

予め培養しておいた対数増殖期の線維芽細胞をトリプシンで分散し細胞懸濁液を調整し、線維芽細胞を含む中和コラーゲン溶液を調整し、各インサートに 3.5ml ずつ添加しインキュベーター内でゲル化させた。ゲル化を確認した後 10%FCS/DMEM をゲルが浸る程度加え 5 日間静置培養した。培養開始後 5 日後にはゲル上部は収縮し直径 13–15mm 程度となり、この陥凹している上に角化細胞を播種し、角化細胞がゲルに密着するように 1.5–2.0 時間インキュベーター内で静置したのち、さらに 2–3 日間液相下で培養を続けた。引き続き空気にさらすことにより分化を誘導し（気相下培養）重層化させ、三次元培養皮膚を作成した。

アデノウィルスベクターの作製：COS-TPC 法を用いてアデノウィルスベクターを作製した。

Cre recombinase を組み込んだアデノウィルスベクター（AdexCre）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（AdexLNEGFP）をそれぞれ 293 細胞へ感染させ、大量に増殖させた後、超音波処理、塩化セシウム密度勾配法にて精製・濃縮し PBS（-）に対して透析したものを使用した。濃縮ウィルス液の力価 1×10^9 PFU/ml であった。

結 果

単層培養表皮角化細胞へ AdexCre, AdexLNEGFP を MOI=5+5, MOI=10+10 で感染させ、経時的に蛍光位相差顕微鏡にて観察した。6 時間後には EGFP の発現が認められ、角化細胞のほぼ 100% の細胞で EGFP の発現が認められた。EGFP の発現は時間経過とともに発現が増強し、24–36 時間でピークに達した。Cre/loxP システムと通常のアデノウィルスシステムでの EGFP の発現を比較したところ、EGFP の MOI に比例しており、Cre/loxP においても発現は同様に認められることが明かとなった。すなわち、遺伝子の on/off システムとしての Cre/loxP アデノウィルスベクターは角化細胞においても良好に作動することが明かとなった。つぎに三次元培養皮膚への遺伝子導入について検討した。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 の発現は角層に限局し、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。

考 按 ・ 結 論

アデノウィルスの長所としては感染効率の高さ、非分裂細胞にも遺伝子導入が可能であること、遺伝子の発現が一過性であること、高い濃度のウィルス液の作製が可能な点があげられる。問題点としては、細胞分裂により遺伝子が希釈されること、導入可能な遺伝子のサイズに制限があること、非特異的免疫反応が起きることなどがあげられるが、これら問題点についてそれぞれ改良されたウィルスベクターの作製が精力的に行われており近い将来解決されると思われる。Cre/loxP アデノウィルスベクターは遺伝子発現制御を可能とし、目的遺伝子を on/off できるシステムとして注目を集めている。今後の遺伝子治療においても、単に遺伝子を導入するだけでなく、遺伝子の発現量の調節や、導入遺伝子の削除などが必要となってくると思われる。Cre/loxP アデノウィルスベクターは角化細胞においても良好に作動することが明かとなった。さらに、三次元培養皮膚への遺伝子導入も Cre/loxP アデノウィルスベクターを用いることにより導入可能であった。また、ウィルスベクターの感染時期、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明かとなった。三次元培養皮膚移植はすでに実用可能であり、その有用性は表皮水疱症においても示されている。近い将来、三次元培養皮膚を用いた遺伝子治療が表皮水疱症において実施されることが期待される。

参考文献

1. 橋本公二：他：厚生省特定疾患稀少難治性皮膚疾患調査研究班平成七年度研究報告書、1996、p89-92
2. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K: Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. *J Cell Sci.* 113:1803-11, 2000
3. 橋本公二：培養皮膚の新たな展望。 *組織培養工学* 25:2-3, 1999
4. 白方裕司、橋本公二：培養表皮シート自家移植による劣性栄養障害型表皮水疱症の治療 *Excerpta Medica* 4:4, 2001
5. 白方裕司、徳丸 晶、橋本公二：三次元培養皮膚構成成分の組織学的検討と難治性皮膚潰瘍への応用。 *日本皮膚科学会誌* 109:1165-1171, 1999
6. 白方裕司、橋本公二：培養皮膚の臨床応用 *日本皮膚科学会誌* 109:1301-1307, 1999

Cre-loxP adenovirus-mediated foreign gene expression in skin equivalent keratinocytes

Koji Hashimoto (Ehime University School of Medicine)

Summary

The adenovirus (Ad) vector system is a highly effective means of expressing foreign genes in normal human keratinocytes (NHK). The regulation of transduced gene expression is important for the safety of gene therapy. We used the Cre-loxP adenovirus vector system in order to regulate transduced gene expression in NHK.

Co-infection of Cre-loxP adenovirus with an Ad vector expressing the nuclear localizing signal-tagged Cre recombinase removed the stuffer sequence and turned on the expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP). EGFP expression was detected at 6 hours, and peaked at 24 to 36 hours post-infection in NHK monolayers.

Initially, we infected keratinocytes with the adenovirus vector before seeding on collagen gels in order to study EGFP expression in skin equivalent keratinocytes, but found that EGFP expression was limited to the cornified cell layer when skin equivalency was achieved. Therefore, we developed a new method in which keratinocytes that had attained skin equivalency were infected with an Ad vector.

Using this approach, EGFP expression was strongest in the basal and suprabasal skin layers. The Cre-loxP adenovirus vector system represents a powerful tool for exogenous gene expression in monolayer and skin equivalent keratinocytes. This promising method will enable future investigations into the function of targeted genes, the development of keratinocyte-disease models, and the evaluation of skin-directed gene therapies.

4) 難治性皮膚疾患の遺伝子治療をめざした遺伝子導入法の開発

分担研究者：金 田 安 史（大阪大学医学系研究科）

要 約

先天性表皮水疱症をはじめとする全身皮膚の遺伝子性疾患の根本的な治療法については遺伝子治療法が望まれている。現状の技術では極めて困難であるが、この目標に一步でも近づける研究が必要である。本研究においては超音波と造影剤を用いて Naked DNA を羊水中に注入するとマウス胎仔皮膚に導入できる方法を開発した。

は じ め に

ウイルスベクター、非ウイルスベクター、或いはベクターなしの Naked DNA であっても直接生体皮膚組織内に注入すれば遺伝子発現がおこることが知られている。しかしその発現は注入部位に限られており、また多くの場合は発現レベルは低く、一過性である。広範囲の皮膚組織に如何に効率よく遺伝子を導入し、かつ治療に必要な程度に高い発現を維持できるかが大きな課題である。1つは全身皮膚の幹細胞を標的とした遺伝子治療法の開発であるが、皮膚の幹細胞が同定されていない現状では偶然に支配され、確率は極めて低い。もう1つは幼若期の広範囲の皮膚組織への遺伝子導入である。後者のためには、倫理的な問題は別に論じるとして、方法論のみから考えるなら、胎仔期の皮膚組織への導入があげられる。我々はすでに HVJ-liposome によりラット羊水中への遺伝子導入によって皮膚組織への遺伝子導入が可能であることを報告してきた。しかし少量のベクターしか導入できないマウス場合は成功しなかった。そこでこの技術をさらに改良しマウス胎仔皮膚への遺伝子導入を試みた。HVJ-liposome よりシンプルな Naked DNA 法ではやはり効率が悪いが、これに遺伝子導入増強が可能な種々の方法や薬剤を併用し皮膚組織への遺伝子導入に成功した。

方 法

妊娠 13-15 日の ICR マウス (50-60g) を麻酔し、plasmid DNA 10 μ g/5 μ l sterilized water と 5 μ l の造影剤 (optison; Mallinckrodt 社) の混合溶液を経子宮的に羊水中に microcapillary (GD-1.2, Narishige 社) で注入した。Plasmid DNA としては、cytomegalovirus promoter をもつ luciferase 遺伝子 (pGL3; Promega 社) と同じ promoter をもつ green fluorescent protein (GFP) (pEGFP; Clontech 社) を用いた。注入直後に、超音波発生装置 Ultax UX301 (Celcom 社) を用いて 2Hz, 4.0W/cm², 10sec の条件で子宮外から超音波処理した。子宮を母体に戻し、遺伝子発現を調べた。また FITC で蛍光標識した 20 mer のランダムオリゴヌクレオチド 50 μ g も同様にして羊水中に導入した。

結 果

1) この方法によるマウス胎仔の生存率は 73%であった。超音波を用いなければ、生存率は sham-operation group と同じく、約 90%であった。

- 2) 注入1日後のルシフェラーゼ遺伝子発現をマウス胎仔の各臓器を抽出して測定した結果、皮膚に最も高い遺伝子発現があり、ついで羊膜が皮膚遺伝子発現の約10%、その他の臓器（脳、心臓、肺、肝臓、腸）は皮膚の約1%であった。精巣での遺伝子発現はなかった。またPCRによっても精巣中に導入遺伝子の断片は検出しなかった。
- 3) 胎仔皮膚の電子顕微鏡観察では、造影剤存在中での超音波処理により皮膚に数ミクロン径の小孔があき、24時間後には修復されているのが認められた。
- 4) GFP 遺伝子発現では、胎仔の全身の皮膚に点状に GFP による蛍光が認められた。共焦点顕微鏡による観察で皮膚の1-2層に遺伝子発現を認めた。
- 5) 蛍光ラベルのオリゴヌクレオチドでも全身の皮膚に点状の蛍光が見られた。
- 6) 遺伝子発現の持続については、羊水中に遺伝子導入した場合は施行しなかったが、マウス胎仔の脳室中に遺伝子導入して、経時的に遺伝子導入を調べた実験では、導入1日後をピークに漸減したが約4週間にわたってルシフェラーゼ遺伝子発現を認めた。

考 察

この方法では造影剤が microbubble を形成して超音波により破裂するときのエネルギーで瞬間的に細胞膜に小孔があき、ここから遺伝子が細胞内に導入されると考えられる。したがって、造影剤と Naked DNA の混合剤が付着した部位に遺伝子導入がおこる。マウスの羊水中にこの方法で遺伝子を注入すれば、最も広い表面積をもつ皮膚に混合剤が付着して皮膚への遺伝子導入がおこったと考えられる。同様に、胸腔、腹腔、脳室内にその混合剤を注入し超音波処理を行うと、それぞれ、肺、腸、脳内で高い遺伝子発現を得た。

皮膚組織では均一に遺伝子導入がおこらず、点状であった。より均一な導入のために混合剤をできるだけ広範囲の皮膚に付着させるための造影剤の検討が必要であろう。もしこの方法で皮膚の幹細胞に遺伝子が導入され、染色体内に組み込まれれば、長期に遺伝子発現を起こせる可能性がある。今回は単なるプラスミド DNA であったが、染色体内に挿入できる確立の高いレトロウイルスゲノムとインテグラーゼやトランスポゾンとトランスポゼースの組み合わせを用いれば、長期遺伝子発現が実現できるかもしれない。

今回の方法では、羊水中に導入しマウス胎仔皮膚への遺伝子導入を誘発し、生殖腺への導入遺伝子の移行がないことは確認できたが、生存率は約70%であり、安全性の面からは推奨されるレベルには達していない。この方法を実際の医療に応用するためには、生後の皮膚組織にターゲットを絞らねばならない。弘前大学の玉井助教授と共同開発中の、Gene bath はマウスを遺伝子と造影剤の浴槽に入れ、超音波処理をする方法であり、予備検討では遺伝子導入が可能となっている。今後はこのような方法を発展させ、実際の医療に結びつけることが求められるであろう。

参考文献

1. King, D., Shakespeare, T., Nicholson, R., Clarke, A. & McLean, S. Risks inherent in fetal gene therapy. *Nature* 1999; 397; 383.
2. Kim, H. J., Greenleaf, J. F., Kinnick, R. R., Bronk, J. T. & Bolander, M. E. Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum. Gene. Ther.* 1996; 7; 1339-1346.
3. Taniyama, Y., Morishita, R., Hiraoka, K., Aoki, M., Nakagami, H., Yamasaki, K., Matsumoto, K.,

Nakamura, T., Knaeda, Y., and Ogihara, T.: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model. *Circulation* 2001; 104; 2344-2350.

Gene transfer to fetal mouse skin by intra-amniotic injection with microbubble-enhanced ultrasound

Yasufumi Kaneda (Graduate School of Medicine, Osaka University)

Summary

Intra-uterine injection of naked DNA expressing luciferase, green fluorescent protein and FITC-labeled oligodeoxynucleotide combination with microbubble-enhanced ultrasound (shotgun method; SGM) produced high-level expression in fetal mice. When SGM was applied to intra-amniotic cavity, luciferase expression increased approximately 10^3 -fold in comparison to that with injection of naked DNA alone, and expression was predominantly detected in the skin tissue of fetal mice. Electron microscopic analysis demonstrated transient formation of pores on the surface of the skin after intra-amniotic injection with SGM. Injected DNA was not detected in gonadal tissue of fetal mice.

5) 表皮水疱症の難治性皮膚潰瘍治療のための基礎的知見

c 徐放性細胞増殖因子を利用した生体組織工学

人工真皮（ペルナック®）に対する徐放化 basic fibroblast growth factor の添加効果

分担研究者：田 畑 泰 彦（京都大学再生医学研究所）

要 約

現在、皮膚全層欠損創に対しては、人工真皮（ペルナック®）の臨床応用が行われているが、二次植皮まで2～3週間の期間を要し、また感染創には使用しにくいものと考えられる。そこでわれわれは、真皮様組織の形成を早め、感染に強い移植母床を築くために人工真皮に basic fibroblast growth factor (bFGF) の添加を試み、bFGF のもつ線維芽細胞増殖および血管新生促進作用を介した創面の治癒促進効果を検討した。

モルモットの背部に2×2 cm²の皮膚全層欠損創を作製、bFGF 100 μg の水溶液を含有させた人工真皮を移植した。対照群は bFGF を含まない人工真皮を用い、その組織学的変化を経日的に検討した。また、ゼラチン粒子に含浸させた bFGF を人工真皮内に注入し、ゼラチン粒子から bFGF の徐放システムを人工真皮に組み合わせた。

bFGF 添加群は無添加群に比べて、5日目以降線維芽細胞の侵入が増加し有意差がみられ、7日目以降その差は顕著に現れた。血管新生量、コラーゲン新生による真皮様組織形成速度でも差が認められた。一方、bFGF 徐放群では、水溶液 bFGF と比較して、7日目以降線維芽細胞の侵入量、コラーゲン産生量に差が見られ、コラーゲンスポンジ上層での血管新生も豊富にみられた。

以上の結果より、人工真皮に bFGF の徐放システムを組み合わせることで、より良い移植母床の構築促進が可能となることがわかった。

はじめに

現在、広範囲の3度熱傷等の皮膚全層欠損創に対し、人工真皮（ペルナック® R）の臨床応用が行われている¹⁻³⁾。人工真皮の目的は、コラーゲンからなるスポンジの中への線維芽細胞の侵入増殖ならびに毛細血管の新生とともに、新しいコラーゲン線維の構築によりスポンジが真皮様組織に置換されることである。しかしながら、通常の場合、二次的植皮術までに2～3週間の期間を要する。2週間で二次植皮を行った場合、コラーゲンスポンジの最上層に細胞の侵入増殖のない部分が残し、分層植皮片がこの空隙内に落ち込み、microatheroma を多発した症例も経験している。

Basic fibroblast growth factor (bFGF) は外胚葉及び中胚葉由来の細胞を増殖させる作用をもつため、皮膚欠損部への局所投与により創傷治癒が促進されるという報告が多く行われている⁴⁻⁸⁾。われわれはこの bFGF を人工真皮と組み合わせることにより、増殖線維芽細胞によるコラーゲンの産生、真皮様組織形成促進と、血管新生の結果、より早く、より良好な植皮母床が得られるものと考えた。bFGF は蛋白質であるため、単なる水溶液投与ではその生物学的半減期

は短く、徐放化が必要であると考えられる。既に bFGF の徐放化により、その生物効果が高まることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。この徐放システムでは、ゼラチンからなるハイドロゲル内で bFGF をイオンのゼラチン分子に固定化し、ゼラチンの分解、水可溶化とともに活性のある bFGF を徐放化できる¹²⁾。今回は、bFGF を徐放させるためのゼラチンの粒子を作製し、その粒子を人口真皮内へ注入、徐放化 bFGF の真皮様組織形成促進作用を評価した。

材料及び方法

ゼラチン粒子の作製

等電点 4.9、分子量 99000 のゼラチンの 10wt% 水溶液 10ml を 40℃ 攪拌下 (450rpm.) olive oil 350ml 中に加えた。10 分後温度 20℃ に下げ、さらに 30 分攪拌を続けた。Acetone 100ml を加え、20℃、300rpm. で攪拌した。1 時間後 acetone 及び isopropyl alcohol を用いて、5℃、5000rpm. 5 分の条件で遠心分離によりゼラチン粒子を回収した。ふるいにより分別した粒子径 40um 以下の粒子を 0.1wt% の Tween 80 を含む 2 wt% glutaraldehyde の水溶液中 4℃、12 時間攪拌することによって粒子を化学架橋した。次に、粒子を 100mM glycine 水溶液中 37℃ で 30 分処理した。0.1wt% Tween 80 溶液を用いて、粒子を遠心洗浄分離することによって GA 架橋 gelatin microsphere を作製した。

作製した粒子は凍結乾燥した。乾燥した粒子径と蒸留水で膨潤させた粒子径との比率を含水率として計算した。今回使用したゼラチン粒子の含水率は 88.7% である。

100 μg の bFGF を含む水溶液 (12ul) を凍結乾燥ゼラチン粒子 (2 mg) へ滴下、室温で 30 分放置、bFGF 水溶液をゼラチン粒子に吸収させることによって bFGF 含浸粒子を得た。bFGF を含まない水溶液を浸させた空粒子の作製も行った。

人工真皮との組み合わせは、bFGF 含浸粒子、空粒子、bFGF 水溶液 (12 μl) 及び生理食塩水 (12 μl) に、それぞれ生理食塩水 0.5ml を加え、コラーゲンスポンジ内層から等間隔に注射器で均一になるように注入した。

in vivo での bFGF の粒子からの徐放性の評価

9 週齢の雌性 ddy マウスを使用した。背部に 1 × 1 cm² の皮膚全層欠損創を作製した。移植した人口真皮は、bFGF 水溶液を注入したスポンジ (単回投与群) と bFGF 含浸ゼラチン粒子を注入したスポンジ (徐放群) である。bFGF は ¹²⁵I で標識し、投与量は 100 μg/site である。移植 1、3、5、7 および 10 日後に両群 3 匹ずつ創部の ¹²⁵I の RI count を行い bFGF の残量を測定した。

移植実験

11 週間の雄性 Iec: Hartley モルモットを使用した。背部に 2 × 2 cm² の皮膚全層欠損創 (panniculus carnosus 上) を左右対称に 4 つ作製した。移植した人口真皮は、bFGF 含浸ゼラチン粒子を注入したスポンジ (単回投与群)、ならびに生理食塩水のみを注入したスポンジ (コントロール群) である。bFGF の投与量は 100 μg/site である。移植 3、5、7、10 および 14 日後に各群 3 匹ずつ創より組織を採取し、HE 染色にて組織標本を作製し、組織学的に各群の線維芽細胞の侵入、血管新生の比較評価をした。

スポンジ内への侵入線維芽細胞数の測定

各組織標本中央を光学顕微鏡（100倍）で観察、1視野につき panniculus carnosus 上からコラーゲンスポンジ最上層までの線維芽細胞数を計測した。

bFGF の in vivo 残存率（図1）

単回投与群の bFGF の残存率は、移植後1日で24.7%とスポンジへ注入された約3/4の bFGF が消失した。その後徐々に減少し10日目には7.3%であった。一方、徐放群では移植後1日で74.7%と単回投与群とは逆に注入 bFGF の約3/4がスポンジ内に残存していた。また10日目でも22.3%残存しており、この残存量は単回投与群の1日目にほぼ等しかった。また5日目以降も bFGF 残存量に有意な差が認められた。

移植実験

組織学的所見

移植後3日では、各群の間で著明な差は認められなかった。

移植後5日（図2）になると、bFGF 無添加群（コントロール群、空粒子群）では、コラーゲンスポンジ内への線維芽細胞侵入は下層に少しみられるだけでまだ少なく、血管新生は認められなかった。bFGF 添加群（単回投与群、徐放群）ではコラーゲンスポンジ下層から中間層にかけて線維芽細胞の侵入がみられ、血管新生も所々認められたが、単回投与群と徐放群との間では差を認めなかった。

移植後7日（図3）には、bFGF 無添加群では、線維芽細胞の侵入はコラーゲンスポンジ中間層までに留まっており、上層には細胞侵入はなくコラーゲンスポンジの空隙がみられた。一方、下層部では血管新生が少しながら認められた。bFGF 添加群ではコラーゲンスポンジ上層近くまで線維芽細胞の侵入がみられ、多くの血管新生が認められた。徐放群は単回投与群とは異なり、スポンジ上層部にまで血管新生がみられた。

移植後10日では、bFGF 無添加群の線維芽細胞の侵入はコラーゲンスポンジ中間層から上層にかけて進んでいたが、上層にはまだ空隙が残っていた。bFGF 添加群ではコラーゲンスポンジ上層まで線維芽細胞の侵入がみられ、血管新生も増加していた。

移植後14日（図4）になると、bFGF 添加群ではコラーゲンスポンジ最上層まで線維芽細胞の侵入を認めたが、その密度は徐放群の方が単回投与群に比べて密であり、徐放群では特にコラーゲンスポンジ上層での血管新生がより豊富にみられた。

線維芽細胞数（図5）

いずれの群においても、時間とともに線維芽細胞はコラーゲンスポンジ内部へ侵入していた。しかしながら、その程度はスポンジの処理方法によって異なっていた。

空粒子群は、コントロール群に比較して、全ての時間範囲において、侵入線維芽細胞数の有意差はなかった。

bFGF 添加群と無添加群との比較では、移植3日後には単回投与群、徐放群ともそれぞれの対照群に対して有意差は認められなかったが、移植5日後以降では両者の間に有意差を認めた。

単回投与群と徐放群の比較では、移植後5日目までは有意差はなかったが、移植後7日目以降に有意差を認めた。

FGF は、1974 年 Gospodarowicz¹³⁾ により線維芽細胞の増殖を刺激する因子として、ウシ脳下垂体から分離された分子量約 17000 の蛋白質であり、現在では、9 種の FGF ファミリーが発見されている^{14, 15)}。bFGF は 1980 年代には遺伝子がクローニングされ、遺伝子組み換え型 bFGF が得られるようになり、基礎的研究が急速に進められた¹⁶⁻¹⁸⁾。bFGF は線維芽細胞だけでなく血管内皮細胞、筋線維芽細胞、表皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞など内、外胚葉系の様々な細胞の増殖を誘導し、血管新生作用とともに肉芽形成促進作用、表皮形成促進作用といった創傷治癒を促進させる作用も有している¹⁹⁻²³⁾。

bFGF の創傷治癒促進作用に関する実験は様々なモデルを用いて数多く報告されている。McGee ら⁴⁾ や Slavin ら⁵⁾ は incisional wound に対して bFGF 投与で tensile strength、breaking energy が増加することを報告している。Klingbeil ら⁶⁾ は、種々の創傷治癒遷延モデルを用い bFGF 投与による創傷治癒促進効果を、奥村ら^{7, 8)} は遺伝子的糖尿病マウスを用いて、皮膚全層欠損創に対する評価を行い、bFGF 投与により用量依存性に創傷治癒を促進させる作用があり、また bFGF の連続投与、間欠的投与により単回投与に比べてさらに有効であったとも報告している。

今回われわれは、bFGF 徐放の担体としてゼラチン粒子を使用した。人口真皮（ペルナック®）の pore size は 70~110 μm であるため、コラーゲンスポンジの空隙内にゼラチン粒子が均一に注入されるように粒子の大きさは 40 μm 以下とした。ゼラチン粒子の中に bFGF はゼラチンとポリイオンコンプレックスを形成し、ゼラチンの分解とともに bFGF がゼラチン粒子から放出される⁹⁻¹²⁾。予想通り図 1 に示すように、in vivo において bFGF の徐放が観察された。

線維芽細胞の侵入量は、bFGF をスポンジ内へ注入することにより、5 日目以降対照群として有意に増加した。これは bFGF の有する線維芽細胞増殖作用の効果であると考えられる。また、7 日目以降徐放群は単回投与群に比し線維芽細胞数が著明に増加した。この差は bFGF の徐放効果によるものと考えられる。5 日目以降もゼラチン粒子から生物活性な bFGF が放出され作用を及ぼしたのであろう（図 5）。

組織学的所見では、新生血管は 5 日目以降 bFGF 無添加群に比べて bFGF 添加群の方が多くみられたが、これは bFGF の血管新生作用のためであると考えられた。また、単回投与群に比べて徐放群の方がコラーゲンスポンジ上層での血管新生が多く認められたが、bFGF の徐放効果によるものと考えられる。また、ゼラチン粒子はスポンジ内に均一に分布しており、コラーゲンスポンジ上層部で放出された bFGF によりコラーゲンスポンジ上層部における血管新生が促進されたとも考えられる。このように、bFGF 含浸ゼラチン粒子はその bFGF 徐放性により、スポンジ内への線維芽細胞の侵入、血管新生を促進し、血行の良い、感染に強い母床を形成するのに有効であると考えられる。

今回 bFGF 投与量を 100 μg としたのは、マウス皮下投与実験の結果血管新生が最もみられた投与量であり⁹⁾ これを参考にしたが、細胞数の増加が真皮様組織に及ぼす影響を考慮し投与量の設定を行っていく必要がある。

ま と め

1. 対照群に比べ、bFGF 添加群の方が 5 日目以降、コラーゲンスポンジ内への線維芽細胞の侵入増殖及び血管新生が多く認められ、真皮様組織形成は促進された。
2. BFGF を徐放化することにより、単回投与に比較して、7 日目以降、線維芽細胞の侵入・

増殖は有意に促進され、血管新生もコラーゲンスポンジ上層でより多くみられた。
BFGF 添加により、さらに人口真皮の適応拡大が期待されるものと思われる。

参考文献

- 1) 鈴木茂彦, 一色信彦, 平良達三, 他: 再凍結乾燥型2層性人口皮膚 (GM901) の多施設における臨床使用結果, 形成外科 1993; 36: 479-483.
- 2) Matsuda K., Suzuki S., Issiki N., et al.: Re-freeze dried bilayer artificial skin, *Biomater.* 1993; 14: 1030-1035.
- 3) Suzuki S., Matsuda K., Maruguchi T., et al.: Further application of "bilayer artificial skin", *Br. J. Plast. Surg.* 1995; 48: 222-229.
- 4) McGee G. S., Davidson J. M., Buckley A., et al.: Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing, *J. Surg. Res.* 1988; 45: 145-153.
- 5) Slavin J., Hunt J. A., Nash J. R., et al.: Recombinant basic fibroblast growth factor in red cell ghosts accelerates incisional wound healing, *Br. J. Surg.* 1992; 79: 918-921.
- 6) Klingbeil C. K., Cesar L. B., Fiddes J. C.: Basic fibroblast growth factor accelerates tissue repair in models of impaired wound healing, *Prog. Clin. Biol. Res.* 1991; 365: 443-458.
- 7) Okumura M., Okuda T., Nakamura T., et al.: Effect of basic fibroblast growth factor on wound healing in healing-impaired animal models, *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 1996; 46: 547-551.
- 8) Okumura M., Okuda T., Nakamura T., et al.: Acceleration of wound healing in diabetic mice by basic fibroblast growth factor, *Biol. Pharm. Bull.* 1996; 19: 530-535.
- 9) Tabata Y., Hijikata S., Ikada Y.: Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogels *J. Cont. Rel.* 1994; 31: 189-199.
- 10) Yamada K., Tabata Y., Yamamoto K., et al.: Potential efficacy of basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration, *J. Neurosurg.* 1997; 86: 871-875.
- 11) Kimura H., Sakamoto T., Hinton D. R., et al.: A new model of subretinal neovascularization in the rabbit, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995; 36: 2110-2119.
- 12) Tabata Y., Ikada Y.: Protein release from gelatin matrices, *Adv. Drug Del. Rev.* 1998; 31: 287-301.
- 13) Gospodarowicz D.: Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth, *Nature* 1974; 249: 123-127.
- 14) Basilico C., Moscatelli D.: The FGF family of growth factors and oncogenes, *Adv. Cancer Res.* 1992; 59: 115-165.
- 15) Miyamoto M., Naruo K., Seko C., et al.: Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the member of the fibroblast growth factor family which has a unique secretory property, *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 4251-4259.
- 16) Sprugel K. H., McPherson J. M., Clowes A. W., et al.: Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers, *Am. J. Pathol.* 1987; 129: 601-613.
- 17) Rifkin D. B., Moscatelli D.: Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor, *J. Cell Biol.* 1989; 109: 1-6.
- 18) Servold S. A.: Growth factor impact on wound healing, *Clin. Podiatr. Med. Surg.* 1991; 8: 937-953.
- 19) Tanaka E., Ase K., Okuda T., et al.: Mechanism of acceleration of wound healing by basic fibroblast growth factor in genetically diabetic mice, *Biol. Pharm. Bull.* 1996; 19: 1141-1148.
- 20) Gospodarowicz D., Ferrara N., Schweigerer L., et al.: Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor, *Endocrine Rev.* 1987; 8: 95-114.

- 21) Gospodarowicz D.: Fibroblast growth factor and its involvement in developmental processes, *Curr Topics Dev. Biol.* 1990; 24: 57-93.
- 22) Bennett N. T., Schultz G. S.: Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors, *Am. J. Surg.* 1993; 165: 728-737.
- 23) Bennett N. T., Schultz G. S.: Growth factors and wound healing II: Role in normal and chronic wound healing, *Am. J. Surg.* 1993; 166: 74-81.

英 文 抄 録

Additional Effect of Basic Fibroblast Growth Factor Released on the Tissue Regeneration in an Artificial Dermis

Yasuhiko Tabata (Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University)

Summary

The purpose of this study is to evaluate the additional effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) into an artificial dermis (Pelnac[®]) on the wound repairing of dermal defects. It has been reported that topical application of bFGF can accelerate the wound healing. But when applied in the free form, the biological activity of bFGF cannot be expected because the half-life period of bFGF is too short. bFGF was impregnated into biodegradable gelatin microspheres for the controlled release.

The artificial dermis incorporating bFGF (100 μ g) in the solution and microspheres-impregnated form were implanted into the skin defect 2×2 cm² of guinea pig back.

The results indicated that topical application of bFGF accelerates the proliferation of fibroblasts and capillary formation in the dermal defect. The bFGF-impregnated gelatin microspheres induced the infiltration of fibrous tissue and neovascularization to a significantly greater extent than free bFGF. This indicates that incorporation of the bFGF release system enabled the artificial dermis to accelerate the tissue regeneration.

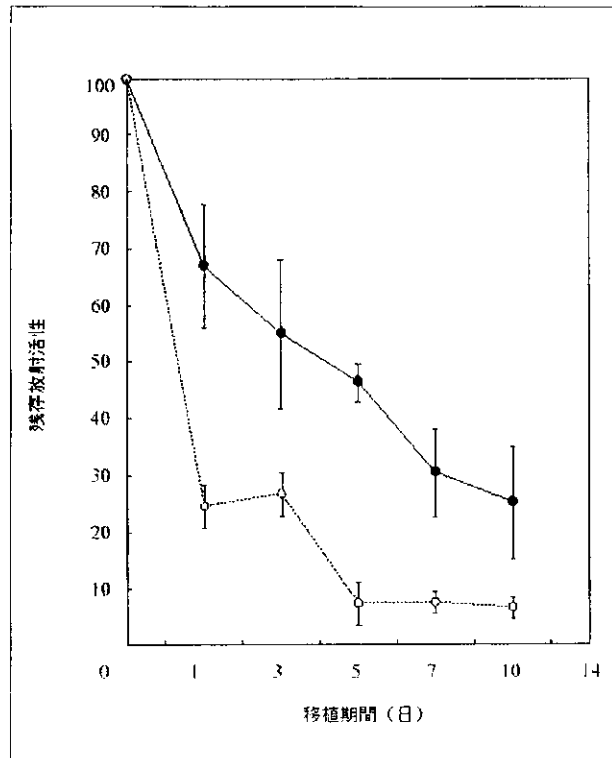


図 1 : 体内における bFGF の残存プロファイル
 n = 3, 平均値
 **: $p < 0.005$; 単回投与群との比較 (Student T test)

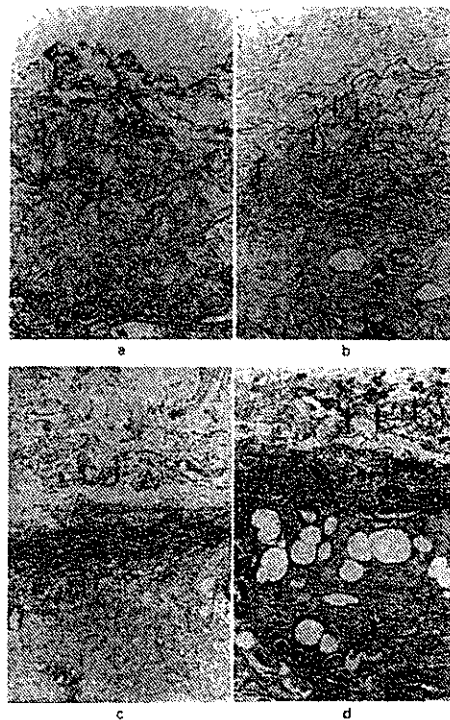


図 2 : 人口真皮移植 5 日後の組織切片 (HE×100)
 a : コントロール群、b : 空粒子群、c : 単回投与群、d : 徐放群
 bFGF 無添加群 (a、b) では人口真皮コラーゲンスポンジ内への線維芽細胞侵入は少ない。
 BFGF 添加群 (c、d) ではコラーゲンスポンジ下層に線維芽細胞の侵入が強く、血管新生を認める。
 b、d では残存するゼラチン粒子がみられる (矢印)。

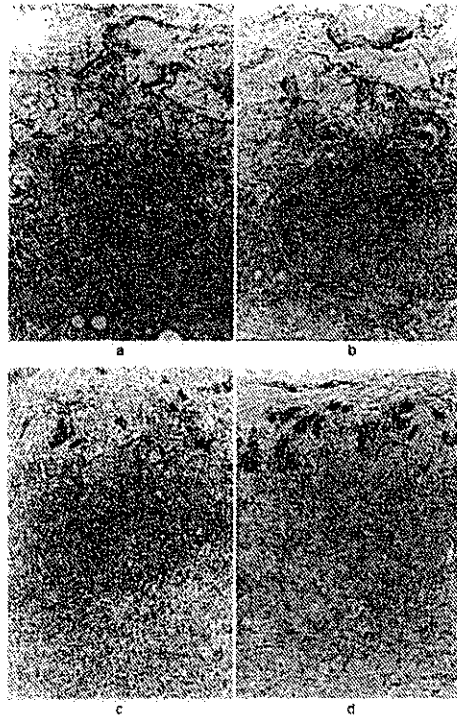


図3：人口真皮移植7日後の組織切片（HE×100）

a：コントロール群、b：空粒子群、c：単回投与群、d：徐放群

bFGF無添加群（a、b）では細胞侵入がコラーゲンスポンジ中間層までにとどまっております、上層には空隙がみられる。

bFGF添加群（c、d）ではコラーゲンスポンジ上層まで細胞侵入を認め、血管新生も豊富にみられる。

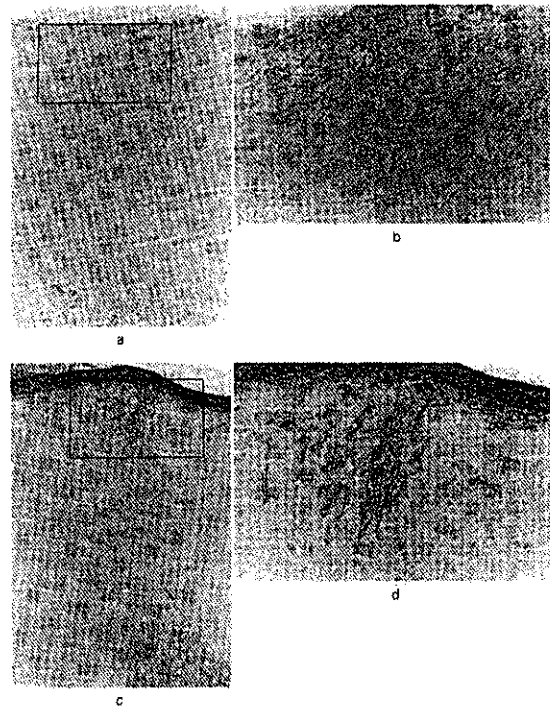


図4：人口真皮移植14日後の組織切片

a：単回投与群（HE、×40）、b：単回投与群（HE、×100）、

c：徐放群（HE、×40）、d：徐放群（HE、×100）

単回投与群、徐放群ともコラーゲンスポンジ上層まで細胞の侵入がみられるが、徐放群の方が細胞密度が高く、コラーゲンスポンジ上層での血管新生を豊富に認める。

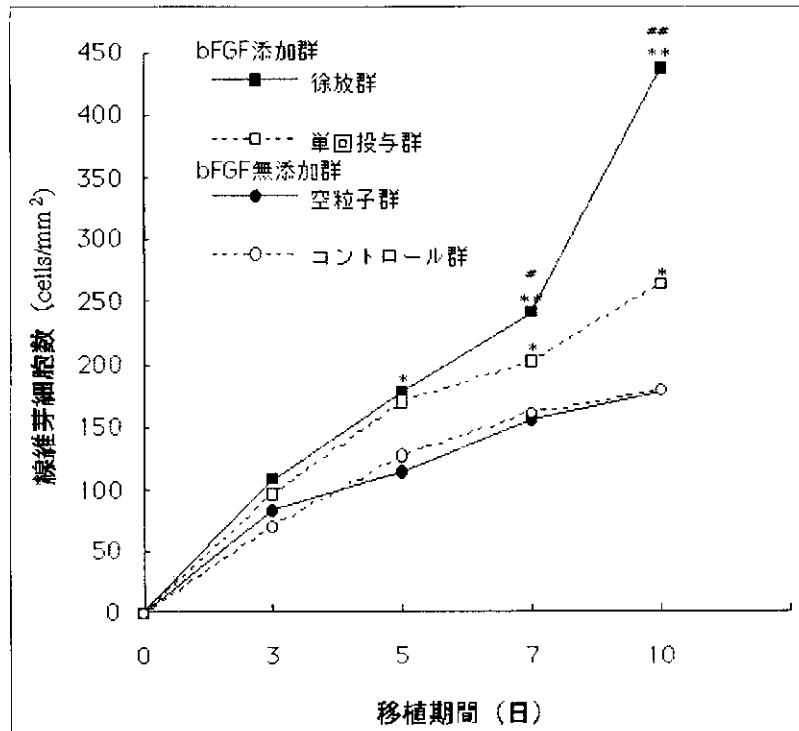


図5：人口真皮へ侵入した線維芽細胞数の時間変化

n = 3, 平均値

* : $p < 0.01$; bFGF 無添加群との比較

** : $p < 0.005$; bFGF 無添加群との比較

: $p < 0.01$; 単回投与群との比較

: $p < 0.005$; 単回投与群との比較 (Student T test)

6) ケラチン病の病態生理に関する研究

協力研究者：真 鍋 求 (秋田大学医学部皮膚科)

共同研究者：米 田 耕 造 (秋田大学医学部皮膚科)

邦 文 要 約

単純型先天性表皮水疱症 (epidermolysis bullosa simplex; EBS) は、常染色体遺伝子疾患であり、日常の微弱な機械的刺激が加わる部位の皮膚に容易に水疱を生じる疾患である。EBS は水疱形成の程度からさらに軽症の Weber-Cockayne (WC) 型、水泡形成が全身に及ぶ Kobner (KB) 型、最も重症型の Dowling-Meara (DM) 型に分類される。近年 EBS はケラチン 14 (K14) またはケラチン 5 (K5) 分子のアミノ酸配列に生じた変異が原因であることが明らかになった。しかしケラチン遺伝子の変異と臨床像および病理組織像との関係は未だ完全には解明されていない。例えば DM 型の EBS では基底細胞細胞質内にケラチン中間径線維の凝集塊が存在するが、何故このような凝集塊が生じるかは不明である。今回われわれはこの凝集塊の形成にユビキチン、プロテアソーム系が関与しているのではないかと考え実験を実施した。ヒトケラチン 14 遺伝子に EBS-DM 型で観察される変異 (Arg125→Cys) を PCR により導入し、cytomegalovirus promoter をもつ発現ベクターである pcDNA3.1/V5-His ベクターに挿入した (このベクターを pcDNA3.1/V5-His-Mutant K14 と名付ける)。ヒトケラチンサイトの株細胞である HaCaT 細胞に pcDNA3.1/V5-His-Mutant K14 をリポソーム法にてトランスフェクションし、48 時間後に細胞を固定し、二重免疫蛍光抗体法にて観察した。抗ユビキチン抗体と抗 V5 抗体を用いた二重染色の結果、トランスフェクションされた HaCaT 細胞に観察されるケラチン凝集塊はユビキチン化されていることが明らかになった。ケラチン凝集塊が観察される細胞では、ユビキチン、プロテアソーム系が正常に働いていないため、凝集塊が見られる可能性が示唆された。

は じ め に

単純型表皮水疱症において点突然変異を持つケラチンが発現すると何故細胞内に水疱形成がおこるのか?そしてこれを如何にして阻止するか? これらはケラチンの異常 (ケラチン病) と病態形成を結び付ける重要な課題であるとともに、臨床研究の究極の目的である治療法の開発に直接関わってくると考えられる¹⁾。上記の疑問に答えるためには、点突然変異を挿入したケラチン遺伝子を培養細胞に発現させる系を用いるのが有効であると思われる²⁾。われわれは、この系を用いてケラチン病の病態生理を解明し、治療への端緒を得ることを試みた。

材 料 と 方 法

平成 11 年度報告書では、pIND/V5-His-Wild Kz14 および pIND/V5-His-Mutant K14 の作製について報告した。今回はこれらのベクターより coding sequence を制限酵素 HindIII および Xba I を用いて切り出し、pcDNA3.1/V5-His ベクター (インビトロジェン) の HindIII / Xba I サイトに挿入し、新たな発現ベクターを作製した。ヒト角化細胞株である HaCaT 細胞を

10%胎児血清添加 DMEM 培地で培養し、トランスフェクション前日にカバーガラス上に、継代した。70%コンフルエンスの HaCaT 細胞に pcDNA3.1/V5-His-Wild K14 および pcDNA3.1/V5-His-Mutant K14 ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションはリポフェタミンプラス試薬（インビトロジェン）を用いた。トランスフェクションを行ってから 48 時間後に細胞を冷アセトン固定した。ユビキチンを染色するために、ウサギ抗ウシユビキチン抗体（ダコ）（100 倍希釈）を用い、二次抗体として FITC ヤギ抗ウサギ IgG（ダコ）を用いた。トランスフェクションされた野生型ケラチン 14 と変異ケラチン 14 は抗 V5 抗体（インビトロジェン）（200 倍希釈）を用いて染色することにより検出した。この場合二次抗体としてビオチン化抗マウス IgG（シグマ）を用い、最終的に Cy3 化ストレプトアビジン（シグマ）を反応させ可視化した。免疫組織化学染色を施した細胞は、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

結 果

pcDNA3.1/V5-His-Wild K14 をトランスフェクションした場合、トランスフェクションされた細胞の約 80%の細胞において、V5 抗体で染色されるケラチン（即ちトランスフェクションされた野生型ケラチン 14）は内在性のケラチン線維に取り組みられているのが観察された。約 20%の細胞において、トランスフェクションされた野生型ケラチン 14 は細胞質において凝集塊を形成していた。pcDNA3.1/V5-His-Mutant K14 をトランスフェクションした場合、トランスフェクションされた細胞の約 80%の細胞において、V5 抗体で染色されるケラチン（即ちトランスフェクションされた変異型ケラチン 14）は細胞質において凝集塊を形成していた。約 20%の細胞において、トランスフェクションされた変異型ケラチン 14 は内在性のケラチン線維に取り組みれていた。細胞質に見られるケラチンの凝集塊がユビキチン化されているかどうかを、免疫組織化学により、検討したところ、ケラチン凝集塊はユビキチン化されていることが分かった。内在性のケラチン中間径線維に取り組みられたケラチン 14 蛋白質（即ちトランスフェクションされたケラチン 14）はウサギ抗ウシユビキチン抗体で染色されなかった。

考 按

ケラチンは細胞質内に線維状に分布する細胞骨格蛋白であり、細胞の形態維持に重要な役割を果たしている。また表皮において最も大量に存在する蛋白質はケラチンである。近年のケラチン研究の進展には目覚ましいものがある。即ちケラチン遺伝子の構造が解明され、ケラチン分子が中間径線維を形成する過程が分子レベルで理解できるようになった¹⁾。ケラチン遺伝子および蛋白の研究は一部の遺伝性皮膚疾患の発症機序を明らかにすることもつながった。Fuchs らが、ケラチン蛋白 (Keratin14) の rod domain の一部が欠失した異常ケラチン蛋白を発現するトランスジェノックマウスを作製したところ、単純型表皮水疱症 (EBS) の病的形質を示す異常マウスが出来た³⁾。さらに Fuchs らと Epstein らにより、実際にケラチン遺伝子に点突然変異が存在することが報告された^{2) 4)}。その後も同様の手法を用いることにより、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症や掌蹠角化症をはじめとする多くの遺伝性皮膚疾患においてケラチン遺伝子の点突然変異および欠失が見い出された。現在では、ケラチン遺伝子の変異により、細胞が機械的に対して脆弱となり、その結果として種々の病変が形成される一連の疾患群はケラチン病と総称されている。しかし現在ケラチン病の疾患概念が確立したものの、解決すべき課題は多々残されている。例えばケラチン病では空胞変性と呼ばれる病理組織像も観察されるが、何故このように細胞質

に空胞が生じるかについてもよく分かっていない。今回われわれの研究目的は、ケラチン病に共通に認められる所見であるケラチン凝集塊の生成機序を明らかにすることであった。我々はこれらの機構にユビキチン、プロテアソーム系が関与しているのではないかという仮説をたてた。ユビキチン、プロテアソーム系は蛋白質の品質管理に非常に重要な役割を果たしている蛋白質でありユビキチンとそのパートナーであるプロテアソームの研究は近年未曾有の発展を遂げ、生命科学の重要な一分野をなしている。ケラチン凝集塊を人口的に作製するため、われわれは transient transfection の系を用いることにした。今回、野生型ケラチン 14 をトランスフェクションした場合でも約 20%の細胞にケラチン凝集塊が観察された。この現象は、トランスフェクションされた野生型ケラチン 14 蛋白質が内存性のケラチン蛋白質に対しドミナントネガティブに働いたため、ケラチン凝集塊が細胞質に生じたものと考えられる。また、EBS で最も多く見られる変異である Arg125-Cys の変異を入れたケラチン 14 蛋白質を発現させても細胞質にケラチン凝集塊が見られないことがあったのは、変異ケラチン 14 蛋白質の発現量が低いため、ドミナントネガティブ効果が生じなかったためと考えられる。われわれは、HaCaT 細胞にケラチン 14 遺伝子をトランスフェクションした場合に生じるケラチン凝集塊がユビキチン化されていることを発見した。近年ケラチン 18 遺伝子をノックアウトしたマウスが作製されたが、このノックアウトマウス（ホモ）では、生後 18 ヶ月後に、肝臓にケラチン 8 蛋白質よりなるケラチン凝集塊が見られるようになる。このケラチン 8 蛋白質凝集塊もユビキチン化されていることが示されている⁵⁾。また、昨年ユビキチン化された蛋白質凝集塊が蛋白質分解酵素システムであるプロテアソームの働きを阻害することも示された⁶⁾。われわれがケラチン 14 遺伝子を HaCaT 細胞にトランスフェクションした場合生じたケラチン凝集塊は異常な 3 次構造をとっているものと考えられる。勿論このケラチン凝集塊にユビキチンは付加されるが、その巨大さのため、プロテアソーム系で処理されず、細胞質に凝集塊として残ったものと考えられる。これらの細胞では、蛋白質の品質管理機構であるユビキチン、プロテアソーム系に何らかの異常が生じている可能性がある。換言すれば、蛋白質の品質管理機構に正確を期するシステムを構築できれば、ケラチン病の予防、治療に繋がると考えられる。このようなシステムの構築は遺伝子治療と並び将来重要な治療法になると思われる。このシステムの構築を目指して今後も研究を継続する予定である。

参考文献

- 1) Irvine AD, McLean WH: Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation. *Br J Dermatol*. 140: 815-28, 1999.
- 2) Coulombe PA, Hutton ME, Letai A, et al: Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analysis. *Cell*, 66: 1301-1311, 1991.
- 3) Vassar R, Coulombe PA, Degenstein L, et al: Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell*, 64: 365-380, 1991.
- 4) Bonifas JM, Rothman AL, Epstein EH: Epidermolysis bullosa simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science*, 254: 1202-1205, 1991.
- 5) Magin TM, Schroder R, Leitgeb S, et al: Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel keratin filaments, secondary loss of keratin 7 and accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates. *J Cell Biol*, 140: 1441-1451, 1998.
- 6) Bence NF, Sampat RM, Kopito RP.: Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein

aggregation. Science, 292: 1552-1555, 2001.

英 文 抄 録

Recently, mutations in several keratin genes have been identified in many hereditary skin diseases. These skin disorders are now called keratin diseases. However, numerous issues in the pathophysiology of these diseases remain unclear. For example, we do not know how mutated keratin molecules are processed in the cytoplasm of these disorders. In order to acquire clues to solve this question, we conducted experiments as follows. We introduced the mutation into keratin 14 (K14) cDNA by PCR. Next, this mutated K14 (Arg-125→Cys) cDNA was subcloned into pcDNA3.1/V5-His vector which had cytomegalovirus promoter. When transient transfection with this vector was conducted, keratin aggregates were observed in the cytoplasm of transfected cells. When transfected cells were stained with anti-ubiquitin antibody, the keratin aggregates and abnormally kinked filaments demonstrated ubiquitination. These data indicated that the ubiquitin-mediated degradation of mutated keratin molecules might occur in keratin diseases and be related to pathophysiology of keratinopathies.

V. 膿疱性乾癬

1) 2001 年度汎発症膿疱性乾癬治療ガイドライン

協力研究者：小 澤 明（東海大学医学部医学科感覚学系皮膚科学部門 教授）

研究要旨 「2001 年度膿疱性乾癬治療ガイドライン」を作成した。以下の基本概念に基づき作成を行った。①皮膚科専門医を対象とした治療ガイドラインとする。②診断基準は明記する。③主な治療方法はすべて網羅する。④重症度別の治療ガイドラインを作成する。⑤日常生活指導も具体的に列記する。⑥このガイドラインの検討、修正、追加などについては、研究班班員に留まらず、広く皮膚科専門医の意見を取り入れ、随時改訂を図る。

本年は本ガイドラインが広く活用してもらうため情宣活動をするとともに、⑥について班員以外の専門医に本ガイドライン（案）について意見をもとめ、2000 年度（案）の内容を一部改訂し、「2001 年度膿疱性乾癬治療ガイドライン」作成を行った。

班長

小 川 秀 興（順天堂大学皮膚科教授）

分担研究者

田 上 八 朗（東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座皮膚科学分野、教授）

協力研究者

小 澤 明（東海大学医学部医学科感覚学系皮膚科学部門 教授）

清 水 宏（北海道大学大学院医学研究科感覚器病学講座皮膚粘膜病学分野 教授）

池 田 志 孝（順天堂大学医学部皮膚科学教室、講師）

共同研究者

照 井 正（東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座皮膚科学分野、助教授）

川 嶋 利 瑞（札幌鉄道病院皮膚科 部長）

梅 澤 慶 紀（東海大学医学部医学科感覚学系皮膚科学部門 助手）

手 塚 正（近畿大学医学部皮膚科 教授：日本乾癬学会理事長）

川 田 暁（近畿大学医学部皮膚科 助教授：日本乾癬学会事務局長）

原 田 昭太郎（NTT 東日本関東病院 副院長、皮膚科部長：日本皮膚科学会理事長）

五十嵐 敦 之（NTT 東日本関東病院 皮膚科副部長：日本乾癬学会患者登録担当）

A. 研究目的

膿疱性乾癬に対する治療について、確立したガイドラインの報告はない。また、その疾患頻度からも、その治療法について大規模調査解析報告もほとんどなく、多くは、1 症例あるいは数例の治療報告例である。今回、汎発症膿疱性乾癬治療ガイドライン作成にあたって、本年度はその基本概念を明確化し、現時点における膿疱性乾癬の治療上の問題点について検討を行う。

B. 研究方法

作成にあたり、治療目標と作成の基本概念を明確化した。重症度別汎発性膿疱性乾癬の疫学調査班の個人票と、既存の乾癬治療について検討を行い、本症の重症度別判定に基づく治療方法を検討した。

C. 研究成果

2000年度は、第1回班会議で作成にあたっての基本概念について検討され、以下の基本概念に基づき作成されることとなった。

基本概念

- ① 皮膚科専門医を対象とした治療ガイドラインとする。
- ② 診断基準は明記する。
- ③ 主な治療方法はすべて網羅する。
- ④ 重症度の治療ガイドラインを作成する。
- ⑤ 日常生活指導も具体的に列記する。
- ⑥ このガイドラインの検討、修正、追加などについては、研究班班員に留まらず、広く皮膚科専門医の意見を取り入れ、随時改訂を図る。

これらの基本概念をもとに「2000年度膿疱性乾癬治療ガイドライン（案）」が作成された。そしてこの内容について、第16回日本乾癬学会（幕張）、第65回日本皮膚科学会東部支部学術大会（札幌）、第52回日本皮膚科学会中部支部学術大会（京都）、第53回日本皮膚科学会西部支部学術大会（長崎）において「膿疱性乾癬治療ガイドライン（案）」について報告を行い、皮膚科専門医からの意見を聞き、ガイドライン（案）の内容について再検討を行い、一部改訂、追加しガイドラインを作成した。

D. 考案

2000年度作成された「膿疱性乾癬治療ガイドライン（案）」について、班会議および各学会において、幾つかの点が再検討された。その内容とは対応は、①新たに市販される活性型ビタミンD₃外用薬については、その都度記載することとした。②初期治療について、エトレチナート、シクロスポリン、メトトレキサート、PUVA療法を選択する基準については、担当医師の裁量により選択することとされた。③小児膿疱性乾癬については、2001年度ガイドライン内に新たに項目を設け記載した。④妊婦の膿疱性乾癬については、2001年度ガイドライン内に新たに項目を設け記載した。⑥広く皮膚科専門医に認知してもらう方法については、共同研究者として、手塚 正（近畿大学医学部皮膚科教授：日本乾癬学会理事長）川田 暁（近畿大学医学部皮膚科助教授：日本乾癬学会事務局長）、原田 昭太郎（NTT東日本関東病院 副院長、皮膚科部長：日本皮膚科学会理事長）五十嵐 敦之（NTT東日本関東病院 皮膚科副部長：日本乾癬学会患者登録担当）の4名を加え、今後広く情宣活動を行うこととした。これらの事項が主に検討され、「2001年度膿疱性乾癬治療ガイドライン」が完成された。