

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

同種培養真皮を使用した先天性表皮水疱症（劣性栄養障害型）の治療

分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 助教授

研究要旨 劣性栄養障害型先天性表皮水疱症(RDEB)と診断されている28歳、男性。右手背と手掌に生じた8×4cm, 5×3.5cm、いずれも真皮深層に達する難治性皮膚潰瘍に対して軟膏治療、創傷被覆材による抗潰瘍治療を約1年間にわたり継続したが改善を認めなかったため、同種培養真皮による潰瘍治療を試みた。その結果、治療開始後10日目には良好な肉芽の形成を認めた。また6週間目には潰瘍の著明な縮小が認められた。同種培養真皮は難治性となった先天性表皮水疱症患者の皮膚潰瘍に対して、有望な選択肢の一つとなることが示唆された。

共同研究者

長谷川敏男、溝口将之、須賀康、小川秀興
順天堂大学医学部皮膚科
久保健太郎、松井宏道、加川志津子、
黒柳能光
北里大学医療衛生学部人工皮膚開発センタ

された。当該医療施設において、倫理委員会の承認と患者本人あるいは保護者の同意書を得た後、プロジェクトの研究班で取り決めたプロトコールに従って行った。

A. 研究目的

RDEBは表皮・真皮境界部における基底膜と真皮の接着に関わるアンカリングフィブリルの構成成分であるVII型コラーゲンの遺伝子異常があるため、日常の軽微な機械的刺激によって容易に水疱やびらんを生じる疾患であり、しばしば真皮中層から深層に及んだ潰瘍を生じる。現在ヒアルロン酸とアテロコラーゲンから構成したスポンジ状マトリックスに他人由来の線維芽細胞を組み込んだ同種培養真皮の多施設臨床研究が展開されているので、今回われわれは既存の治療に反応しないRDEBの難治性皮膚潰瘍にその同種培養真皮を潰瘍創面に適応し、治療効果を検討した。

B. 研究方法

同種培養真皮は、ヒアルロン酸とアテロコラーゲンの2層構造のスポンジ状シートに線維芽細胞を播種して培養する方法で、北里大学人工皮膚研究開発センターで製造

C. 研究結果

RDEBの診断にて10歳時より当科外来に定期通院している28歳男性。平成13年6月頃から右手背、手掌に潰瘍が生じた。保存的に治療を受けたが1年間軽快しなかった。右手背に8×4cm程の真皮深層におよぶ潰瘍があり、同掌側にも5×3.5cm程の、同じく真皮深層におよぶ潰瘍が存在した(図A)。創面は特にデブリードマンを行わずに生理食塩水にて洗浄後、全体を覆うように同種培養真皮をのせた(図B)。その上より抗生剤加軟膏ガーゼと乾ガーゼをのせて覆い包帯固定した。その後は週2回、この操作を繰り返しておこなった。3回適応した治療開始10日目にはすでに創面に顆粒状の肉芽形成を認め、盆状に陥凹していた潰瘍面はほぼ平坦になった。4週目には肉芽形成はさらに良好となり、一部肉芽組織上に表皮形成を認めるようになった。11回適応した6週後には周囲からの表皮化も伴っており右手背の潰瘍は6×2.5cmに、右手掌の潰瘍は2.5×1cmになった(図C)。その後は軟膏による治療に変更したが、そ

の10日後にはいずれの潰瘍もさらに縮小し、右手掌の潰瘍面についてはほぼ表皮化が完了した(図D)。

D. 考察

RDEBの潰瘍治療については、自家培養表皮シートによる移植治療をおこない良好な結果が得られたことが報告されている。永久生着を目的とする自家培養表皮の製造には、患者自身の表皮から採取した角化細胞を使用して3週間程度の培養期間を要する。また深い皮膚欠損創には、生着率が低いため、繰り返しの適用が必要となる場合がある。そのため自家培養表皮を繰り返し、使用時調製供給することは、大変な労力を要すると考えられる。

これに対して凍結保存同種培養真皮は、適宜解凍して使用できるため、繰り返して使用が必要な難治性潰瘍の治療には実用的であろう。また同種培養真皮は、肉芽組織形成ならびに表皮化促進効果があるため、特に深い皮膚欠損創の治療に有効である。

E. 結論

同種培養真皮は、将来的に先天性表皮水疱症の患者の潰瘍治療において有用な選択肢の一つとなるものと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成14年度)

1. 論文発表

英語論文

Ikeda S, Imamura S, Hashimoto I, Morioka S, Sakuma M, Ogawa H: History of the establishment and revision of diagnostic criteria, severity index and therapeutic guidelines for pemphigus in Japan. Arch Dermatol Res Suppl, in press, 2003

日本語論文

池田志孝: 表皮内先天性水疱症の最新情報、MB Derma、62: 45-50, 2002

2. 学会発表

篠塚暁子、池田志孝、橋本幸子、三浦裕子、小川秀興: 疱疹状天疱瘡の1例、日本皮膚科学会第777回東京地方会、11月16日、東京、2002

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

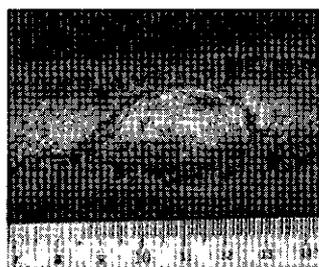
2. 実用新案登録

なし

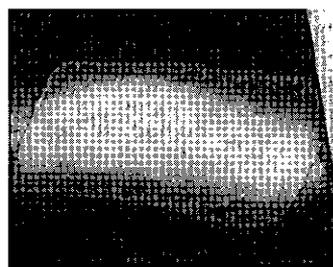
3. その他

特になし

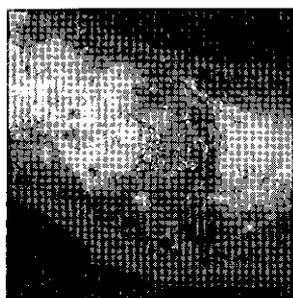
図とその説明



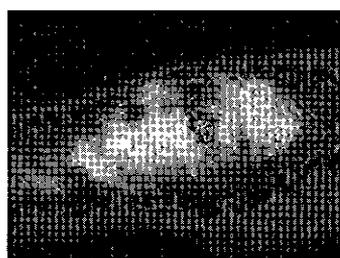
図A



図B



図C



図D

図A：治療開始前の右手掌部潰瘍。

図B：同種培養真皮使用直後の状態。

図C：治療開始後6週目。創面には十分な肉芽組織が存在。周囲からの表皮形成が進行し、創面は著明に縮小した。

図D：軟膏療法に変更後10日目。さらに表皮形成は進み、手掌部の潰瘍はほぼ表皮化が完了した。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症及び参考疾患の全国疫学調査進捗状況

研究協力者 黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学 助手

研究要旨 全国の多施設を対象に患者数の推定と2次調査によって得られた臨床所見の結果から臨床疫学像を明らかにする事を目的とする。参考疾患として、非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（NBCIE）、葉状魚鱗癬（LI）、Siemens型水疱性魚鱗癬、家族性天疱瘡の患者数についても調査することとした。本調査は特定疾患の疫学に関する研究班と共同で「全国疫学調査マニュアル」に基づいて実施する。対象は2002年1年間の受療患者とし、2003年1月に患者数推計のための一次調査を実施した。調査対象科は皮膚科とし、全国の病院から病床規模別に層化無作為抽出した計807科を対象とした。二次調査の実施計画は本班と疫学班の主任研究者所属施設の倫理審査を受け、承認後に実施する。一次調査で得られた報告患者数をもとに未回答施設を考慮した推計患者数を算出する。二次調査結果により臨床疫学像を把握する。

共同研究者
池田 志孝
順天堂大学医学部皮膚科助教授
稲葉 裕
順天堂大学医学部衛生学教授
松葉 剛
順天堂大学医学部衛生学助手

A. 研究目的

全国の多施設を対象に水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の患者数の推計と二次調査によって得られた臨床所見の結果から臨床疫学像を明らかにすることを目的とする。参考疾患として非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（NBCIE）、葉状魚鱗癬（LI）、Siemens型水疱性魚鱗癬、家族性天疱瘡の患者数についても調査する。

B. 研究方法

本調査は特定疾患の疫学に関する研究班（主任研究者：稲葉 裕）と共同で「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル」¹⁾に基づいて実施された。

今回の調査にあたってはまず水疱型先天

性魚鱗癬様紅皮症の診断基準が作成された。対象は2002年1年間の受療患者とし、2003年1月に患者数推計のための一次調査を実施した。一次調査では調査依頼状、診断基準、返信用ハガキを送付した（資料1-3）。

調査対象科は皮膚科とし、前出のマニュアルに添って全国の病院から病床規模別に層化無作為抽出した計807科を対象とした。

二次調査の実施計画は本班と疫学班の主任研究者所属施設(岐阜大学及び順天堂大学)の倫理委員会で審査を受け、承認後に実施する。

一次調査で水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者なしの回答があった施設には礼状を送付し、患者ありと回答のあった施設を二次調査対象とする。2月末日までに未回収の施設には督促状を送付する。

一次調査で得られた報告患者数をもとに未回答施設を考慮した推計患者数をマニュアルに添って算出する。二次調査結果により臨床疫学像を把握する。

C. 研究結果（進捗状況）

病床規模別の対象率、抽出率、抽出数を

表1に示す。来年度は一次調査の回収率、報告患者数に基づき患者数を推計する。また、二次調査を実施し、疾患の臨床疫学像を明らかにする。

D. 結論

特定疾患の疫学に関する研究班と共同で水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の全国疫学調査を企画し、今年度は一次調査を実施した。来年度は一次調査によって得られた情報から当該疾患の患者数を推計し、二次調査による臨床所見の結果から臨床疫学像を明らかにする予定である。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

F. 研究発表（平成14年度）

1. 論文発表
英語論文
なし

日本語論文

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

- 1). 大野良之他編. 難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル. 厚生省特定疾患難病の疫学調査研究班、名古屋, 1994.

表1 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症全国疫学調査一次調査の対象数

規 模	対象数	抽出率	抽出数
20~ 99床	899	6.2%	56
100-199床	598	10.0%	60
200-299床	360	20.0%	72
300-399床	332	40.1%	133
400-499床	177	80.2%	142
500床以上	229	100.0%	229
大学病院	115	100.0%	115
計	2710		807

注1) 対象数は「閉院」「該当科なし」等の理由により最終的に変更有り

注2) 一層の対象数を50以上にするため抽出率を変更している。

皮膚科 責任者様

2003年1月

厚生労働省厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班 主任研究者 北島 康雄
(岐阜大学医学部皮膚科学)
疫学調査担当 池田 志孝
(順天堂大学医学部皮膚科学)
特定疾患の疫学に関する研究班 主任研究者 稲葉 裕
(順天堂大学医学部衛生学)
稀少難治性皮膚疾患担当 黒沢美智子
(順天堂大学医学部衛生学)

拝啓

初春の候、益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

このたび、厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)「特定疾患の疫学に関する研究班」と「稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班」の共同研究により、わが国における水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の実態、及び参考疾患として非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症、葉状魚鱗癬、家族性天疱瘡の患者数を把握するために全国疫学調査を実施することになりました。

つきましては、ご多忙中のところ大変恐縮でございますが、過去1年間(2002年1月1日~2002年12月31日)の貴診療科における該当疾患患者数を同封の葉書にご記入の上、2003年2月末日までにご返送くださいますようお願い申し上げます。なお、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の患者数については同封の診断基準をご参照ください。

また、該当する患者がない場合も、全国の患者数推計には必要ですので、葉書の「1.なし」に○をつけ、ご返送くださいますようお願い申し上げます。

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症に該当する患者ありの場合には、後日個人票をお送りさせていただきますので、あわせてご協力くださいますようお願い申し上げます。

この件に関しましてご不明の点がございましたら、下記までお問い合わせください。

何卒ご協力のほど、よろしくようお願い申し上げます。

敬具

全国疫学調査事務局:〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65
名古屋大学大学院医学系研究科 予防医学/医学推計・判断学教室気付
特定疾患の疫学に関する研究班 全国疫学調査事務局
電 話: 052-744-2132
ファクシミリ: 052-744-2971

臨床事項に関する問い合わせ: 〒113-8421 文京区本郷 2-1-1
順天堂大学医学部皮膚科学講座
稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班 疫学調査担当 池田 志孝
電 話: 03-5802-1089
ファクシミリ: 03-3813-9443

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (Bullous Congenital Ichthyosiform Erythroderma, BCIE)**診断の手引き (平成 14 年 12 月)**

(厚生労働省特定疾患研究、皮膚・結合組織研究班、稀少難治性皮膚疾患分科会版)

1) 概念

常染色体優性遺伝性疾患。出生時から全身の皮膚にびまん性の潮紅と鱗屑を認め、水疱形成も伴う。組織学的には顕著な角質増殖と顆粒変性が特徴的である。ケラチン 1 ないし 10 の遺伝子変異による。

2) 診断の手引き

- a) 生下時より生じる全身性びまん性潮紅。
- b) 機械的刺激を受ける部位に弛緩性水疱と浅いびらんを生じる。
- c) 小児期以後、成長とともに水疱形成は減少する。
- d) 成長とともに全身の潮紅も減弱するが、一方全身の角質増殖、鱗屑が顕著になる。
- e) 関節屈側では角質肥厚が顕著で、灰褐色調、粗造、疣状、豪猪皮状になる。
- f) 掌蹠の角化は強い例から正常例まで、様々である。
- g) 組織学的には、光顕では著明な過角化と表皮肥厚、顆粒変性（有棘層上層から顆粒層にかけて表皮細胞の核周囲の空胞と粗大なケラトヒアリン顆粒がみられ、細胞内浮腫が顕著）がみられる。
- h) 電顕的には、有棘細胞、顆粒細胞の細胞質内にケラチン線維の大小の凝集塊が見られる。

3) 亜型

Siemens 型水疱性魚鱗癬は上記の症状が軽度な亜型であり、ケラチン 2e 遺伝子の変異により生じる。

4) 鑑別診断—以下の疾患を除外出来ること。

葉状魚鱗癬、非水疱型魚鱗癬様紅皮症、先天性表皮水疱症、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群

郵便はがき



4 6 6 8 5 5 0

稀少難治性皮膚疾患 有病者数全国一次調査用紙

記載医師御氏名 _____

調査

名古屋市昭和区鶴舞町 65

名古屋大学大学院医学系研究科

予防医学／医学推計・判断学教室 気付

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

特定疾患の疫学に関する研究班

全国疫学調査事務局 行

記載年月日 2003年 ____月 ____日

水疱型先天性 魚鱗癬様紅皮症 (亜型を含む)	1.なし	2.あり 男 ____例、女 ____例
非水疱型先天性 魚鱗癬様紅皮症	1.なし	2.あり 男 ____例、女 ____例
葉状魚鱗癬	1.なし	2.あり 男 ____例、女 ____例
家族性天疱瘡	1.なし	2.あり 男 ____例、女 ____例

記入上の注意事項

- 2002年1年間（2002年1月1日～2002年12月31日）に貴診療科を受診した上記疾患の患者数（水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症〔含亜型〕、非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症、葉状魚鱗癬、家族性天疱瘡）についてご記入ください。
全国有病患者数の推計を行いますので、該当する患者のない場合でも「1.なし」に○をつけ、ご返送ください。
- 後日、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症例（1疾患のみ）について第二次調査を行いますのでご協力ください。
- ご住所、貴施設名、貴診療科名に誤りがありましたら、お手数ですがご訂正をお願いします。

2003年2月末日までにご返送いただければ幸いです



厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）における genotype/phenotype 相関の
解析：自験例および既報告例における検討

分担研究者 池田志孝 順天堂大学医学部皮膚科 助教授

研究要旨 BCIE の genotype/phenotype 相関解析目的で、自験例および既報告例における検討を行った。その結果、1) ケラチン1の変異が見られる例では掌蹠角化や手指拘扼を生じる例があること、2) ケラチン10の変異例ではそれらが見られないこと、3) 両ケラチンの2Bドメインに変異が見られる例の一部は環状皮疹を生じること（よって cyclic ichthyosis や annular epidermolytic ichthyosis の病名で報告されている）、4) 家系内においても臨床症状に差異があること、などが示された。今後更に多症例における解析が必要と思われた。

共同研究者
黒沢美智子、稲葉 裕
順天堂大学医学部衛生学
小川秀興
順天堂大学医学部皮膚科

の関係につき検討を行った。なお今回は、Siemens 型水疱性魚鱗癬については検討しなかった。

A. 研究目的

BCIE は、常染色体性優性遺伝を示す稀な疾患であり、その原因として、表皮有棘層から顆粒層に発現されている、ケラチン1またはケラチン10の変異が知られている。また亜型として、軽症の Siemens 水疱性魚鱗癬があるが、これは主として表皮顆粒層に発現されるケラチン2eの変異によって生じる。世界的にみても本症の詳細な疫学調査の報告はなく、また本症の遺伝子変異のパターンと臨床症状（genotype-phenotype）の相関については、症例数が少ないため、詳細は未だ不明である。今回は、疫学調査に先立ち、自験例および既報告例における genotype-phenotype 相関の解析を試みた。

B. 研究方法

自験例3家系および37の文献中に報告されている、遺伝子変異が明らかになっている症例の遺伝子変異パターンと臨床症状

C. 研究結果

ケラチン1の変異が検出された例では、いくつかの例で掌蹠角化あるいは手指の拘扼が見られる。変異はほぼ H1・1A と 2B の、ロッドドメインの両端に見られており、それらは重症例と考えられる。340番目のアミノ酸（L12リンカードメイン）に変異がある症例は、紅皮症のない、非典型例と報告されている。また479番目のイソロイシンの変異がある例は、cyclic ichthyosis または annular epidermolytic ichthyosis の名前で報告されている。

ケラチン10の変異では、やはり150~161番目のアミノ酸（1A）と439~452番目のアミノ酸（2B）の、ロッドドメインの両端に変異が見られて、“mild”と表現されている154と439番目のアミノ酸変異が見られる症例を除き、その他の例はいずれも重症と思われた。ケラチン10の変異がある例では、掌蹠角化は見られないようである。446番目のアミノ酸に変異がある例は、annular epidermolytic ichthyosis の病名で報告されている。最も高頻度に見られ

る変異は、156番目のアルギニンからヒツチジンまたはロイシンへの置換であった。また家族内臨床像のバリエーションを示す、少なくとも2家系の報告があった。

D. 考察

今回の解析結果では、ケラチン1の変異が検出されている例ではいくつかの症例で掌蹠角化が見られているが、その角化の程度と遺伝子型に相関があるか否かは不明である。また手指の拘扼は、155と179番目のアミノ酸に変異がある例で見られているが、これもこれら変異に特異的か否かは現在の所結論出来ない。同様に340番目のアミノ酸(L12リンカードメイン)に変異がある症例は、紅皮症のない、非典型例と報告されているが、これも1例報告であるので結論できない。むしろcyclic ichthyosisまたはannular epidermolytic ichthyosisの名前で報告されている、479番目のイソロイシンの変異がある例は複数あるので、この変異は、環状皮疹を呈する表現型と関連性があると思われる。

一方ケラチン10の変異が見られる例では、掌蹠角化が見られないことは、ほぼコンセンサスを得られていると思われる。またケラチン1と同様に、ケラチン10の446番目のアミノ酸(2Bドメイン)に変異がある例は、annular epidermolytic ichthyosisの病名で報告されており、興味深い。なおケラチン10に変異が見られる症例はほぼ全てが重症とされているが、154と439番目のアミノ酸変異が見られる症例のみ“mild”と報告されている。しかし両変異を持つ症例はいずれも1例報告であるため、この変異を持つ症例に特異的か否かは現在の所結論出来ない。また同一遺伝子変異をもつ家族例においても臨床症状に家族内差異が認められていることも考慮すると、一部症例を除き、現時点において本症のgenotype/phenotype相関につき結論付けることは困難と思われた。

E. 結論

本症は稀少疾患であり、また系統だった疫学調査やgenotype/phenotypeの検討はなされていない。一部症例においてある程度の相関があると推測されるが、今後本症の病理・病態解明のため、全国疫学調査と多症例における解析が必要不可欠と考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表(平成14年度)

1. 論文発表

英語論文

Matsuba S, Suga Y, Mayuzumi N, Ikeda S, Ogawa H: A Japanese case of de novo dominant dystrophic epidermolysis bullosa. Clin Exp Dermatol, 27: 56-58, 2002

日本語論文

池田志孝: Darier病、最新皮膚科学体系、第7巻「角化異常症」、160-167、中山書店、2002

2. 学会発表

菊地夕子、久保田恭子、光石幸市、池田志孝、小川秀興: 大量 γ グロブリン療法が奏効した尋常性天疱瘡の1例、日本皮膚科学会第775回東京地方会、9月21日、東京、2002

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

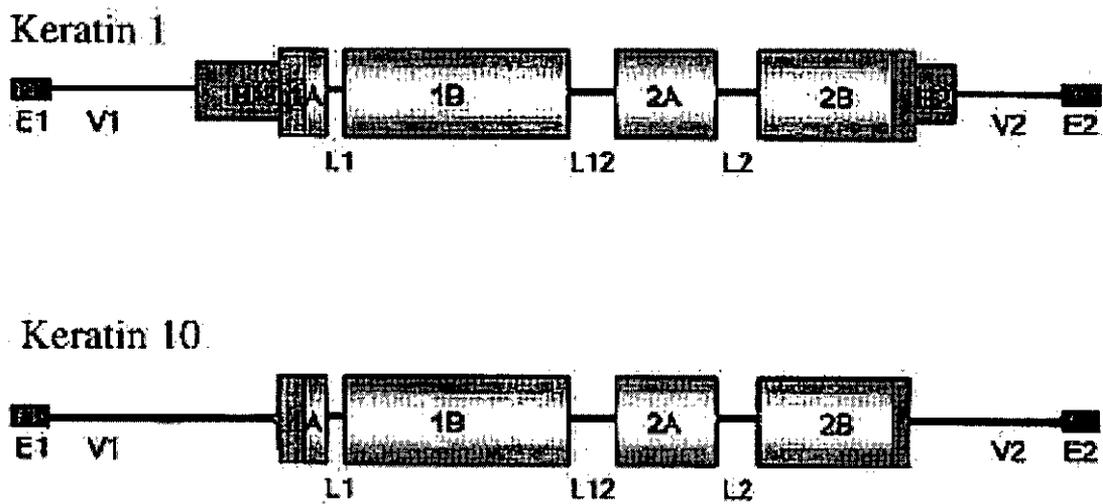


図1 ケラチン分子の構造

ケラチン1はE1・E2のエンドドメイン、V1・V2のバリエブルドメイン、H1・1A・1B・2A・2B・H2のロッドドメインがあり、それをL1・L12・L2のリンカードメインが結合している。ケラチン10はほぼ同様にE1・E2のエンドドメイン、V1・V2のバリエブルドメイン、1A・1B・2A・2B・のロッドドメイン、そしてL1・L12・L2のリンカードメインから構成されている。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症に特徴的な過角化の形成機構の解析
第1報

分担研究者 山本明美 旭川医科大学医学部皮膚科学 講師

研究要旨 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）の病態形成機構をあきらかにするためにまず角層肥厚の機序について検討した。正常人およびBCIE患者の電子顕微鏡標本を観察し角質細胞間を接着しているcorneodesmosomeの形態の差異について検討した。BCIE患者2名の観察では患者角層においてcorneodesmosomeの細胞外領域の形態的異常が観察された。

共同研究者

高木清孝

旭川医科大学医学部学生

中根宏

旭川医科大学皮膚科研究生

飯塚一

旭川医科大学医学部皮膚科教授

秋山真志

北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学
講師

清水宏

北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学
教授

A. 研究目的

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症（BCIE）の病態形成機構、特に角層肥厚の機序を明らかにする。

B. 研究方法

材料：以下のBCIE患者の生検皮膚および正常人皮膚を用いた。症例1：28歳、男性。遺伝子変異はK10（M150T）。腹部より生検。症例2：4ヶ月、男児。遺伝子変異は不明。腹部より生検。

電子顕微鏡的観察：通常の方法により正常人およびBCIE患者の透過電子顕微鏡標本を作成し、観察した。

C. 研究結果

正常人およびBCIE患者の電子顕微鏡標本を観察し角質細胞間を接着しているcorneodesmosomeの形態の差異について検討した。顆粒層以下のレベルではdesmosomeに形態的な異常は認められなかった（図1a, b）。層板顆粒の形態にも明らかな異常はなく、細胞外への分泌像も認められた（図1c）。BCIE患者2名の観察では患者角層においてcorneodesmosomeの形態的異常が観察された（図2）。すなわち正常ではcorneodesmosomeの細胞外部分は均一な高い電子密度を示すが、患者では電子密度に差のある層状の構造が観察された。

D. 考察

正常表皮では角層の正常な剥離の前段階として、desmosomeが顆粒層から角層に移行する前に、corneodesmosomeと呼ばれる構造に変換される。BCIE患者2例の表皮のdesmosomeは顆粒層以下では形態的に正常であったが、角質層に至る際に正常でみられるべき細胞外電子密度の均一な上昇が不完全であり、一部に層状構造が観察された。このことから、BCIEにおいてはケラチン線維の異常によって角化細胞の分化が障害され、corneodesmosomeの成熟が異常となることが示唆された。これが

ひいては角質細胞同志の正常な秩序だった剥離機構に破綻をきたし、角質層が厚く堆積し、角質肥厚をまねくことが考えられる。

E. 結論

BCIEにおける角質肥厚に corneodesmosome の形成、成熟の異常が関与しているかもしれない。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表（平成14年度）

1. 論文発表

英語論文

1. Nakane H, Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Iizuka H: Elafin, a secretory protein, is cross-linked into the cornified cell envelopes from the inside of psoriatic keratinocytes. **J Invest Dermatol**

119: 50-55, 2002

2. Ishida-Yamamoto A, Richard G, Takahashi H, Iizuka H: In vivo studies of mutant keratin 1 in ichthyosis hystrix Curth-Macklin. **J Invest Dermatol** 120: 498-500, 2003

2. 学会発表

角化症の診断、角化機構の解明における電顕の有用性。第34回日本臨床電子顕微鏡学会（ワークショップ）2002年9月27日 札幌市

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

図とその説明

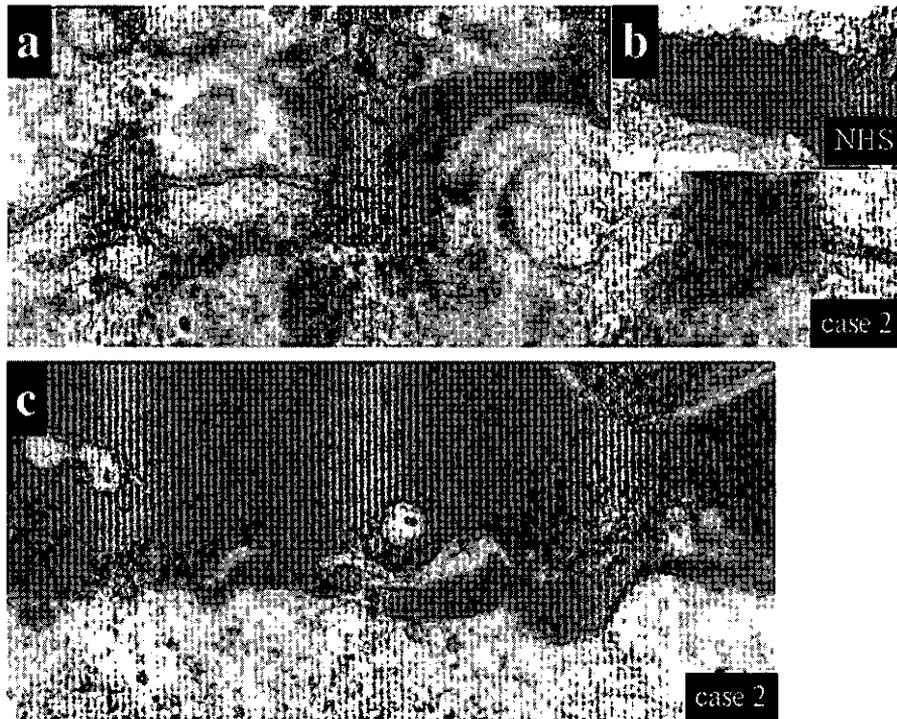


図1 BCIE 患者表皮(a, c)においては正常(b)と同様の desmosome が基底層から顆粒層まで認められ、層板顆粒の細胞外放出も見られる。

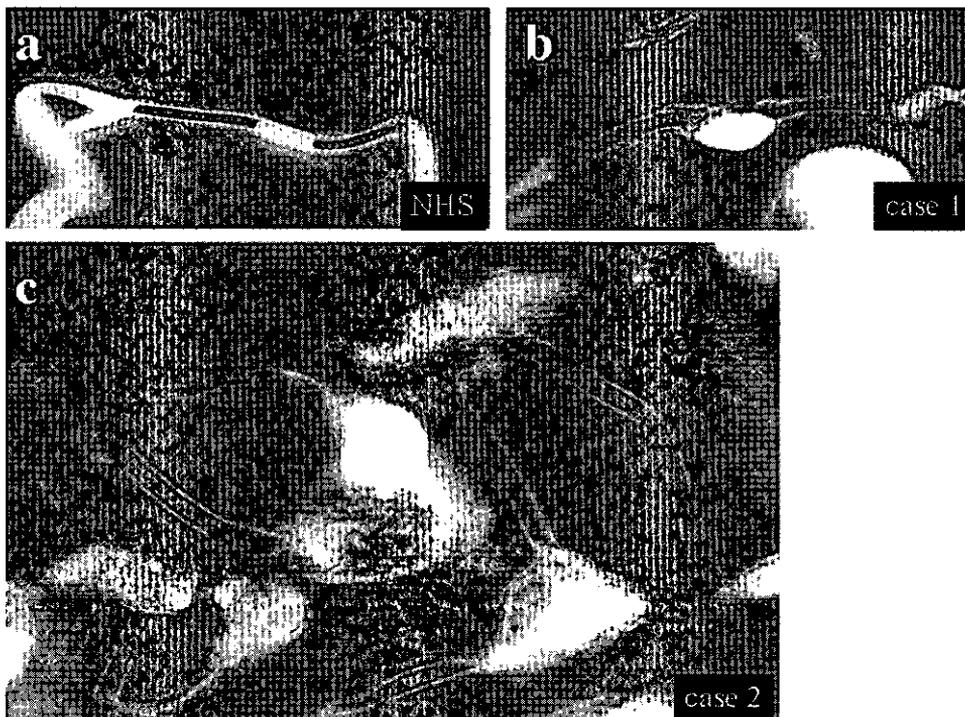


図2 正常表皮角層(a)と BCIE 患者皮膚角層(b, c)の desmosome。正常では細胞外領域の電子密度が均一に高いが、患者では電子密度の不均一性、層板構造の残存が見える。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症に特徴的な過角化の形成機構の解析
第2報

分担研究者 山本明美 旭川医科大学医学部皮膚科学 講師

研究要旨 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症(BCIE)の病態形成機構をあきらかにするために角層肥厚の機序について検討した。第1報においてBCIE患者角層においてcorneodesmosomeの形態的異常が観察された。今回はcorneodesmosomeの細胞外部分に結合する蛋白、corneodesmosinの特異抗体を作成するためにこの分子の中央部分に相当する14個のアミノ酸からなるペプチドを合成し、2羽の家兔に免疫し抗血清を得た。このうち免疫蛍光染色にて良好な結果が得られたものをアフィニティ精製した。本抗体はLowicryl K11M樹脂包埋切片を用いたpost-embedding immunoelectron microscopy法にも使用可能であることが確認された。

共同研究者

高木清孝

旭川医科大学医学部学生

中根宏

旭川医科大学皮膚科研究生

飯塚一

旭川医科大学医学部皮膚科教授

秋山真志

北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学
講師

清水宏

北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学
教授

(CAAGPPISEGKYFSS)を合成し、KLHに架橋したものを抗原として2羽の家兔を6回免疫した。得られた抗血清のうち蛍光抗体法で良好な染色がえられたものを、上記ペプチドをもちいてアフィニティ精製し、Cdsn1抗体とした。

蛍光抗体法：正常ヒト皮膚生検組織を2%パラフォルムアルデヒド/PBS (pH 7.4)にて4℃、1時間固定後、100mMグリシン/PBSにて同1時間処理、PBSにて洗浄後OCT compoundにて包埋した。6 micro mの凍結切片をPBSにて1000倍希釈したCdsn1抗体と4℃、over night反応後、PBSで洗浄した。その後Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG highly cross-absorbed (Molecular Probes, Eugene, OR) (PBSにて200倍希釈)と37℃、30分反応、同時にToPro3 (Molecular Probes)による核染色を施し、PBS洗浄後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (FLUOVIEW FV500, Olympus, Tokyo, Japan)にて観察した。

免疫電顕：無固定の正常皮膚を凍結固定、凍結置換しLowicryl K11M樹脂に包埋し、超薄切片を作成、Cdsn1抗体(500倍

A. 研究目的

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症(BCIE)の病態形成機構、特に角層肥厚の機序を明らかにする。

B. 研究方法

抗体作成：corneodesmosomeの細胞外部分に結合する蛋白、corneodesmosinの特異抗体を作成するためにこの分子の中央部分に相当する14個のアミノ酸とそのC末端にCを付加したペプチド

希釈)と反応後、10 nm gold-conjugated goat anti-mouse IgG (Amersham, Buckinghamshire, UK)にて標識し、酢酸ウランにて染色し観察した。

C. 研究結果

2羽の兎に免疫し抗血清を得た。このうち免疫蛍光染色にて良好な結果が得られたものをアフィニティ精製した。共焦点レーザー顕微鏡による観察では本抗体は正常表皮の顆粒層の細胞質内を微細顆粒状に染色した(図1)。また本抗体はLowicryl K11 M樹脂包埋切片を用いたpost-embedding immunoelectron microscopy法にも使用可能であることが確認された(図2)。

D. 考察

本研究の第1報においてBCIE患者の表皮角質層の肥厚にcorneodesmosomeの成熟異常が関係していることが示唆された。Corneodesmosinは層板顆粒に由来する糖蛋白で、細胞外に分泌された後、corneodesmosomeの細胞外領域に結合し、その後の角層細胞間接着の変化に重要な働きをしていると考えられている。今回我々は蛍光抗体法、免疫電顕法に使用可能なcorneodesmosin抗体を得ることができた。この抗体による染色態度はすでに報告されている他の研究者による結果とほぼ同一であった。これにより今後、BCIE患者におけるcorneodesmosinの発現、分布の異常を検討するための基礎データが整備された。

E. 結論

BCIEにおける角質肥厚にcorneodesmosomeの形成異常が関与しているかもしれ

ない。我々が作成したcorneodesmosin抗体はこの点をさらに明らかにするための有力な情報を与えると期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表(平成14年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Nakane H, Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Iizuka H: Elafin, a secretory protein, is cross-linked into the cornified cell envelopes from the inside of psoriatic keratinocytes. **J Invest Dermatol** 119: 50-55, 2002
2. Ishida-Yamamoto A, Richard G, Takahashi H, Iizuka H: In vivo studies of mutant keratin 1 in ichthyosis hystrix Curth-Macklin. **J Invest Dermatol** 120: 498-500, 2003

2. 学会発表

角化症の診断、角化機構の解明における電顕の有用性。第34回日本臨床電子顕微鏡学会(ワークショップ)2002年9月27日 札幌市

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

図とその説明

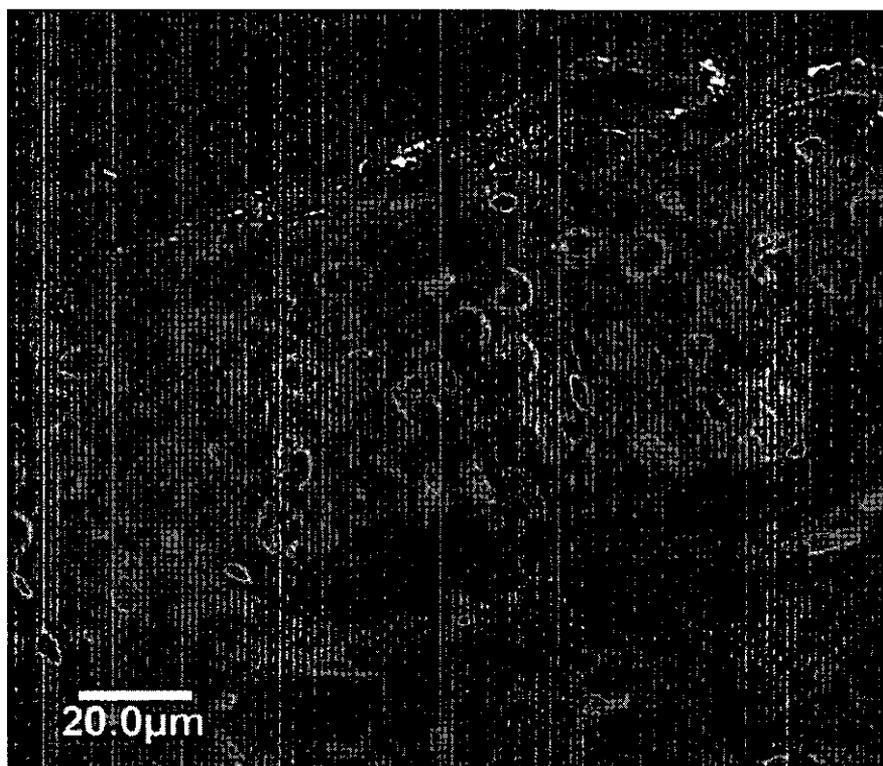


図1 Cdsn1 抗体をもちいた正常皮膚の免疫染色像。蛍光抗体法では顆粒層の細胞の細胞質が微細顆粒状に陽性である。ToPro3 で核染色を施してある。

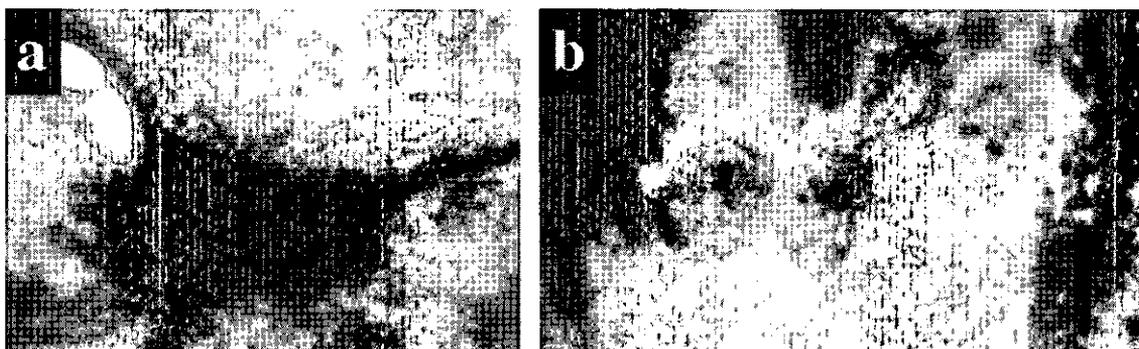


図2 Cdsn1 抗体は免疫電顕では顆粒層と角層の細胞間の corneodesmosome の細胞外領域(a)および、層板顆粒(b)に陽性である。

[IV]

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 雑誌

著者名	論文課目	雑誌名	巻：頁，西暦年号
Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, <u>Kitajima Y</u> , Grando SA	Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion	Life Sciences	72: 2081-2085, 2003
Gu LH, Ichiki Y, Sato M, <u>Kitajima Y</u>	A novel nonsense mutation at E106 of the 2B rod domain of keratin 14 causes dominant epidermolysis bullosa simplex	J Dermatol	29: 136-145, 2002
Gu LH, Ichiki Y, <u>Kitajima Y</u>	A aberrant expression of p16 and RB protein in eccrine porocarcinoma	J Cutan Pathol	29: 473-479, 2002
<u>Kitajima Y</u>	Mechanisms of desmosome assembly and disassembly	Clin Exp Dermatol	27: 684-690, 2002
<u>Kitajima Y</u>	Current and prospective understanding of clinical classification, pathomechanisms and therapy in pemphigus	Arch Dermatol Res	in press, 2003
<u>北島康雄</u>	水疱症自己抗体とシグナル伝達	現代医療	34: 1111-1117, 2002
<u>北島康雄</u>	先天性表皮水疱症	小児科診療	in press, 2003
<u>北島康雄</u>	角化過程におけるケラチノサイトの上方移行・Positioning Differentiationと細胞間接着制御とその異常	第17回角化症研究会記録集	in press, 2003
Chan LS, Ahmed R, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, Fine J-D, Foster CS, Ghohestani R, <u>Hashimoto T</u> , Hoang-Xuan T, Kirtshchig G, Korman NJ, Lightman S, Lozada-nur F, Marikovitch MP, Mondino BJ, Porst C, Rogers RS III, Setterfield JF, West D, Wojnarowska F, Woodley DT, Yancey KB, Zone JJ	Mucous membrane pemphigoid: Definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment and prognostic factors	Arch Dermatol	138:370-379,2002
Hamada T, McLean WHI, Ramsay M, Ashton GHS, Nanda A, Jenkins T, Edelstein I, South AP, Bleck O, Wessagowit V, Mallipeddi R, Orchard GE, Wan H, Dopping-Hepenstal PJC, Mellerio JE, Whittock NV, Munro CS, van Steensel MAM, Steijlen PM, Ni J, Zhang L, <u>Hashimoto T</u> , Eady RAJ, McGrath JA	Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix protein 1 gene (ECM1)	Hum Mol Genet	11:833-840,2002