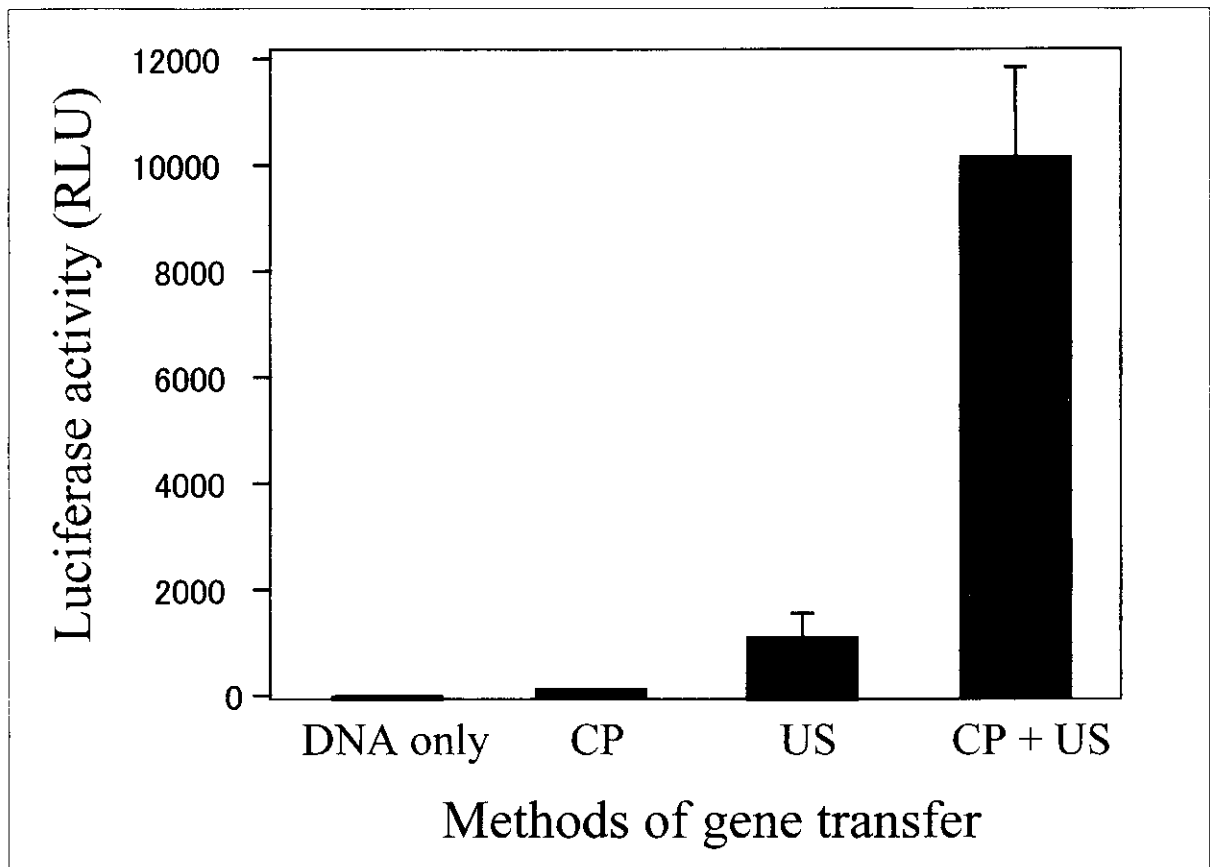


図3 遺伝子導入に対するケミカルピーリング (CP) の効果

超音波処理 (US) とケミカルピーリング (CP) を組み合わせること (US+CP) により、超音波処理単独 (US) に比較して約 10 倍、DNA 溶液単純塗布 (DNA only) に比較して約 10000 倍の遺伝子導入効果の増強が得られた。

3) Cre/loxP アデノウィルスベクターを用いた 三次元培養皮膚への遺伝子導入

協力研究者：橋 本 公 二 (愛媛大学医学部皮膚科)

共同研究者：花 川 靖、白 方 裕 司 (愛媛大学医学部皮膚科)

要 約

表皮水疱症の遺伝子治療の基礎研究として、Cre/loxP アデノウィルスベクターを用いた三次元培養皮膚への遺伝子導入について検討した。Cre recombinase を組み込んだアデノウィルスベクターと loxP 配列で挟まれた Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) を組み込んだアデノウィルスベクターを同時感染させ、その発現を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。単層培養角化細胞では6時間後より EGFP の発現が認められ、24-36 時間でピークに達した。次に三次元培養皮膚への遺伝子について検討した。まず、コラーゲンゲル上に角化細胞を播種する直前にアデノウィルスベクターを感染させ空気暴露により重層化させたところ、EGFP の発現は角層に局限し、基底細胞での発現はほとんど認められなかった。そこで、重層化後7日目の角層が完成した後、一時的に表皮と真皮を剥離し、直接アデノウィルスベクターを感染させたところ、EGFP は基底層と傍基底層に強く発現していた。すなわち、ウィルスベクターの感染時、感染方法を工夫することで、三次元培養皮膚の基底層に効率よく遺伝子を発現させることが可能となった。

は じ め に

栄養障害型表皮水疱症はその原因遺伝子がVII型コラーゲン遺伝子であることが同定された遺伝子性皮膚疾患であり(1)、将来遺伝子治療の適応となるべき疾患であると思われる。特に、劣性栄養障害型表皮水疱症は正常VII型コラーゲン遺伝子を導入することにより遺伝子治療が可能である。我々は、アデノウィルスベクターを用いた遺伝子導入を行っており角化細胞には100%遺伝子導入が可能であることを確認しており、将来的にはVII型コラーゲン遺伝子を挿入したアデノウィルスベクターが作成可能な状況となってきた。また我々は栄養障害型表皮水疱症患者に対する培養表皮シート自家移植・三次元培養皮膚移植の有用性について報告してきた。そこで、遺伝子治療の基礎的研究としてアデノウィルスベクターによる三次元培養皮膚への遺伝子導入について検討した。

方 法

正常ヒト皮膚より表皮ケラチノサイトを無血清培養法にて培養した。使用した細胞は3-4代継代したものをを用いた。真皮線維芽細胞は outgrowth 法にてダルベッコ変法 MEM に10%牛胎仔血清を加えた培地を用いて培養し、7-10代継代したものを使用した。

三次元培養皮膚の作製法：Bellの方法に準じカルチャーインサート(コースター社)を用いて三次元培養皮膚を作成した。I型コラーゲン溶液(セルマトリクスタイプ1A:新田ゼラチン):6容量に対して0.1N NaOH:1容量、8倍濃度 DMEM:1容量、20%FCS/DMEM:10容量の割合で中和コラーゲン液を作成し、インサートに1mlずつ添加し、ゲル化させた。