

図2. 原因薬剤 a. 小児

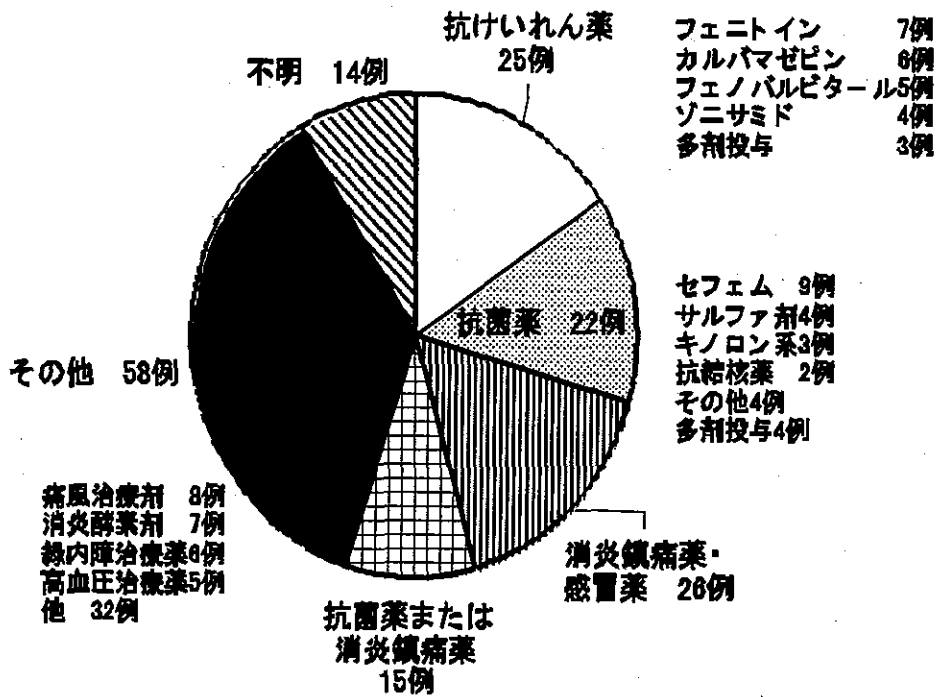


図2. 原因薬剤 b. 成人

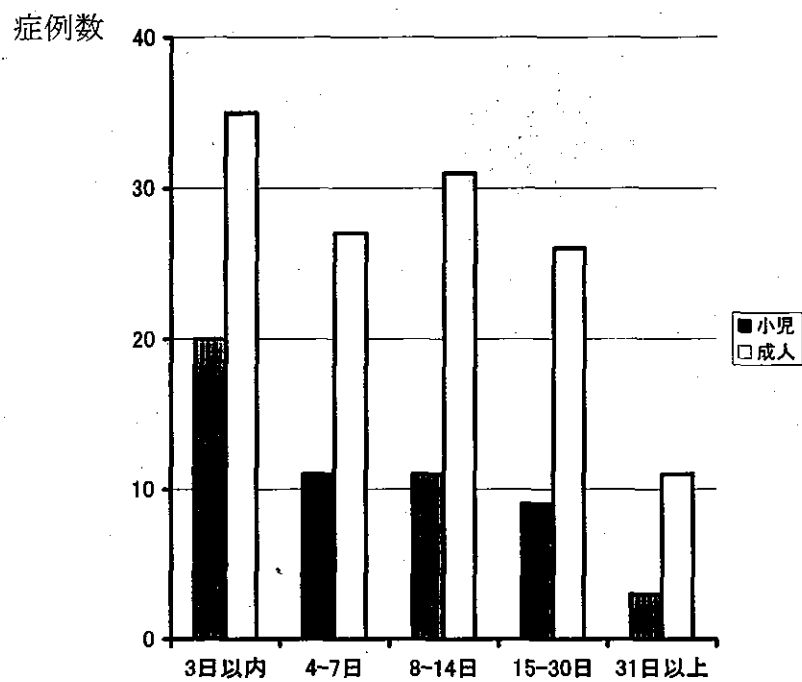


図 3. 薬剤投与開始から発症までの期間

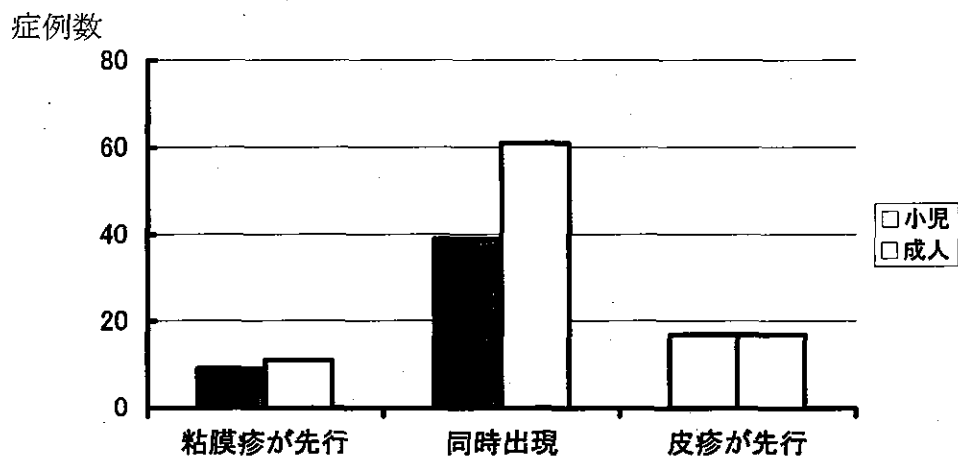


図 4. 粘膜疹と皮疹の出現までの期間

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

角膜上皮細胞の無血清培養法の開発

分担研究者 大橋裕一 愛媛大学医学部眼科学 教授

研究要旨 重症多形滲出性紅斑の後遺症である角膜欠損に対しては羊膜移植、培養角膜上皮シート移植が行われている。従来の方法はマウス 3T3 細胞を支持細胞として用いるため、安全性が懸念されている。即ち、将来は無血清培養による角膜上皮シートの作製が望ましい。そこで、角膜上皮細胞の無血清培養法について検討した。皮膚角化細胞と同様の手技を用いることにより角膜上皮細胞の無血清培養法を確立した。

A. 研究目的

重症多形滲出性紅斑（急性期）は口唇・口腔、眼、鼻、外陰などの皮膚粘膜移行部のびらんを主症状として、さらに多形紅斑が全身に多発し、しばしば水疱化を示す疾患である。しばしば重症化し、粘膜、表皮の壊死性変化、剥離をきたす。後遺症としては角膜欠損が大きな問題であり、培養角膜上皮シート移植、羊膜移植の有効性が示されてきている。培養角膜シートはマウス 3T3 細胞を支持細胞として用いるため、安全性が懸念されている。即ち、将来は無血清培養による角膜上皮シートの作製が望ましい。そこで、角膜上皮細胞の無血清培養法について検討した。

B. 研究方法

角膜の輪部を実体顕微鏡下に細切し、リン酸緩衝液で十分に洗浄後、ディスパーゼ液に浸し 24 時間反応させた。翌日ピンセットを用いて上皮と実質を機械的に剥離し、上皮をさらにトリプシン処理した。10 分間処理後、激しく振盪処理し、遠心操作にて細胞を沈殿させた。上清を吸引し、角化細胞用の無血清培養液で懸濁し、1 型コラーゲンシャーレに播種し、37℃、5% CO₂ の培養条件で培養を行った。

C. 研究結果

培養開始後 4-5 日でコロニーが出現し、さらに培養を続けることによりシャーレー杯にまで上皮細胞は増殖した。サブコンフルエントの時点で継代操作を行った。1:4 程度に希釈しても、細胞は順調に増殖した。5 代継代を繰り返すと分化した細胞の比率

が増加し、さらに継代を繰り返すと 6-7 代でほとんど増殖しなくなった。

D. 考察

角化細胞用の無血清培養液を用いることにより角膜上皮細胞の無血清培養が可能であった。継代は 4 代目までは順調であり、増殖率は計算上 100 倍以上であった。この培養法により増殖させた上皮細胞を用いて、培養角膜上皮シートの作製が可能であると思われた。

E. 結論

角膜上皮細胞の無血清培養法を確立した。より安全な角膜上皮シート作製の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 16 年度)

1. 論文発表

Goto T, Zheng X, Klyce SD, Kataoka H, Uno T, Yamaguchi M, Karon M, Hirano S, Okamoto S, Ohashi Y: Evaluation of the tear film stability after laser in situ keratomileusis using the tear film stability analysis system. *Am J Ophthalmol*, 137: 116-120, 2004.

Zhang W, Shiraishi A, Suzuki A, Zheng X, Kodama T, Ohashi Y: Expression and distribution of tissue transglutaminase in normal and injured rat cornea. *Curr Eye Res*, 28: 37-45,

2004.

Hayashi Y, Kao W, Kohno N, Nishihara-Hayashi M, Shiraishi A, Uno T, Yamaguchi M, Okamoto S, Maeda M, Ikeda T, Hamada H, Kondo K, Ohashi Y: Expression patterns of sialylated epitope recognized by KL-6 monoclonal antibody in ocular surface epithelium of normal and dry eye patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 2212-2217, 2004.

Okamoto M, Takagi M, Kutsuna M, Hara Y, Nishihara M, Matsuda T, Sakanaka M, Okamoto S, Nose M, Ohashi Y: High expression of interleukin-1 β in the corneal epithelium of MRL/lpr mice is under the control of their genetic background. *IL-1 β in the cornea of MRL/lpr mice. Clin Exp Immunol*, 136: 239-244, 2004.

Zheng X, Uno T, Goto T, Zhang W, Hill JM, Ohashi Y: Pathogenic *Acanthamoeba* induces apoptosis of human corneal epithelial cells. *Japan J Ophthalmol*, 48: 23-29, 2004.

Goto T, Zheng X, Okamoto S, Ohashi Y: Tear film stability analysis system. *Cornea*, 23: S65-70, 2004.

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

厚生労働省研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Stevens-Johnson 症候群の小児例と成人例の比較検討
-臓器障害と遷延化病変について-

分担研究者 相原雄幸 横浜市立大学医学部付属市民総合医療センター 助教授

研究要旨 小児における Stevens-Johnson 症候群 (SJS) の臓器障害および遷延化病変について成人の SJS と比較検討した。対象は本邦報告例の小児 123 例 (11 ヶ月～15 歳、男女比 1 : 0.6) と成人 208 例 (16 歳～79 歳、男女比 1 : 1.5) であり、臓器障害は小児、成人とも肝障害 (小児 25.2%、成人 28.8%)、呼吸器障害 (小児 13.0%、成人 16.8%) が多く、そのほか骨髄、腎および尿路、上下部消化管、心臓、中枢神経系など広範囲に障害が認められた。小児では尿路障害や中枢神経障害の報告が成人より多く、成人では上部消化管障害の報告が小児より多かった。遷延化した病変は小児、成人ともに眼病変 (小児 13.8%、成人 12.0%)、呼吸器障害 (小児 5.7%、成人 5.3%) の順に多く、小児に特徴的なものとしては歯牙の形成障害がみられた。以上より、小児の SJS は、臓器障害や遷延化病変の発症率は成人と比較して低くはないことが明らかとなった。

研究協力者

相原道子 (横浜市立大学大学院医学研究科
環境免疫病態皮膚科学、助教授)

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群 (SJS) は、皮膚や粘膜病変に加え呼吸器障害や肝障害などの臓器障害を合併することが多い。これらは皮疹の治癒後も後遺症として認められることがあり、小児では成長過程で問題となることも少なくない。そこで SJS 小児例の臓器障害および遷延化病変について調査し、成人例と比較検討を試みた。

B. 研究方法

対象症例は、1981 年から 2004 年 2 月までの 22 年間における SJS の本邦報告例で、これを医学中央雑誌および福田の薬疹情報 2) より収集し、原著、症例報告、学会抄録を二次資料として用いた。SJS として報告された症例のうち、四肢、体幹の多形紅斑

と粘膜疹 (眼結膜、口腔口唇粘膜、外陰部・肛門など) を認めたものを採用し、学会抄録で皮疹や粘膜についての記載がなく単に「SJS と診断」とのみ記載された症例は除外した。また、SJS で発症し表皮剥離が拡大して TEN に移行したと報告されているものについては最終的診断は TEN であると考え、今回の SJS の集計からは除外した。ただし、表皮剥離面積が 30%未満であり報告者が TEN と SJS のオーバーラップと診断している症例は採用した。上記の条件を満たす小児例 123 例 (11 か月～15 歳、男児 77 例、女児 46 例) と成人例 208 例 (16 歳～79 歳、男性 81 例、女性 121 例、年齢不明 6 例) における臓器障害および遷延化病変について調査した。

統計的解析は、SJS 小児例と成人例のあいだで有意差検定を χ^2 検定で行った。

C. 研究結果

1 臓器障害

記載のあった臓器障害は小児および成人

のいずれにおいても肝障害（小児 31 例、25.2%、成人 60 例、28.8%）と呼吸器障害（小児 16 例、13.0%、成人 35 例、16.8%）が多く、頻度に差を認めなかった（頻度は全報告数における頻度）（表 1）。呼吸器障害は小児と成人のいずれにおいても間質性肺炎、呼吸不全、肺気腫・縦隔気腫、慢性閉塞性細気管支炎、気管・気管支粘膜障害、細菌性肺炎などの記載がみられた。なお、肝障害については、他の臓器障害より頻度が高いことが一般に認識されていることから、障害がみられない場合は会議録にもその旨が記載されていることが多かった。そのため、頻度算出において全報告数ではなく肝機能に言及している症例のみを分母とすると小児では 31 例/52 例（59.6%）、成人では 60 例/94 例（63.8%）であり、この場合にも頻度に有意差を認めなかった。尿路障害では、膀胱粘膜障害、尿管・尿道口狭窄、水腎症が小児および成人のいずれにもみられたが、小児の報告例が成人より多かった。中枢神経障害の報告も小児で多く、成人では脳出血と意識障害の各 1 例であったのに対し、小児では脳炎 2 例（1 例は麻疹脳炎）と意識障害 3 例の計 5 例がみられた。そのほか心不全・心筋炎も小児例で成人例より多く報告されていた。一方、血便・下血、下痢などの下部消化管障害は小児例と成人例で差はなかったが、上部消化管障害は小児例ではサイトメガロウイルス胃炎 1 例のみであったのに対し、成人例では食道粘膜障害や吐血など 7 例がみられた。しかしながら、これらの発生頻度に成人例と小児例の間で有意差のみられたものはなかった。

2 遷延化病変

小児と成人で遷延化した病変に差はなく、いずれも結膜上皮のびらの結果生じた癩痕性角結膜症による視力障害や涙嚢開口部閉塞によるドライアイなどの眼病変が最も多く（小児 17 例、13.8%、成人 25 例、12.0%）、次いで気道粘膜障害による呼吸障害などの

呼吸器障害（小児 7 例、5.7%、成人 11 例、5.3%）、持続する口腔粘膜びらんなどの口腔粘膜病変（小児 4 例、3.3%、成人 6 例、2.9%）が多かった（表 2）。そのほか、尿道口狭窄・尿管狭窄・水腎症などの尿路障害がそれぞれ 3 例にみられたが、いずれも有意差はみられなかった。小児に特徴的なものとしては歯牙の形成障害が 2 例（1.6%）でみられた。

3 死亡例の検討

死亡例の報告は小児 1 例（0.8%）、成人 17 例（8.2%）であった。

小児の死亡例は 5 歳男児で、以下に経過のまとめを延べる。感冒症状に対し消炎剤（サリチルアミド、アセトアミノフェンなどの合剤）を 1 回服用した翌日（第 1 病日）に発熱、咽頭痛、眼痛が、第 2 病日に湿性咳嗽と体幹の紅斑が、第 3 病日には口唇発赤、頭痛、腹痛が出現した。第 4 病日には皮膚のびらんと眼脂がみられ、呼吸困難が増強した。プレドニゾロン 2mg/kg 投与にて皮膚粘膜症状治癒、一般症状も改善しステロイドを中止された。その後も湿性咳嗽は持続していたが、第 20 病日に呼気性呼吸困難と乾性ラ音が出現した。プレドニゾロン投与再開後も呼吸器症状は進行し、第 83 病日に死亡した。経過中ウイルス抗体価の上昇がみられ、RS ウイルスが 16 倍、エコー 3 型が 4 倍、エコー 11 型が 8 倍の上昇を認めた 3)。

成人死亡例は 17 例（男性 5 例、女性 12 例）で 18 歳から 76 歳（平均 55.5 歳）であり、原因は薬剤 12 例、薬剤または感染症 3 例、マイコプラズマ感染 1 例、記載なし 1 例であった。その記載されていた死因および合併症は呼吸障害 10 例、肝障害 8 例（呼吸障害との合併例を含む）のほか、骨髄障害、敗血症、血球貪食症候群、DIC、心不全、消化管出血、原疾患である悪性腫瘍などがみられた。なお、マイコプラズマ感染が原因とされた SJS で多臓器不全で死亡した 18 歳男性例は経過中にアセトアミノフェンを

投与されており、原因が薬剤である可能性が否定できなかった。

D. 考察

SJS の経過における小児例の特徴としては、小児死亡例の報告がほとんどないことから、成人例より予後がよいことが挙げられる。しかしながら、小児例では死亡率が低いにもかかわらず、臓器障害を生じる頻度は肝障害、呼吸器障害のほか、骨髄障害、腎障害、下部消化管障害についても成人との間で有意な差はみられず、心筋炎、心不全や意識障害などの報告は成人例よりむしろ多いことが示された。小児に多いマイコプラズマ感染が原因と思われる SJS においても重篤な肝障害、呼吸器障害、消化管障害などの臓器障害が少ない傾向はみられなかった。これらは、小児の SJS では臓器障害を生じにくいために予後がよいのではなく、臓器障害を生じても回復するために死に至らないことを示している。さらに、病変が遷延化して障害を残す頻度が眼病変、呼吸器障害ともに成人と差がみられなかったことは、小児の粘膜障害が成人より軽症ではないことを示している。

これまで、小児の SJS はステロイド剤の全身投与で軽快する例が多く、死亡率も低いことから、成人 SJS より軽症であるという印象を皮膚科医に与えていたように思われる。しかしながら、今回の調査では臓器障害の発症率だけでなく視力障害や呼吸障害が遷延化して後遺症となる率が成人と差がみられなかった。これは小児の SJS が QOL の観点からは成人より予後がよいとは言えないことを示すものであった。

E. 結論

今後救命だけでなく、長期間の苦痛を患者に与える後遺症の発症阻止を目的として、

関連する多科の協力による全身的、局所的治療法のさらなる研究が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 16 年度)

論文発表

Miyamae T, Kurosawa R, Mori M, Aihara Y, Aihara M, Yokota S: An infant with γ -globulin-induced hypersensitivity syndrome who developed Evans' syndrome after a second second γ -globulin treatment, *Mod Rheumatol* 14:314-319, 2004.

Aihara Y, Ito S, Aihara M: Stevens-Johnson syndrome associated with azithromycin followed by transient reactivation of herpes simplex virus infection. *Allergy*, 59:118, 2004.

Aihara M, Mitani N, Kakemizu N, Yamakawa Y, Inomata N, Ito N, Komatsu H, Aihara Y, Ikezawa Z. Human herpesvirus infection in drug-induced hypersensitivity syndrome, toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Allergology International*, 53:23-29, 2004.

相原雄幸. 特集:見逃されていた重症薬剤アレルギー DIHS 小児のDIHS. *皮膚アレルギーフロンティア* 2:25-29, 2004

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許取得: なし

実用新案登録: なし

その他: なし

表1臓器障害および合併症	小児例	成人例
肝障害	31*(25.2%)	60*(28.8%)
呼吸器障害	16(13.0%)	35(16.8%)
骨髄障害	10(8.1%)	10(4.8%)
尿路障害	8(6.5%)	5(2.4%)
腎障害	7(5.7%)	9(4.3%)
心不全・心筋炎	7(5.7%)	6(2.9%)
中枢神経障害	5(4.9%)	2(1.0%)
下部消化管障害	4(3.2%)	7(3.4%)
上部消化管障害	1(0.8%)	7(3.4%)
DIC	5	5
急性膵炎	2	3
血球貪食症候群	1	1
横紋筋融解症	1	0
唾液腺炎	0	4
単にアミラーゼ上昇とのみ記載	1	2
敗血症	0	3
()内は報告数における頻度		
* 胆汁うっ滞型肝炎は小児 2 例、成人 8 例		

表2遷延化病変		
	小児例	成人例
眼病変	17(13.8%)	25(12.0%)
呼吸器障害	7(5.7%)	11(5.3%)
口腔粘膜障害	4(3.3%)	6(2.9%)
歯牙の形成異常	2	0
肝機能障害、胆汁うっ滞	2	6(2.9%)
尿道口狭窄	2	1
尿管狭窄	1	2
骨髄抑制	1	1
消化管障害	1	1
爪の脱落	1	3
食道病変	0	3
唾液腺炎	0	1
脾炎	0	1
心筋炎	0	1
()内は報告数における頻度		

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

皮膚付属器を有する培養皮膚の作製

分担研究者 岸本治郎 資生堂ライフサイエンスセンター

研究要旨 上皮と真皮の相互作用に着眼点を置いた細胞移植、及び三次元培養皮膚上で毛包を始めとする皮膚付属器官を再生させることを目指している。昨年度は本来無毛部位であるヒト包皮組織由来の上皮細胞にも毛包上皮分化能を有する可能性を見出し、成熟した成人包皮組織由来の上皮細胞においても同様の分化能が認められることを明らかにした。マウス毛乳頭細胞と上述のヒト上皮細胞を免疫不全マウス背部皮膚に細胞移植することで、不完全ながら、ヒト様毛包構造を示すキメラ毛包の形成を認めた。本年は、さらにヒト様キメラ毛包の解析を進め、毛包への分化マーカー及び毛包発生過程で発現する因子の特異的発現を形成されたヒト様キメラ毛包で確認した。これらの結果は、得られた構造体が未成熟ではあるが、毛包に近い性質を持つことを示していると考えられた。また、毛包上皮細胞中の未分化細胞の同定を目的に、造血幹細胞で解析されているSP (Side Population)細胞の同定と分離を試み、その存在を確認したが、移植実験に供した結果、分離したSP細胞が毛包分化能を有していることを示す結果は得られなかった。

A. 研究目的

本研究の目的は術後のQOL向上を目指して、毛髪を始めとする皮膚付属器官を有する自己培養皮膚作製技術を確立することである。前年度までに、誘導能を有するマウス毛乳頭細胞を用いたヒト上皮細胞の分化能の検定を行い、無毛部位の包皮由来の上皮細胞からヒト様毛包の構造体が形成されることを確認した。今年度は、この構造体の詳細な解析を進め、形態のみならず、生

物学的にも毛包への分化過程であることを確認することとした。さらに包皮由来の上皮細胞中の未分化細胞(幹細胞)を同定、単離する試みをセルソーターを用いて行った。

B. 研究方法

1. 細胞調製及び細胞移植による毛包再生
マウス毛乳頭細胞濃縮画分及びヒト包皮由来上皮細胞は常法により調製した。移植は

分離した毛乳頭細胞画分 1×10^7 と、別に調製したヒト上皮細胞 5×10^6 - 1×10^7 を移植直前に混合し、遠心して培養液を取り除き、細胞塊にした。この細胞塊をヌードマウス (balb/c nu/nu) 背部皮膚に埋め込んだシリコン製のドーム型チャンバー内に流し込んだ。1週間後、チャンバーをはずし、さらに3週間目以降に移植部位の毛髪形成の有無の肉眼観察を行った。SP細胞はチャンバー法に供する細胞数の確保が困難であったため、シリンジによる皮内注による移植法を実施した。3週目以降に移植部位を採取し、毛包塊の有無を検討した。

2. 移植部位の形態観察

移植部位の組織片を採取し、連続したパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン染色により、ヒト様毛包、毛幹、皮脂腺、マウス毛乳頭の有無を形態観察で確認した。ヒト細胞種の特異性はHochest33258による核染色を用いた。In situ ハイブリゼーション法はプローブとしてヘアートリチン (Hb1) を用い、反応はベンタナ社製 DiscoveryHX システムを用いた自動染色装置を用いて行った。免疫染色は、1次抗体としてパンケラチン、抗 AE-13 (ヘアートリチン特異的抗体を認識; ニューヨーク大 T.T. Sun 博士より供与), p63, Ki-67, OCT-4, CD44, GATA-3, Msx-2, ビメンチン、Versican alpha chain, Versican beta chain 抗体を用いて免疫染色を行った。対照として成長期の成熟したヒト毛包組織を

含む皮膚組織切片での各抗体の染色性も検討した。

3. SP細胞の同定と単離

細胞移植に供するのと同様の方法で調製した包皮由来のヒト上皮細胞 (プライマリー~P2) を HBSS 培地 (2%FCS), 10mMHEPES, 抗生剤添加の溶液に懸濁し、100万個/mlの細胞数に調製した。Hochest33342 (5-15 μ g/ml) を添加し 37°C で1時間反応した。一部試料にはレセルピン (6.25 μ g/ml) をさらに加えた。反応後遠心し、約500万個/mlで再懸濁し、FACS ヴァンテージ (ベクトン・デキソン社) にて解析および SP 分画の分取を行った。

C. 研究結果

1. ヒト様毛包の解析

ヌードマウス皮膚の移植部位組織のパラフィン切片について、ヘアケラチン (Hb1) 特異的プローブを用いて、in situ hybridization を行った結果、ヒト毛包様組織の上皮系細胞に特異的なシグナルが検出され、毛包様の形態を取らない部分には、シグナルは検出されなかった。AE13 (ヘアケラチン特異的抗体) を用いて免疫染色を行った結果、ヒト毛包と同様、毛髓にシグナルが認められた。次に毛包の発生過程で特徴的な局在が報告されている因子について免疫染色を行った。

a) CD44 (発生過程で毛包及び表皮の基底細胞で発現、発生初期の dermal

condensation 時の間葉系細胞で発現) : 毛包及び表皮の一部の基底層及び有棘層の下層で認められた。毛乳頭での発現は認められない。

b) Msx-2 (発生過程では毛包及び表皮細胞の細胞質で発現し、成人では核に局在) : 毛包及び表皮の一部の有棘層の細胞質で認められた。

c) Ki-67 抗原, p63 (増殖細胞) : Ki-67 抗原のシグナルは、毛包及び表皮の基底細胞に点在した。また、p63 のシグナルは、表皮及び毛包の基底層及び有棘層の下層部に点在した。

d) CD34, K15 (バルジ領域) : シグナルは検出されなかった。

e) バーシカン (マウス毛乳頭) : シグナルは認められなかった。

f) ビメンチン (間葉系細胞) : 表皮及び真皮中のメラノサイト様の細胞でシグナルが認められた。

g) Pan keratin (ケラチン 4, 5, 6, 8, 14, 16) : 表皮の角層、顆粒層、有棘層、及び毛包の基底層以外の領域にシグナルが認められた。

h) トランスグルタミナーゼ (角化上皮) : シグナルは認められなかった。

以上から、再生された毛包様組織は、毛包への分化を開始しているが、その途中段階であると考えられた。

2. SP細胞の毛包分化能

ヘキスト色素を取り込ませた後、FACS解析を行った。ヘキスト色素の濃度について

検討し、至適濃度 (7.5ug/ml) を決定した。解析の結果、SP細胞の特徴であるレセルピン依存のシグナル消失が確認され、培養した包皮由来ケラチノサイト中のSP細胞の存在を確認した。比率は、細胞中の 1%程度であった。約 5×10^6 のSP細胞を分取し、一晚培養あるいは直接、マウス背部皮膚に、マウス毛乳頭細胞画分と共に移植を行った。移植 3 ヶ月後に移植部位の皮膚を摘出し、薄切切片を作製し、顕微鏡観察を行ったが再構成された毛包らしき形態は認められなかった。

D. 考察

今回の解析で、形態学的には毛幹、毛髄構造様を示していた細胞移植により再構成された構造体が、毛包への分化シグナルの代表的な Hb1 及び AE13 抗体で、特異的に染色されたことで、毛包への分化過程がより明確に確認されたと考えられる。また毛包の発生期に特異的に発現することが知られている CD44, MSX-2, Ki67, P63 の発現が認められた一方、成熟した毛包で観察される K15 やトランスグルタミナーゼの染色性は陰性であったことから、得られた構造体は毛包の発生過程に類似した未成熟な毛包に相当すると考察された。また、ヒト様毛包構造に付随したマウス毛乳頭細胞において、活性型のマーカーであるバーシカンに対する染色性が陰性であったことは、異種間での上皮-真皮相互作用の過程で正常なシグナルの受け渡しが滞り、結果的にバーシカン

発現の消失と、未成熟な毛包が形成された原因ではないかと考えられる。

さらに本来、無毛部位である包皮由来の上皮細胞が毛包への分化能を有することから、毛包上皮へ分化可能な未成熟なステムセルが存在するのではないかと考え、造血幹細胞として知られているSP細胞の存在を検討した。SP細胞自体の存在は確認されたが、機能アッセイ(ヌードマウスへの細胞移植)では高い毛包への分化能を示す確証は得られなかった。SP細胞と上皮幹細胞は異なる細胞群であると考えられた。

今後は現在用いているマウス毛乳頭細胞を、誘導能を有するヒト毛乳頭細胞に置換した移植系での完全ヒト毛包再生が期待される。鍵となるヒト毛乳頭細胞の誘導能維持について培地成分の検討などが考えられる。

E. 結論

包皮組織由来の上皮細胞は形態のみならず、分子レベルでも毛包への分化過程を経ていることが判明した。SP細胞は毛包上皮幹細胞とは異なると推測された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

Kobayashi K, Kishimoto J, Hattori S, Wachi H, Shinkai H, and Burgeson RE. Matrix metalloproteinase-9 expression is coordinately

modulated by the KRE-M9 and TPA responsive elements. *J Invest. Dermatol.* 122:278-85, 2004

Ishimatsu-Tsuji Y, Moro O, Kishimoto J. Expression profiling and cellular localization of genes associated with the hair cycle induced by wax depilation. *J. Invest. Dermatol.* Revised for acceptance

Ehama R, Ishimatsu-Tsuji Y, Soma T, Ideta R, Yano K, Shirakata Y, Hashimoto K, Suzuki S, Kishimoto J. Generation of human hair follicle by cellular grafting. In preparation

2. 学会発表

岸本 治郎、江浜律子、出田立郎、矢野喜一郎、相馬勤、白方裕司、橋本公二、鈴木聡：成人上皮由来細胞によるヒト毛包再構成。第29回日本研究皮膚科学会年会 2004年4月16-17日 京都

江浜律子、出田立郎、矢野喜一郎、相馬勤、白方裕司、橋本公二、鈴木聡、岸本 治郎：細胞移植によるヒト毛包再生。第3回再生医療学会総会 2004年3月23-25日東京

Ehama R, Ishimatsu-Tsuji Y, Soma T, Ideta R, Yano K, Shirakata Y, Hashimoto K, Suzuki S, Kishimoto J.: Role of Regeneration of Human Hair follicle by Cellular Grafting. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology Apr. 28 - May 1, 2004, Rhode

Island, USA

Kishimoto J.: signaling from dermal papilla cells. International Hair Research Society Meeting, June 19, 2004, Berlin, Germany

3. 講演・シンポジスト

岸本治郎：毛は再生できるか？日本農芸化学会第12回若手シンポジウム：2004年3月31日-4月1日 広島

岸本治郎：ヒト組織を利用した研究. 医薬品におけるヒト皮膚の利用 第25回日本

学術会議薬理学研連「臨床薬理シンポジウム」2004年9月16日静岡

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 出願中2件

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

三次元培養皮膚の有効性に関する臨床研究

分担研究者 白方裕司 愛媛大学医学部皮膚科 助手

研究要旨 培養皮膚移植の有効性についてはすでに報告してきたが、培養表皮シートの場合、その生着性が低いことが問題となっている。表皮真皮を有する三次元培養皮膚は基底膜がある程度保持されていることを明らかにしているが、臨床応用においてその生着性を比較検討した。三次元培養皮膚は生着率が50-70%であり、培養表皮シートと比較して明らかに生着性が高いと思われる。

A. 研究目的

培養皮膚はその構成細胞により数種類に分類される。培養表皮シートは角化細胞のみを重層化させたもので、臨床応用はかなり実施されている。我々の臨床応用例においては、生着率が低く、周囲からの上皮化はみられるものの、潰瘍中心部での生着がみられることは少ない。これは、基底膜の成分を欠いていることによると思われる。培養皮膚移植の有効性をあげるためには生着性の向上が不可欠である。培養皮膚のなかで、最も高度なものが三次元培養皮膚である。我々は、自己三次元培養皮膚の作製法を確立し、組織学的に基底膜が保持されていることを既に報告している。三次元培養皮膚が生着性に優れていれば、今後三次元培養皮膚を積極的に推進することが望ましい。そこで、難治性下腿潰瘍症例に三次元培養皮膚移植を施行し、生着性に関して培養表皮シートと比較検討した。

B. 研究方法

再発性の難治性下腿潰瘍症例2例について、最初に凍結保存しておいた自己繊維芽細胞と自己角化細胞を用いた。培養表皮シートは無血清培養で角化細胞を培養し、引き続いて高カルシウム培地に変更することにより重層化を行い、ディスペーゼにてディッシュから剥離し使用した。三次元培養皮膚は1型コラーゲンゲル内で線維芽細胞を培養し、5日後に角化細胞をゲルの上に播種、その2日後に空気曝露により重層化を行い、空気曝露後7-14日のものを使用した。プロトコールとしては、最初に培養表皮シート移植を週に3回施行し、6回施行後に三次元培養皮膚移植を行い、その生着性について観察した。

C. 研究結果

培養表皮シート移植では、2例とも潰瘍中

心部での生着は認められなかった。創の上皮化は辺縁より認められ、それまでの保存的治療と比較して、明らかに上皮化は促進されていた。また、辺縁では培養表皮シートが一部生着していると思われる部位を認めた。おおむね、1-2 mm/日で上皮化がみられた。2週後に自己三次元培養皮膚を移植し、その生着性を観察したところ、2例とも1回の移植では50-70%の面積で生着しているのが観察された。2症例とも、3日後に追加で三次元培養皮膚移植を行ったところ、初回移植から7日後にはほぼ上皮化が完了した。

D. 考察

三次元培養皮膚の生着性は、培養表皮シートと比較して明らかに高いものであった。自己三次元培養皮膚の作製は複雑で、繊維芽細胞と角化細胞をともに用意する必要があるため、作製は培養表皮シートと比較すると労力・手間・費用を要する。しかしながら、その点を考慮しても、生着性が良いことは治療効果・期間、ひいては治療費用の面で優位であるといえよう。生着性が良いことは、おそらくは基底膜の成分が保持されていることによると思われる。三次元培養皮膚の欠点としては、一度に大量作製が難しい点である。従って、熱傷などの広範囲を覆うには適していないと思われるが、比較的面積の小さい下腿潰瘍についてはその有効性が最もいかされるとと思われる。今後症例をさらに追加し、三次元培養皮膚の

最も良い適応疾患、移植法の改善を行って行くべきと考える。

E. 結論

三次元培養皮膚は生着性に優れており、難治性下腿潰瘍に関して有効な治療法となると考える。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成 16 年度)

論文発表

Hanakawa Y, Shirakata Y, Nagai H, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: Cre-loxP adenovirus-mediated foreign gene expression in skin-equivalent keratinocytes. *Br J Dermatol.* in press

Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M.: In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* in press

Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, Hashimoto K.: SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 327:100-5, 2005

Shirakata Y, Ueno H, Hanakawa Y, Kameda K, Yamasaki K, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: TGF-beta is not involved in early phase growth inhibition of keratinocytes by 1alpha,25(OH)2vitamin D3. J Dermatol Sci. 36:41-50, 2004

Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K.: All-trans-retinoic acid induces interleukin-8 via the nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in normal human keratinocytes. J Invest Dermatol. 123:1078-85, 2004

Dai X, Yamasaki K, Yang L, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama

M, Hashimoto K.: Keratinocyte G2/M growth arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is caused by Cdc2 phosphorylation through Wee1 and Myt1 regulation. J Invest Dermatol. 122:1356-64, 2004

白方裕司:新しい治療法としての培養表皮シート移植. 日皮会誌 114: 2056-59, 2004.

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

研究成果の一覧表

橋本公二

Hanakawa Y, Shirakata Y, Nagai H, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, **Hashimoto K.**: Cre-loxP adenovirus-mediated foreign gene expression in skin-equivalent keratinocytes. **Br J Dermatol. in press**

Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, **Hashimoto K.**, Amagai M.: In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol. in press**

Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, **Hashimoto K.**: SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. **Biochem Biophys Res Commun.** 327:100-5, 2005

Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Sayama K, **Hashimoto K.**: All-trans-retinoic acid induces interleukin-8 via the nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in normal human keratinocytes. **J Invest Dermatol.** 123:1078-85, 2004

Shirakata Y, Ueno H, Hanakawa Y, Kameda K, Yamasaki K, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, **Hashimoto K.**: TGF-beta is not involved in early phase growth inhibition of keratinocytes by 1alpha,25(OH)₂vitamin D₃. **J Dermatol Sci.** 36:41-50, 2004

Niiya H, Azuma T, Jin L, Uchida N, Inoue A, Hasegawa H, Fujita S, Tohyama M, **Hashimoto K.**, Yasukawa M.: Transcriptional downregulation of DC-SIGN in human herpesvirus 6-infected dendritic cells. **J Gen Virol.** 85:2639-42, 2004

Kohno S, Nakagawa K, Hamada K, Harada H, Yamasaki K, **Hashimoto K.**, Tagawa M, Nagato S, Furukawa K, Ohnishi T.: Midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for malignant glioma therapy. **Oncol Rep.** 12:73-8, 2004.

Dai X, Yamasaki K, Yang L, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, **Hashimoto K.**: Keratinocyte G2/M growth arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is

caused by Cdc2 phosphorylation through Wee1 and Myt1 regulation. **J Invest Dermatol.** 122:1356-64, 2004

玉井克人

Hiraoka K, Yamamoto S, Otsuru S, Nakai S, **Tamai K**, Morishita R, Ogihara T, Kaneda Y.: Enhanced tumor-specific long-term immunity of hemagglutinating virus of Japan-mediated dendritic cell-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides. **J Immunol.** 2004, 173:4297-307.

Matsuki A, Yamamoto S, Nakagami H, Aoki M, **Tamai K**, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R.: No influence of tumor growth by intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid DNA: safety evaluation of therapeutic angiogenesis gene therapy in mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 2004, 315:59-65.

Oshima K, Shimamura M, Mizuno S, **Tamai K**, Doi K, Morishita R, Nakamura T, Kubo T, Kaneda Y.: Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats. **FASEB J.** 2004, 18:212-4.
Umegaki N, Moritsugu R, Katoh S, Harada K, Nakano H, **Tamai K**, Hanada K, Tanaka M.: Photodynamic therapy may be useful in debulking cutaneous lymphoma prior to radiotherapy. **Clin Exp Dermatol.** 2004, 29:42-5.

Odanagi M, Kikuchi Y, Yamazaki T, Kaneko T, Nakano H, **Tamai K**, Uitto J, Hanada K.: Transcriptional regulation of the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene expression by interferon regulatory factor 1 and interferon regulatory factor 2 in normal human epidermal keratinocytes. **Exp Dermatol.** 2004, 13:773-9.

岡野栄之

Suzuki S, Yamashita T, Tanaka K, Hattori H, Sawamoto K, **Okano H** and Suzuki N.: Activation of cytokine signaling through Leukemia Inhibitory Factor Receptor (LIFR)/gp130 attenuates ischemic brain injury in rats. **J. Cerebral Blood Flow and Metabolism** In Press (2004)

Clarke, R.B., Spence, K., Anderson, E., Howell, A., **Okano, H.** and Potten, C.S.: A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells.