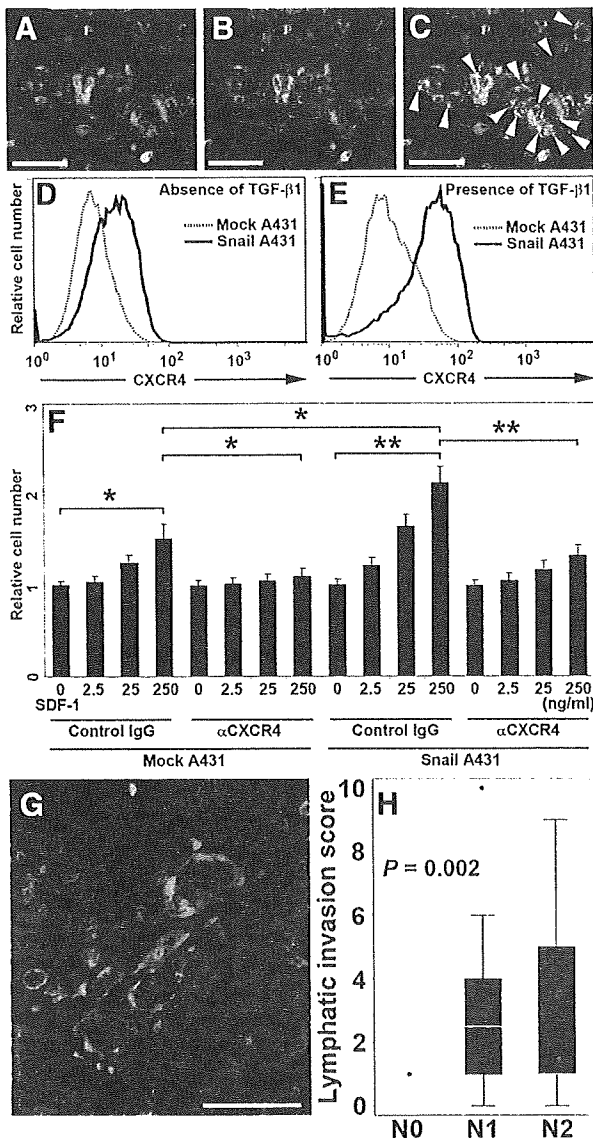


**Figure 3.** Epithelial-mesenchymal transition-like phenotypes as novel prognostic parameters for reduced survival in EMPD. **A–C:** H&E staining of representative normal skin (**A**), CIS (**B**), and invasive EMPD tumors (**C**). **D–F:** Double-immunofluorescence staining for E-cadherin (green) and for N-cadherin (red) shows typical E-cadherin expression on the surface of normal epidermal keratinocytes (**D**). In contrast, intraepidermal Paget cells do not express high levels of E-cadherin (**E**). Cytoplasmic E-cadherin expression is obvious in invasive EMPD tumors (**F**, arrowheads). The mesenchymal marker N-cadherin is induced in invasive Paget cells (**F**). **G–I:** Immunohistochemical staining shows vimentin expression in highly invasive Paget cells from patients with advanced disease (**I**, red) but not in normal epidermis (**G**) or CIS (**H**), suggesting that EMT-like phenotypes correlate with invasive feature of Paget cells. **J:** Kaplan-Meier survival analyses shows that the EMT-related markers N-cadherin and vimentin, and cytoplasmic E-cadherin expression are significantly associated with poor survival in EMPD. Scale bars = 50  $\mu$ m (**A–I**). Nuclei are stained blue (DAPI or hematoxylin stain).



**Figure 4.** EMT-like process induces CXCR4 on A431 epidermoid cells and enhances their chemotaxis to SDF-1. **A–C:** CXCR4 expression (**B**, red) in invasive Paget cells detected in N-cadherin-positive cells (**A**, green; **C**, yellow, **arrowheads**). **D:** Expression of CXCR4 is considerably increased on the surface of A431 cells transfected with Snail as compared with mock-transfected A431 cells. **E:** TGF- $\beta$ 1 further induced expression of CXCR4 on Snail-but not mock-transfected A431 cells, indicating that EMT-like process promotes CXCR4 induction in vulval epidermoid tumor cell lines. **F:** Chemotaxis by TGF- $\beta$ 1-treated Snail-transfected A431 cells in upper chambers is enhanced toward SDF-1 in the bottom chambers as compared with mock-transfected A431 cells. Neutralization of CXCR4 on A431 cells significantly inhibited enhanced chemotaxis to SDF-1, suggesting that the CXCR4-SDF-1 axis is necessary to promote motility of A431 cells undergoing EMT-like process. Data are expressed as means  $\pm$  SD; \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ . **G:** Double immunofluorescence staining shows lymphatic invasion by cytokeratin 7-positive Paget cells (red) within tumor-associated lymphatic vessels (green). **H:** Multivariable linear regression analysis shows that increased lymphatic invasion in primary tumors statistically correlates with progression of nodal status in metastatic EMPD ( $P = 0.002$ ). Lymphatic invasion was significantly increased at stages N1 and N2 as compared with N0 ( $P = 0.002$  and  $0.003$ , respectively). Scale bars: **A–C**, 30  $\mu$ m; **G**, 25  $\mu$ m.

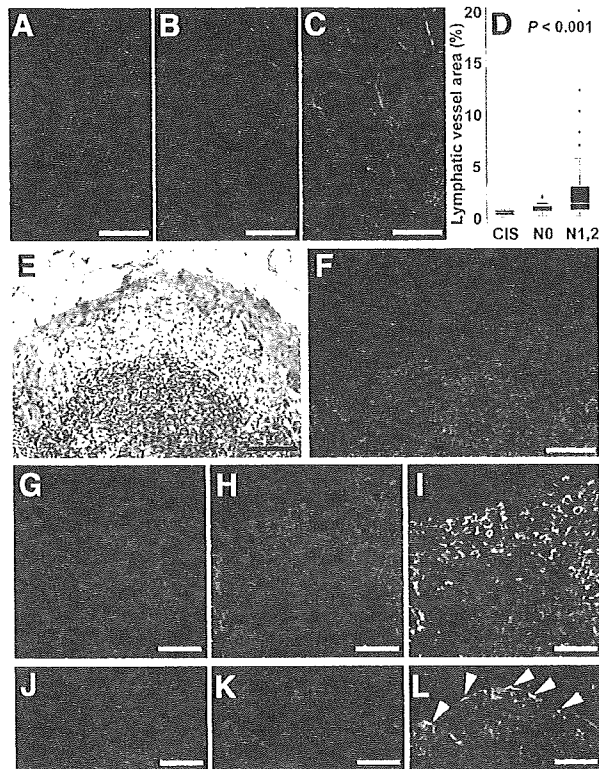
with invasive EMPD to determine whether active invasion of lymphatic vessels by Paget cells is induced by EMT-like features and/or CXCR4 and to predict the subsequent incidence of regional LN metastasis. Double-im-

munofluorescence staining for cytokeratin 7 (expressed by tumor cells) and for podoplanin identified active invasion of the tumor-associated lymphatic vessels by Paget cells (Figure 4G). Expression of the EMT-related markers vimentin and N-cadherin, and of cytoplasmic E-cadherin, closely correlated with the incidence of lymphatic invasion in primary skin tumors ( $P = 0.0003$ ,  $0.0036$ , and  $0.012$ , respectively). Furthermore, expression of CXCR4 was strongly associated with the incidence of lymphatic invasion within the primary sites ( $P < 0.0001$ ). Importantly, presence of those EMT-associated markers closely correlated with the expression of CXCR4 by invasive Paget cells ( $P < 0.01$ , respectively), revealing a potential induction of CXCR4 by EMT-related process in invasive Paget cells. Moreover, lymphatic invasion by Paget cells was significantly increased at stages N1 and N2, compared with N0 ( $P = 0.002$  and  $0.003$ , respectively; Figure 4H). Multivariable linear regression analysis adjusted for age and gender confirmed a remarkable increase of lymphatic invasion throughout N-grade progression ( $P = 0.002$ ; Figure 4H). Taken together, these results indicate that EMT-related features actively promote tumor cell invasion into tumor-associated lymphatic vessels, and that active lymphatic invasion by Paget cells undergoing EMT-like process probably promotes the successive progression of regional LN metastasis, leading to an increased risk for patient survival in EMPD.

#### Enhanced Nodal Lymphangiogenesis in Regional LNs during Tumor Metastasis

We and others<sup>18,20,44</sup> have shown in experimental animal tumor models that primary tumors can promote metastatic spread by the induction of lymphangiogenesis within draining lymph nodes. Therefore, to investigate whether nodal LECs are involved in human EMPD metastasis, we assessed lymphangiogenesis and the formation of a pre-metastatic niche within regional LNs. Lymphangiogenesis in LNs containing metastatic Paget cells was obviously induced within the metastases (Figures 5C and 6, A and B). Surprisingly, lymphatic vessel growth in regional LNs was already induced in patients with invasive EMPD before the tumors had metastasized (Figure 5B), whereas such changes were undetectable in the regional LNs of patients with CIS (Figure 5A). Quantitative image analysis of LN sections stained for podoplanin and von Willebrand factor and logistic regression analysis confirmed that lymphatic vessel growth within the regional LNs was progressively enhanced throughout the metastatic process ( $P < 0.001$ ; Figure 5D). Computer-assisted morphometric analysis revealed that areas of lymphatic vessels in the LNs of group N1 and N2 tumors ( $n = 19$ ) were significantly more extensive than in the group with N0 ( $n = 14$ ) tumors ( $P = 0.022$ ). Taken together, these results suggest that the activation of tumor-associated sinusoidal lymphatic vessels is induced before metastasis, and enhanced by metastatic Paget cells within regional LNs.

Therefore, we investigated whether increased lymphatic vessel areas (LVAs) in regional LNs could predict



**Figure 5.** Lymphovascular niche within the regional LNs in patients with EMPD. **A–C:** Double-immunofluorescence staining shows enlarged tumor-associated lymphatic vessels in metastatic regional LNs (**C**, green). New lymphatic vessel growth is already induced before tumor metastasis (**B**, green). Vasculature in normal LNs visualized using anti-von Willebrand factor antibody for blood vessels (**A**, red) and D2-40 for lymphatic vessels (**A**, green). **D:** Progressive lymphatic vessel growth within regional LNs during metastatic process was confirmed by linear regression analysis ( $P < 0.001$ ). Data are expressed as means  $\pm$  SD. **E:** Subcapsular sinus of nonmetastatic regional LNs draining EMPD tumor (H&E stain). **F:** Immunofluorescence staining shows SDF-1 expression in subcapsular sinus. **G–I:** Immunofluorescence staining using macrophage marker HAM56 (**H**, green) shows that macrophages within subcapsular sinus (**I**, yellow) express high levels of SDF-1 (**G**, red). **J–L:** Podoplanin-positive lymphatic sinusoidal cells (**K**, green) express SDF-1 in subcapsular sinus (**J**, red; **L**, yellow, **arrowheads**). Nuclei are stained blue (DAPI stain). Scale bars = 100 (**A–C**, **E**, and **F**) and 50 (**G–L**)  $\mu$ m.

distant LN metastasis. We found that LVAs in regional LNs were increased in patients with distant LN metastasis (LVA without versus with regional LN metastasis;  $0.88 \pm 1.26\%$  versus  $3.10 \pm 3.50\%$ ;  $P = 0.1204$ ), indicating that lymphatic vessel enhancement in regional LNs could predict the presence of distant LN metastasis.

We also found that sinusoidal LECs and macrophages within the subcapsular sinuses of non-metastatic regional LNs draining EMPD tumors expressed abundant SDF-1 (Figure 5, E–L). Thus, the subcapsular sinuses that comprise primary sites of tumor metastasis in the LNs might form premetastatic niches<sup>45,46</sup> by promoting the migration and retention of CXCR4-positive Paget cells. In fact, 8 of 9 and 6 of 11 patients had bilateral and unilateral regional LN metastases, respectively, but Paget cells in primary invasive tumors expressed high levels of CXCR4 in only 2 of 95 patients without regional LN metastases. Importantly, CXCR4 was expressed within primary sites in 13 of 15 patients with distant LN metastasis. Indeed,

distant LN metastasis was significantly associated with CXCR4 expression by invasive Paget cells in primary tumors, compared with its absence ( $P < 0.0001$ ). Therefore, these results suggest that the CXCR4-SDF-1 axis contributes to the increase of distant LN metastasis in EMPD.

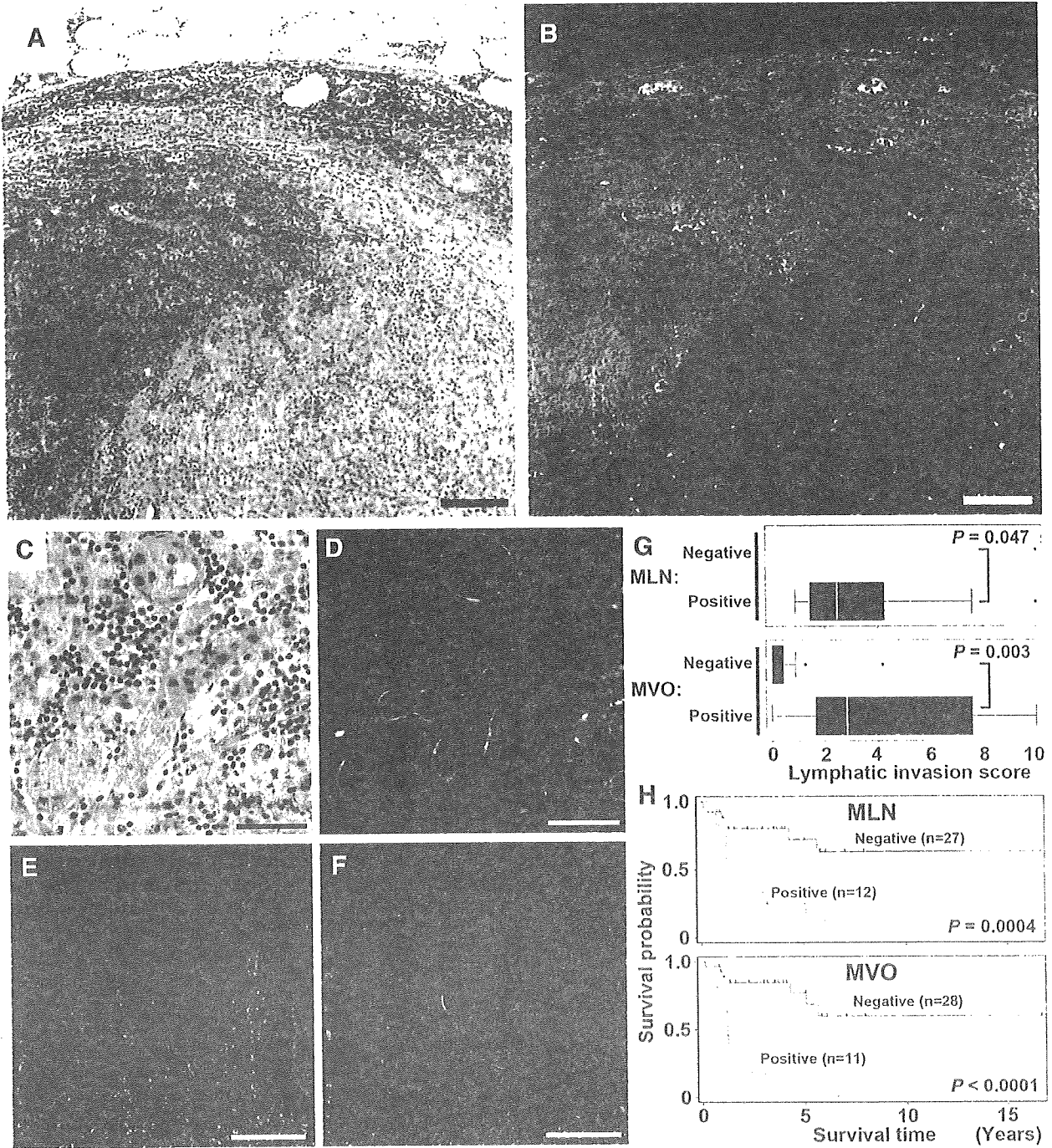
### *Lymphatic Invasion within Regional LNs Predicts Distant LN and Organ Metastasis*

We previously showed in mouse models of experimental carcinogenesis that LN lymphangiogenesis, which might be a target for metastatic tumor cells, positively mediates distant LN and distant organ metastasis.<sup>18,20</sup> Therefore, we examined nodal lymphangiogenesis and metastatic Paget cells within tumor-associated lymphatic vessels in the regional LNs of 23 patients with dermal invasion in primary sites. Routine histology stains revealed metastatic tumor cell foci within the regional LNs but tumor cell-lymphatic vessel interactions could not be analyzed in detail (Figure 6A). Immunofluorescence stains for podoplanin and von Willebrand factor demonstrated not only new lymphatic vessel growth within the regional LNs (Figure 6B), but also the presence of metastatic Paget cells within these metastasis-associated lymphatic vessels (Figure 6, C and D).

Therefore, we investigated Paget cell invasiveness toward tumor-associated sinusoidal lymphatic vessels within regional LNs. We examined the expression of cytokeratin 7 in metastatic Paget cells and in sinusoidal lymphatic vessels by double-immunofluorescence staining (Figure 6, E and F). Lymphatic invasion by Paget cells within regional LNs significantly correlated with distant LN metastasis (metastasis in distant LN(s) beyond regional LN(s),  $n = 12$ ) ( $P = 0.0472$ ; Figure 6G) and with visceral organ metastasis (metastasis in visceral organs,  $n = 11$ ) ( $P = 0.0033$ ; Figure 6H). We also found that distant LN metastasis was a significant prognostic parameter for reduced overall survival in patients with EMPD ( $P = 0.0004$ ; Figure 6H). Taken together, these findings indicate that lymphatic invasion within regional LNs promotes distant LN and organ metastasis in patients with EMPD and leads to a poor outcome.

### *Discussion*

The present study analyzed the largest cohort of patients with EMPD known to date, and identified novel pathomechanisms that promote regional and distant LN metastasis. Tumor lymphangiogenesis was induced not only in primary tumors, but also in regional LNs draining invasive EMPD tumors. Our results revealed that lymphatic invasion by metastatic Paget cells in regional LNs indicate a high risk of distant metastasis and of poor survival for patients with EMPD. Invasion of metastasis-associated lymphatic vessels by Paget cells within regional LNs significantly correlated with distant LN and distant organ metastasis, indicating that active lymphatic invasion in regional LNs is a novel risk marker for the systemic



**Figure 6.** Lymphatic invasion within regional LNs is associated with distant LN metastasis. **A:** Routine H&E stains of metastatic regional LNs. Normal LN structure is visible on left side. Metastatic Paget cells occupy right side of LN. Tumor-associated nodal lymphangiogenesis was detected by immunofluorescence staining for podoplanin (**B**, green), as compared with nonmetastatic regions of LN. **C** and **D:** High power magnification of metastatic LNs confirms that metastatic Paget cells invade podoplanin-positive lymphatic vessels. Blood vessels stained red for von Willebrand factor (**B** and **D**). Double-immunofluorescence staining of metastatic regional LNs for cytokeratin 7 (red) and for podoplanin (green) with poor (**F**) or successful (**E**) clinical outcome. Metastatic Paget cells were identified in regional LNs using anti-cytokeratin 7 antibody, whereas these Paget cells did not invade tumor-associated podoplanin-positive lymphatic vessels (**E**). In contrast, highly aggressive Paget cells invaded adjacent lymphatic vessels (**F**), likely enabling them to further metastasize beyond regional LNs. Nuclei are stained blue (DAPI stain). Scale bars = 100 (**A**, **B**, **E**, and **F**) and 50 (**C** and **D**)  $\mu$ m. **G:** Lymphatic invasion scores within regional LNs are significantly increased in patients with distant LN (MLN;  $n = 12$ ) or visceral organ (MVO;  $n = 11$ ) metastasis compared with those without metastasis ( $P = 0.047$  and  $P = 0.003$ , respectively). Data are expressed as means  $\pm$  SD. **H:** Distant LN metastasis/MLN is significantly associated with reduced patient survival (Kaplan-Meier survival analyses;  $P = 0.0004$ ). MLN, metastasis in distant LN(s) beyond regional LN(s); MVO, metastasis in visceral organs (lung, liver, bone).

spread of EMPD. Thus, we discovered that nodal lymphangiogenesis, which is a crucial target for metastatic tumor cells, plays a significant role in augmenting the metastatic spread of tumors in cancer patients. Moreover, we very recently identified that intrametastatic lymphatic invasion occurs also in human mammary carcinoma metastasis (manuscript in preparation).

We found that tumor lymphangiogenesis in EMPD was induced during successive stages of tumor progression. Both tumor and inflammatory cells including macrophages produced abundant VEGF-A or VEGF-C<sup>47</sup>, which led to enhanced tumor lymphangiogenesis in EMPD. Other studies have found that VEGF-A overexpression in the skin promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis.<sup>12,14,48</sup> The characteristic inflammatory reaction associated with EMPD might thus contribute to more pronounced lymphangiogenesis and angiogenesis in these compared with other types of skin tumors such as those of Bowen's disease and malignant melanoma *in situ*.

We found that primary tumors in patients with distant organ metastasis and poor survival exhibited EMT-like phenotypes, which facilitated invasion by malignant Paget cells. We found that the EMT-related markers N-cadherin and vimentin could serve as novel prognostic markers of reduced survival among patients with EMPD. The EMT-like features of Paget cells were closely associated with lymphatic invasion in primary tumors. Since no cell line of Paget cell origin has been established thus far, we investigated the A431 cell line, a genital epidermoid tumor cell line.<sup>49</sup> Our *in vitro* observations revealed that A431 cells transfected with Snail expressed increased amounts of CXCR4 and that chemotaxis to its ligand SDF-1 was enhanced. These results are in accordance with a recent study identifying the induction of CXCR4 by oral squamous cell carcinoma cell lines undergoing EMT.<sup>50</sup> Furthermore, our present study revealed that tumor-associated LECs abundantly express SDF-1, an inducible chemokine, indicating a crucial role for the CXCR4-SDF-1 axis in tumor cell invasion of the lymphatic endothelium. Overall, our results suggest that EMT-like process contributes to the induction of lymphatic invasion within primary sites, and thus to the further development of regional LN metastasis in EMPD.

We also found that the CXCR4-SDF-1 axis might promote lymphatic invasion by Paget cells in primary tumors, as well as the induction and maintenance of premetastatic lymphovascular niches in the regional LNs of EMPD patients. Invasive Paget cells expressed CXCR4, whereas LECs associated with tumors expressed high levels of SDF-1 and LECs of lymphatic vessels in normal skin did not. Our previous lineage-specific gene profile revealed that LECs can potentially produce SDF-1 as compared with blood vascular endothelial cells.<sup>40</sup> The present study confirmed that cultured LECs secrete increased levels of SDF-1 as well as CCL21, a chemokine that is constitutively produced by the lymphatic endothelium.<sup>51</sup> Therefore, the CXCR4-SDF-1 axis might play a pivotal role in promoting the chemoattraction of tumor-associated SDF-1-secreting LECs toward CXCR4-positive Paget cells and their subsequent lymphatic invasion.

These results are in agreement with the recent discovery that lymphatic invasion by cutaneous malignant melanoma cells promotes sentinel LN metastasis and reduces patient survival.<sup>52-54</sup>

Our results also suggest that lymphatic invasion within primary tumors requires the functional activation of both tumor cells and LECs. Indeed, neuropilin-2 expression was induced by tumor-associated LECs in an experimental mouse model,<sup>55</sup> and neuropilin-2 was identified as a therapeutic target for the prevention of LN metastasis. Our present study confirmed that neuropilin-2 is induced in subpopulation of tumor-associated LECs within the primary site in EMPD. Furthermore, a novel gene profile has recently provided a specific gene expression pattern of tumor-associated LECs induced by VEGF-C in a mouse syngeneic tumor model.<sup>56</sup> Moreover, we and others<sup>7,40</sup> have generated vascular lineage-specific gene profiles of cultured human LECs that express high levels of SDF-1 transcripts, as compared with mRNA levels in blood vascular endothelial cells. Therefore, functional analyses of tumor-associated LECs might reveal additional targets for the prevention of lymphatic cancer metastasis.

We found that the subcapsular sinuses of regional LNs serve as a major source of SDF-1, which is probably required for the formation of a premetastatic niche since invasive Paget cells up-regulate CXCR4 expression that promotes efficient migration toward lymphatic vessels and metastasis to LNs. Whereas SDF-1 production by LNs has been identified in isolated human LN-derived mesenchymal cells,<sup>25,57</sup> the present findings reveal that both sinusoidal lymphatic endothelium and LN-resident macrophages represent a potent source of SDF-1. Furthermore, parenchymal invasion by tumor cells may begin with a specific contact to sinusoidal LECs in LNs. Therefore, CXCR4-positive Paget cells and SDF-1-expressing sinusoidal LECs likely promote the formation of tumor metastasis in regional LNs, although sinusoidal LECs may be fewer in number as compared with resident macrophages. Moreover, we found significant induction of new lymphatic vessel growth within regional LNs before tumor arrival in EMPD. These novel findings within LNs indicate that metastatic foci modulate structural and functional changes that encourage the formation of lymphovascular niches for the preferential initiation and progression of LN metastasis in patients with EMPD.

Stephan Paget proposed the "seed-and-soil" hypothesis over a century ago, indicating that inherent organ-specific characteristics are responsible for the preferential metastasis of distinct tumors to organs.<sup>58</sup> The present study found that CXCR4-positive Paget cells ("seed") can actively induce a SDF-1-rich tumor microenvironment, as well as lymphatic vessel growth in primary tumors and in draining LNs ("soil") to promote their metastatic spread. The molecular mechanisms that promote interactions between metastatic tumor cells and activated, tumor-associated lymphatic endothelium in primary tumors and draining LNs should be investigated in more detail for the prevention and treatment of human cancers.

## Acknowledgments

We thank Yukikazu Ukon, Teruko Tsuda, Mika Ikeda, Eriko Nishihara, Saori Watanabe, and Masachika Shudou for their expert technical assistance.

## References

- Van Trappen PO, Pepper MS: Lymphatic dissemination of tumour cells and the formation of micrometastases. *Lancet Oncol* 2002, 3:44–52
- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV: Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005, 438:946–953
- Oliver G, Detmar M: The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of lymphatic vascular system. *Genes Dev* 2002, 16:773–783
- Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D: Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997, 151:1141–1152
- Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG: LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999, 144:789–801
- Wigle JT, Oliver G: Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999, 98:769–778
- Petrova TV, Makinen T, Makela TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, Finegold DN, Kerjaschki D, Yla-Herttuala S, Alitalo K: Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J* 2002, 21:4593–4599
- Hong Y-K, Harvey N, Noh Y-H, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, Oliver G: Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 2002, 225:351–357
- Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkinen N, Alitalo K: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996, 15:1751
- Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA: Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4) *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:548–553
- Petrova TV, Bono P, Hointhoner W, Chesnes J, Pytowski B, Sihto H, Laakkonen P, Heikkila P, Joensuu H, Alitalo K: VEGFR-3 expression is restricted to blood and lymphatic vessels in solid tumors. *Cancer Cell* 2008, 13:554–556
- Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002, 196:1497–1506
- Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, Bohlen P, Senger DR, Detmar M: VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the  $\alpha_1\beta_1$  and  $\alpha_2\beta_1$  integrins. *FASEB J* 2004, 18:1111–1113
- Kunstfeld R, Hirakawa S, Hong YK, Schacht V, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Lin C, Fiebiger E, Wei X, Wu Y, Hicklin D, Bohlen P, Detmar M: VEGF-A plays a key role in the induction of chronic inflammation and the associated lymphangiogenic response. *Blood* 2004, 104:1048–1057
- Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS: Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001, 20:672–682
- Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M: Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001, 7:192–198
- Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG: VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001, 7:186–191
- Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M: VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 2005, 201:1089–1099
- He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K: Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94:819–825
- Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K, Alitalo K, Detmar M: VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 2007, 109:1010–1017
- Hirakawa S: From tumor lymphangiogenesis to lymphovascular niche. *Cancer Sci* 2009, 100(6):983–989.
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T: Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006, 25:977–988
- Chiang AC, Massague J: Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med* 2008, 359:2814–2823
- Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S: The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology* 2005, 20:349–356
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001, 410:50–56
- Burger JA, Kipps TJ: CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006, 107:1761–1767
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ: A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007, 11:69–82
- Rinderknecht M, Detmar M: Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *J Cell Physiol* 2008, 216:347–354
- Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, Jahnke K, Hauschild A, Hirakawa S, Mihm MC, Detmar M: Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol* 2005, 18:1232–1242
- Dadras SS, Paul T, Bertoni J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, Ellwanger U, Garbe C, Mihm MC, Detmar M: Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003, 162:1951–1960
- Cooper SM WF: Anogenital (Non-venereal) disease. Edited by Bologna JL, Rapini RP. Edinburgh, MOSBY Elsevier, 2008, pp. 1059–1073
- MacKie RM CE: Tumours of the skin appendages. Edited by Burns TBS, Cox N, Griffiths C. Malden, Blackwell Publishing, 2004, pp. 37.31–37.34
- Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:442–454
- Kang Y, Massague J: Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004, 118:277–279
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW: The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006, 172:973–981
- Klymkowsky MW, Savagner P: Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol* 2009, 174:1588–1593
- Gupta GP, Massague J: Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006, 127:679–695
- Moustakas A, Heldin CH: Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 2007, 98:1512–1520
- The Japanese Skin Cancer Society: Extramammary Paget's disease. General rules for clinical and pathological studies on malignant neoplasms of the skin. Edited by Saida T. Tokyo, Kanehara & Co. Ltd., 2002, pp. 58–71
- Hirakawa S, Hong YK, Harvey N, Schacht V, Matsuda K, Libermann T, Detmar M: Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 2003, 162:575–586
- Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, Tsutsumi S, Tomonari M, Taki M, Hosokawa H, Nagayama M: Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 2003, 22:891–898
- Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar

- M: Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005, 166:913–921
43. Kato Y, Kaneko MK, Kuno A, Uchiyama N, Amano K, Chiba Y, Hasegawa Y, Hirabayashi J, Narimatsu H, Mishima K, Osawa M: Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 349:1301–1307
  44. Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A: Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *Am J Pathol* 2007, 170:774–786
  45. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D: VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005, 438:820–827
  46. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M: MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002, 2:289–300
  47. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D: Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002, 161:947–956
  48. Kajiya K, Hirakawa S, Detmar M: Vascular endothelial growth factor-A mediates ultraviolet B-induced impairment of lymphatic vessel function. *Am J Pathol* 2006, 169:1496–1503
  49. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973, 51:1417–1423
  50. Taki M, Higashikawa K, Yoneda S, Ono S, Shigeishi H, Nagayama M, Kamata N: Up-regulation of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  and its receptor CXCR4 expression accompanied with epithelial-mesenchymal transition in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2008, 19:993–998
  51. Kriehuber E, Breiteneder GS, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, Stingl G, Kerjaschki D, Maurer D: Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med* 2001, 194:797–808
  52. Niakosari F, Kahn HJ, McCready D, Ghazarian D, Rotstein LE, Marks A, Kiss A, From L: Lymphatic invasion identified by monoclonal antibody D2-40, younger age, and ulceration: predictors of sentinel lymph node involvement in primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol* 2008, 144:462–467
  53. Xu X, Gimotty PA, Guerry D, Karakousis G, Van Belle P, Liang H, Montone K, Pasha T, Ming ME, Acs G, Feldman M, Barth S, Hammond R, Elenitsas R, Zhang PJ, Elder DE: Lymphatic invasion revealed by multispectral imaging is common in primary melanomas and associates with prognosis. *Hum Pathol* 2008, 39:901–909
  54. Doeden K, Ma Z, Narasimhan B, Swetter SM, Detmar M, Dadras SS: Lymphatic invasion in cutaneous melanoma is associated with sentinel lymph node metastasis. *J Cutan Pathol* 2009, 36:772–780
  55. Caunt M, Mak J, Liang WC, Stawicki S, Pan Q, Tong RK, Kowalski J, Ho C, Reslan HB, Ross J, Berry L, Kasman I, Zlot C, Cheng Z, Le Couter J, Filvaroff EH, Plowman G, Peale F, French D, Carano R, Koch AW, Wu Y, Watts RJ, Tessier-Lavigne M, Bagri A: Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* 2008, 13:331–342
  56. Clasper S, Royston D, Baban D, Cao Y, Ewers S, Butz S, Vestweber D, Jackson DG: A novel gene expression profile in lymphatics associated with tumor growth and nodal metastasis. *Cancer Res* 2008, 68:7293–7303
  57. Arai J, Yasukawa M, Yakushijin Y, Miyazaki T, Fujita S: Stromal cells in lymph nodes attract B-lymphoma cells via production of stromal cell-derived factor-1. *Eur J Haematol* 2000, 64:323–332
  58. Paget S: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889, 133:571–573

## 薬剤性過敏症症候群 (DIHS) の特徴的な顔面の所見と HHV-6 再活性化との 時間的關係

岡崎 秀規 藤山 幹子 村上 信司 石川真奈美  
佐藤 直樹 宮脇さおり 白石 研 橋本 公二

### 要 旨

2001年から2007年の間に当科で経験したDIHS症例のうち、DIHSの顔面の特徴的皮疹を示し、HHV-6の再活性化の時期を特定することのできた6例について、両者の時間的關係を検討した。6例全例で顔面の特徴的皮疹の出現がHHV-6再活性化に先行していることが確認された。

DIHSの顔面の特徴的皮疹は、DIHSの診断の手助けになるとともに、HHV-6の再活性化と、それによる症状の再燃を予測する重要な手がかりになると考えられた。

### はじめに

drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) は発熱、リンパ節腫脹、肝機能障害、血液異常を伴う重症薬疹の一型で、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) の再活性化と臨床症状の再燃が見られる。皮疹は紅斑丘疹型、多形紅斑型であるが、顔面にDIHSに特徴的とされる皮膚症状、すなわち顔面の紅斑、浮腫、口囲の紅色丘疹、膿疱、小水疱、鱗屑がみられることがある。今回我々はDIHSの顔面の特徴的皮疹とHHV-6再活性化の時間的關係を検討した。

### 症 例

2001年から2007年の間に当科で経験した血清中のHHV-6 DNAの検出、あるいは全血中のHHV-6の増加により、再活性化の時期がほぼ特定できるDIHS症例6例について検討した。以下、症例1の経過を詳細に、症例2~6については概略を述べる。

症例1：44歳、男性。

既往歴：自律神経失調症。

現病歴：平成16年6月16日よりテグレート<sup>®</sup>、コントミン<sup>®</sup>内服開始。7月10日頃より全身倦怠感、背部の紅斑が出現。7月15日頃より頭部、上肢に紅斑が拡大し、掻痒感をみとめた。7月18日には39℃の発熱があり、当院救急外来受診、同日当科入院となった。

内服歴として平成14年8月20日からパキシル<sup>®</sup>、デパス<sup>®</sup>、ランドセン<sup>®</sup>、ソラナックス<sup>®</sup>。平成14年10月1日からカマグ<sup>®</sup>、平成16年6月16日からテグレート<sup>®</sup>、コントミン<sup>®</sup> (コントミン<sup>®</sup>は頓服で処方されており、数回服用したのみ) であり、これらの薬剤の中でも1カ月前より内服開始していたテグレート<sup>®</sup>、コントミン<sup>®</sup>を原因として疑った。全薬剤は入院日7月18日より中止した。

入院時臨床像 (図1)：被髪頭部、顔面には紅斑、赤色丘疹が多発、癒合し、顔面、耳介には浮腫を認めた。眼周囲には紅斑を認めなかった。また鼻孔周囲、外耳道には軽度の紅斑を認めた。四肢体幹には毛孔一致性の丘疹が多発、癒合していた。眼球、眼瞼結膜は異常なく、口腔内では口蓋に2mm大の紅斑と、舌の側縁には直径2mm大の浅いアフタを認めた。また右後頸部リンパ節は腫脹していた。

臨床検査所見 (入院3日目)：末梢血；WBC 22,400/ $\mu$ l (stab 16.5%, seg 48.0%, lymph 5.5%, mono 4.5%, eosino 25.5%, baso 0.0%, atypical lymph 0.0%), RBC  $5.80 \times 10^3$ / $\mu$ l, Hb 16.9g/dl, Ht 50.4%, PLT  $25.5 \times 10^4$ / $\mu$ l。血液生化学；T.bil 0.5mg/dl, D.bil 0.1mg/dl, GOT 49IU/l, GPT 175IU/l,  $\gamma$ -GTP 490IU/l, LDH 577IU/l, ChE 143IU/l, ALP 466IU/l, LAP 125IU/l, AMY 83 IU/l, CRP 6.21mg/dl, TP 5.9g/dl, Alb 3.2g/dl, Glo 2.5g/dl, BUN 7mg/dl, Cre 0.7mg/dl, Na 140mEq/l, K 4.1mEq/l, Cl 103mEq/l, IgG 842mg/dl, IgA 132 mg/dl, IgM 21mg/dl, IgE 30IU/ml, T細胞分画；CD4 31%, CD8 42%。胸部X線と心電図に異常はみられな

愛媛大学大学院医学系研究科感覚皮膚医学 (主任：橋本公二教授)

平成21年2月12日受付、平成21年4月2日掲載決定  
別刷請求先：(〒791-0295)愛媛県東温市志津川 愛媛  
大学大学院医学系研究科感覚皮膚医学 岡崎 秀規



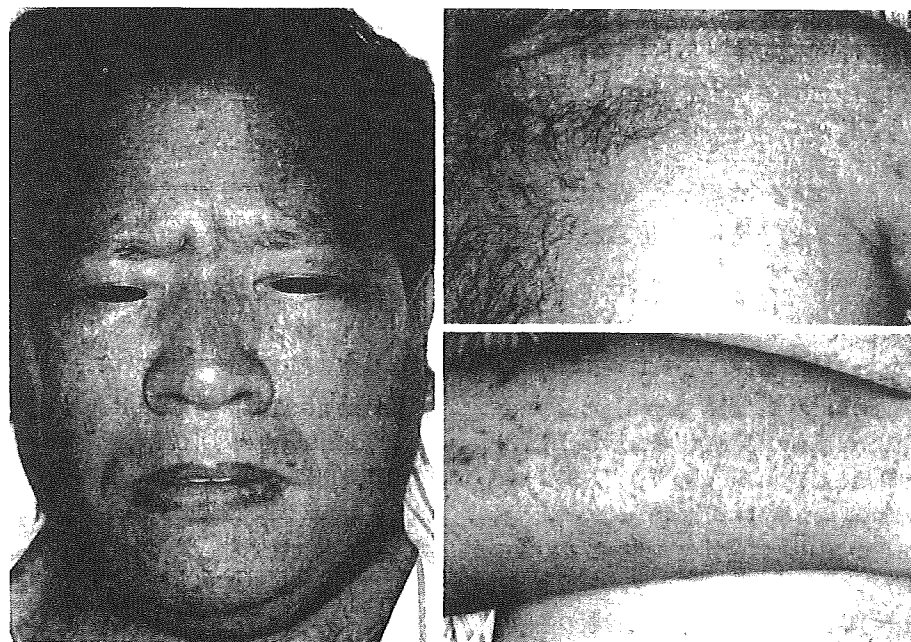


図1 初診時臨床像

頭部、口囲を含む顔面には赤色丘疹が多発、癒合し、顔面、耳介には浮腫を認めた。眼周囲には紅斑を認めなかった。四肢体幹には毛孔一致性の赤色丘疹が多発、癒合していた。

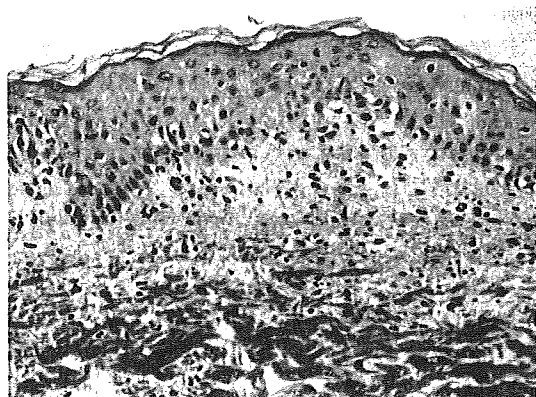


図2 病理組織像(強拡大)

表皮では液状変性、少数の個細胞壊死を、真皮上層ではリンパ球の浸潤を認めた。好酸球浸潤は認めなかった。

かった。

組織所見(図2)：背部の丘疹に対して皮膚生検を施行した。表皮角化細胞の少数の個細胞壊死と液状変性、真皮上層から中層にかけてのリンパ球の浸潤を認めた。組織学的には苔癬型組織反応であった。

経過(図3)：入院日(7月18日)からプレドニゾロン(PSL)40mg/日の内服を開始したが依然37~38℃台の発熱を認め、顔面、頸部の浮腫は徐々に増悪し、息苦しさ(SpO<sub>2</sub>98%)を訴えた(図4a)。耳鼻科受診したところ喉頭ファイバーの所見では喉頭左側に浮腫を認め、浮腫のさらなる増悪がみられれば気管切開も必要となるとのことであった。そこで21日よりPSLを80mg/日(0.8mg/kg)に増量したところ、解熱するとともに、顔面と頸部の浮腫、息苦しさ、全身の皮疹も徐々に軽快した(図4b)。しかし26日朝より39℃台の発熱と肝機能異常の増悪を認めた。血液中に多量のHHV-6 DNAが確認され、PSLを漸減した。発熱は2日間で解熱し、肝機能異常も28日をピークに正常化していった。このときに皮疹の明らかな再燃はなかったが、8月8日から手背、足背に赤色丘疹の新生を認めた。PSL内服は8月24日で中止し、皮疹は完全に消退した。全経過は約7週間であった。

ウイルス検査：HHV-6 DNA copy数は、血清中では7月23日から検出(3,300copies/ml)され、26日には240万copies/mlにまで増加した後、経過とともに低下した。HHV-6 IgG抗体価は7月26日までは80倍であっ

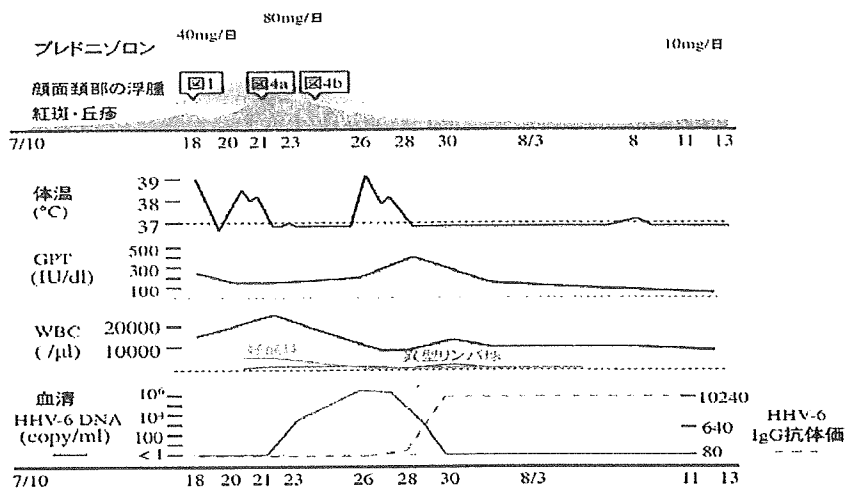


図3 臨床経過および血液所見の推移

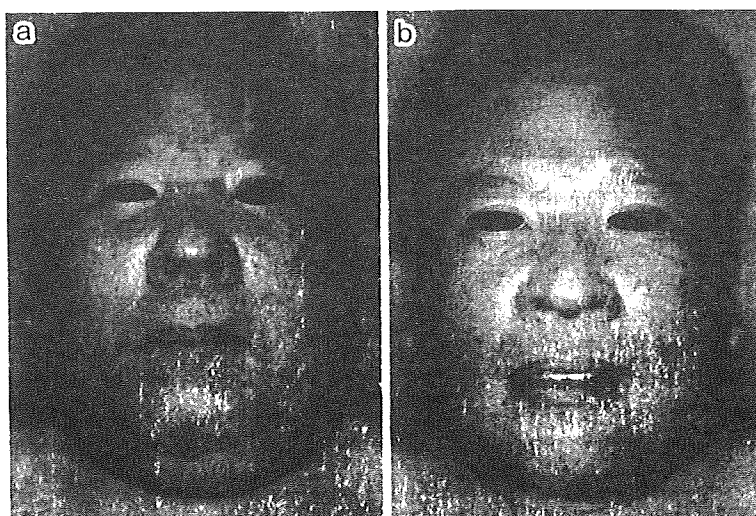


図4 顔面の臨床像

a: 7月21日(第12病日): 全身の皮疹, 顔面の浮腫が著明であった. 喉頭の浮腫のため軽度の呼吸困難を生じていた. 鼻孔には紅斑を認める. 口囲には赤色丘疹が多発し, 膿疱, 痂皮, 鱗屑の付着も認める.

b: 7月24日(第15病日): 解熱しており, 顔面の腫脹は軽快傾向. 全身の紅斑も褐色調を呈してきている. 口囲には多量の痂皮・鱗屑の付着を認める.

たが, 28日には320倍, 30日には10,240倍まで上昇した.

薬剤によるリンパ球刺激試験(DLST): 原因薬剤と考えられるテグレート<sup>®</sup>, コントミン<sup>®</sup>で施行した. 第11病日(7月20日)のDLSTではテグレート<sup>®</sup>,

コントミン<sup>®</sup>のstimulation index (S.I.) はそれぞれ139%, 134%と共に陰性であったが, 第48病日(8月26日)ではそれぞれ315%, 88%であり, テグレート<sup>®</sup>で陽性であった. これによりテグレート<sup>®</sup>が原因薬剤であると考えた.

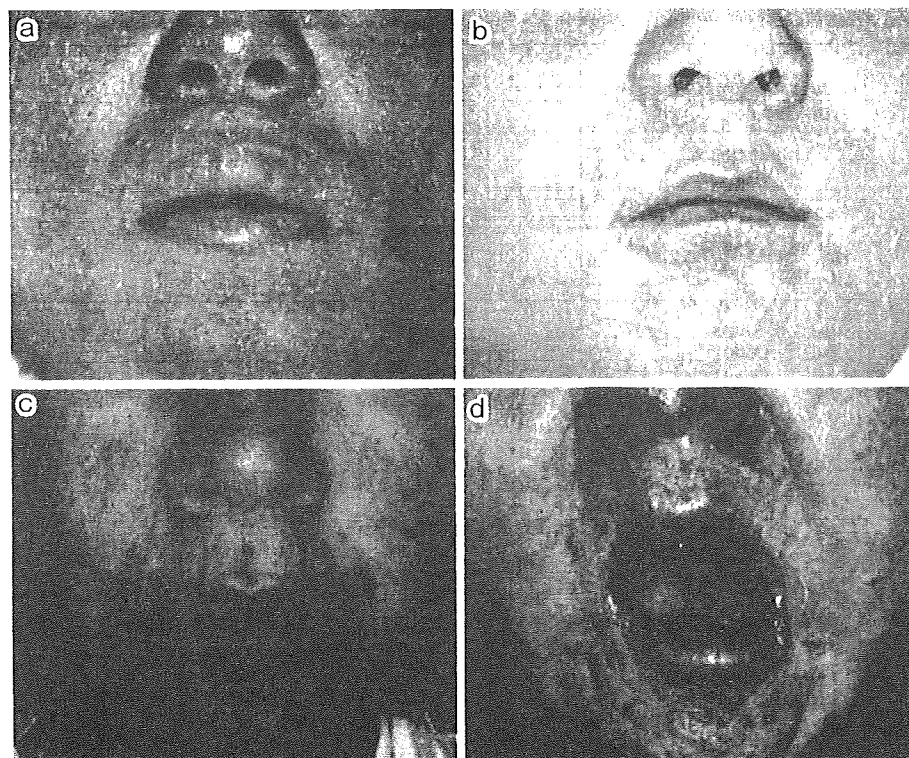


図5 DIHS4例の顔面の特徴的皮疹

程度は異なるものの、口囲の赤色丘疹、鱗屑、痂皮の付着、鼻孔の紅斑、顔面の浮腫を認める。

症例2: 33歳, 女性. エクセグラン®内服開始後15日経過して皮疹出現, その10日後にはフェノバル®内服に変更され皮疹は軽快したが, 薬剤変更後7日経過して皮疹, 発熱が出現. 臨床症状再燃後3日目(第4病日)に当科初診, 入院. 初診時には顔面, 頸部の強い浮腫と鼻孔周囲の紅斑, 口囲の少数の赤色丘疹(図5a)を認めていた(患者持参の第3病日の写真では, 口囲の皮疹は認めなかった). 第17病日にはじめて全血中にHHV-6DNAが出現した(200copies/ $\mu$ gDNA)が, 血清中には検出されず, 抗HHV-6 IgG抗体価の上昇は伴わなかった. また発熱や臓器障害の再燃はなく皮疹の軽度の再燃を認めたのみであった.

症例3: 12歳, 男性. テグレート®内服開始後23日目に発熱, 顔面の紅斑が出現. 第2病日の当科初診時には頬に淡い紅斑を認めるのみであったが, PSLの内服にも関わらず第8病日には口囲の紅色丘疹が確認された(図5b). その後臨床的, 血液学的に軽快傾向にあったが, 第12病日から肝障害が再燃し, 第15病

日からは39度台の発熱と皮疹が再燃した. 同日の全血中でHHV-6DNAの出現(4,500copies/ $\mu$ gDNA)が確認されたが, 血清中には検出されなかった.

症例4: 66歳, 男性. テグレート®内服開始後37日目に皮疹出現. 第11病日に当科初診, 入院. 第12病日には口囲の赤色丘疹が確認され第18病日に全血中にHHV-6DNA(380copies/ $\mu$ gDNA)が出現してきた. 第21病日には皮疹の再燃と肝機能異常の増悪を認め, 同日の血清, 全血中でHHV-6DNAが確認された.

症例5: 48歳, 女性. アレビアチン®内服開始後2年経過して発症. 発熱を自覚しその2日後より発疹が出現. 発疹は顔面からはじまり拡大した. 第16病日の当科初診時には顔面の特徴的皮疹を認め(図5c), 第20病日には全血中に1,200copies/ $\mu$ gDNAのHHV-6DNAが検出され, 第21病日には血清中にも検出された. 発症から続いていた発熱はHHV-6DNAが血清から消失するとともに解熱し, 血液学的に肝障害の再燃が認められた.

表 1 DIHS 症例の顔面の特徴的皮疹と HHV-6 再活性化のまとめ

症例	顔面の特徴的皮疹が確認された病日	HHV-6 再活性化を認めた病日
1	11	14 (血清)
2	4	17 (全血)
3	8	15 (全血)
4	12	18 (全血)
5	16 (初診日)	20 (全血)
6	12 (初診日)	19 (血清)

症例 6: 48 歳, 女性. カルバマゼピン®, フェノバル®内服開始から約 2 年経過して発症した. 第 12 病日の当科初診時には顔面の特徴的皮疹が認められた (図 5d). ステロイド剤の全身投与により解熱し, 全身状態も改善していたが, 第 19 病日には血清, 全血より HHV-6DNA (39,000copies/ml, 71,000copies/μgDNA) が検出された. 第 23 病日には発熱の再燃がみられ, 続いて皮疹の再燃が, 血液学的には肝障害の再燃が認められた.

症例 1 は, 顔面と頸部の浮腫が非常に強く呼吸苦を伴ったことが特異であった. 顔面では浮腫とともに鼻孔, 外耳道の紅斑, 口囲の赤色丘疹, 鱗屑, 痂皮の付着がみられており (図 4a), いわゆる DIHS に特徴的な顔面の所見と考えた. この顔面の特徴的な皮疹は 7 月 20 日 (第 11 病日) に確認されたが, その 3 日後 (第 14 病日) には血清中に HHV-6 DNA が検出された. つまり, 顔面浮腫と特徴的皮疹は, HHV-6 の再活性化に 3 日先行して認められたということになる.

症例 2~6 についても程度は異なるものの, 口囲の赤色丘疹, 鱗屑, 痂皮の付着, 鼻孔周囲の紅斑, 顔面の浮腫を認めた. 皮疹出現日を特定できた 3 例 (症例 2~4) では, いずれも特徴的皮疹出現後に HHV-6 の再活性化を認めており, その間の日数はそれぞれ 13, 7, 6 日であった. 症例 5, 6 においては, 初診時には既に顔面の特徴的皮疹が確認されていたが, その時点では血液中の HHV-6 DNA は検出されず, それぞれ 4, 7 日経過して HHV-6 の再活性化が確認された. 以上を表 1 にまとめた.

## 考 察

DIHS の特徴的な皮疹は, 厚生労働省研究班の診断基準の参考所見において「顔面の浮腫, 口囲の紅色丘疹, 膿疱, 小水疱, 鱗屑は特徴的である」と記載されている<sup>1)</sup>. この顔面の皮疹については以前より知られて

おり, 1996 年に Callot らの論文<sup>2)</sup>に顔面頸部の浮腫, 小水疱, 膿疱が Hypersensitivity Syndrome の顔面にみられる所見として記されている. また Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) の疾患概念が提唱されてからは, DRESS では顔面の浮腫と皮疹があることが特徴であると記載されている<sup>3, 4)</sup>. 以上のようにこの顔面の所見は国内外を問わず共通している.

初診時より顔面の特徴的皮疹を認めた症例 5, 6 についてはその 4, 7 日後に HHV-6 の再活性化を確認し, 症例 1~4 における特徴的皮疹の確認から, HHV-6 の増加を認めるまでの期間は 3, 13, 7, 6 日であった. 症例 2 は特徴的皮疹出現から HHV-6 再活性化までの期間が 13 日と最も長かった. この症例は HHV-6 抗体価の上昇を伴わず, また, HHV-6 再活性化による症状の再燃もみられなかったことより, 全血中の HHV-6 DNA の検討がなされていなければ非典型 DIHS の診断となる. この症例を除けば, 皮疹を確認した 1 週間前後で HHV-6 が再活性化している.

DIHS では, HHV-6 の再活性化に伴い, 臨床症状, 血液学的異常が再燃することがある. 最も多くみられるのは発熱と肝障害である<sup>5)</sup>. この症状の再燃は, 特別な治療を要さず軽快することが多い. 当科の 6 症例においては 5 例に肝障害の再燃が, 4 例に発熱の再燃がみられたが, いずれもステロイド薬を増量することなく, 数日で軽快した. しかし一度軽快したと思えたところに再燃する発熱や肝障害は, 本人や家族に不安を抱かせる. また, DIHS における HHV-6 の再活性化によると思われる脳炎・中枢神経障害<sup>6, 7)</sup>や劇症 1 型糖尿病<sup>8)</sup>のような重症の病態の発症も報告されている. 顔面の特徴的な皮疹を認めた時点で, 今後の見通しを説明することができれば, 再燃を生じたときの不安を軽減させることが可能である. また, 治療する側においても, HHV-6 の再活性化を予想することで, 重症な病態の発生にも注意を払うことが可能である.

以上のように, 我々は, DIHS における特徴的な顔面の皮疹の出現時期と HHV-6 の再活性化の時期をウイルス DNA の定量という方法を用いて詳細に検討することにより, 前者が後者に先行することを明らかにした.

顔面の皮疹の発症機序は現時点では不明であるが, 今回の HHV-6 の再活性化が血液中における HHV-6 の出現の確認, すなわち HHV-6 ウイルス血症, によると定義していることを考慮すると, 次のような可能性

が考えられる。HHV-6はどこかの組織でまず再活性化し、続いて血液中で活性化T細胞に感染し、全身のHHV-6再活性化にいたると想定されている。従って、薬剤アレルギーに続いて、まず顔面でHHV-6の再活性化がおき、血液中に拡大するということが考えられる。この仮説は、特徴的な顔面の皮疹がHHV-6の再活性化に先行する時間的關係を説明するには極めて魅力的なものである。しかし、顔面の皮疹とHHV-6の再活性化が全く関係ない可能性も否定できない。DIHSで見られるような顔面の浮腫は臨床的に acute generalized exanthematous pustulosis や Stevens-Johnson syndrome などの重症型薬疹などでもみとめられるこ

とがあり、鼻翼周囲や口囲の皮疹は軽度の場合には脂漏性皮膚炎に類似している。しかしこれらの疾患では一般的にHHV-6の再活性化は検出されない。またHHV-6の再活性化がよく経験される Graft-versus-host disease において DIHS でみられるような顔面の皮疹の出現を認めるといった報告もない。DIHSの顔面の皮疹とHHV-6の再活性化の関連性を明らかにするためには、今後の症例の集積が必要である。

謝辞：本論文は厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）の援助を受けた。

#### 文 献

- 1) 橋本公二：Stevens-Johnson 症候群，toxic epidermal necrosis (TEN) と hypersensitivity syndrome の診断基準および治療指針の研究，厚生科学特別研究事業 平成 17 年度総括研究報告，2005。
- 2) Callot V, Roujeau JC, Bagot M, et al: Drug-induced pseudolymphoma and hypersensitivity syndrome, *Arch Dermatol*, **132**: 1315-1321, 1996.
- 3) Revuz J, Valeyrie-Allanore L: Drug Reactions with Eosinophilia and systemic symptoms: Hypersensitivity Syndrome, In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP (eds): *Dermatology*, 2nd Ed, Mosby Elsevier, Amsterdam, 2008, 310-311.
- 4) Descamps V, Valance A, Edlinger C, et al: Association of human herpesvirus 6 infection with drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms, *Arch Dermatol*, **137**: 301-304, 2001.
- 5) Tohyama M, Hashimoto K, Yasukawa M, et al: Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome, *Br J Dermatol*, **157**: 934-940, 2007.
- 6) Masaki T, Fukunaga A, Tohyama M, et al: Human herpes virus 6 encephalitis in allopurinol-induced hypersensitivity syndrome, *Acta Derm Venereol*, **83**: 128-131, 2003.
- 7) Fujino Y, Nakajima M, Inoue H, et al: Human herpesvirus 6 encephalitis associated with hypersensitivity syndrome, *Ann Neurol*, **51**: 771-774, 2002.
- 8) Sekine N, Motokura T, Oki T, et al: Rapid loss of insulin secretion in a patient with fulminant type 1 diabetes mellitus and carbamazepine hypersensitivity syndrome, *JAMA*, **285**: 1153-1154, 2001.

**The Relationship between the Appearance of the Characteristic Skin Eruption and HHV-6  
Reactivation in Drug-induced Hypersensitivity Syndrome (DIHS)**

Hidenori Okazaki, Mikiko Tohyama, Shinji Murakami, Manami Ishikawa,  
Naoki Satoh, Saori Miyawaki, Ken Shiraishi and Koji Hashimoto  
Department of Dermatology, Ehime University Graduate School of Medicine

(Received February 12, 2009; accepted for publication April 2, 2009)

We studied the relationship between the appearance of the characteristic skin eruption and HHV-6 reactivation in DIHS. Six patients with DIHS, who were treated in Ehime University Hospital from 2001 to 2007, exhibited the characteristic skin eruption pattern that included erythema and edema in the face and perioral red papules, pustules, vesicles and scales. HHV-6 reactivation was observed in all six patients. The exact date of HHV-6 reactivation was confirmed by quantitative real-time polymerase chain reaction assay of serial serum or whole blood samples. In all DIHS six patients, the characteristic skin eruptions in the face always preceded HHV-6 reactivation. This is the first time that this characteristic sequential response has been elucidated.

(*Jpn J Dermatol* 119: 2187~2193, 2009)

**Key words:** drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS), facial characteristic skin eruption, HHV-6 reactivation

---

## 大量ガンマグロブリン静注療法が奏効した難治性尋常性天疱瘡の1例

愛媛大学大学院医学系研究科感覚皮膚医学(主任：橋本公二教授)

石川真奈美・白方裕司・村上信司・藤山幹子  
谷本圭子・浦部由佳里・佐藤直樹・宮脇さおり  
岡崎秀規・平川聡史・徳丸 晶・花川 靖  
佐山浩二・橋本公二

症例は46歳、女性、2007年10月頃より口唇、舌、外陰部にびらんが出現し、口腔内、頭部、顔面、体幹にも水疱・びらんが新生するため、2008年5月尋常性天疱瘡の疑いで当科入院した。水疱の組織所見は、H-E染色では基底層を1層残した表皮内水疱を認め、水疱内に棘融解細胞を認めた。蛍光抗体直接法では表皮細胞間にIgG、C3の沈着を認めた。ELISA法にて抗Dsg1抗体86.5、抗Dsg3抗体987で、天疱瘡の重症度判定基準スコア7点であったが、摂食障害を認めたため重症と診断した。プレドニゾン(PSL)50mg/日内服にても病勢を止められず、PSL80mg/日内服に増量、シクロスポリン内服、二重濾過血漿交換療法、ステロイドパルス療法も併用し、PSL90mg/日まで増量したが上皮化が進まず、2008年7月下旬より400mg/kg/日の大量ガンマグロブリン静注療法を5日間施行したところ、抗体価の低下と共に急速に皮疹は改善した。

### はじめに

尋常性天疱瘡の治療は、副腎皮質ステロイド内服が原則で、ステロイドパルス療法、免疫抑制剤内服、血漿交換療法などが併用療法として推奨されているが<sup>1)~5)</sup>、海外では以前より難治例に大量ガンマグロブリン静注療法が試みられ、その有効性が症例報告されている<sup>6)~17)</sup>。今回、難治性の粘膜皮膚型尋常性天疱瘡患者に対し、大量ガンマグロブリン静注療法を施行し、著明な改善を認めた症例を経験したので報告する。

### 症 例

症例：46歳、女性

初診：2008年5月上旬

主訴：下肢を除くほぼ全身の紅斑・水疱・びらん、口腔粘膜、外陰部粘膜のびらん・潰瘍

家族歴・既往歴：特記すべきことなし

現病歴：2007年10月頃より口唇粘膜に、12月には外陰部にびらんが出現した。2008年1月より、びらんが潰瘍化したため、近医歯科口腔外科、内科を受診したが軽快傾向なく、2月には嚥下が困難となったため、近医耳鼻科を受診しプレドニゾン(PSL)30mg/日内服開始され、翌日当院内科へ紹介された。ベーチェット病の疑いでPSLは増減され、口腔内のびらんは軽快傾向であったが、4月には頭部、顔面、体幹にもびらん・水疱が出現し、増悪したため5月上旬に当科を紹介され受診した。尋常性天疱瘡の疑いで1週間後に入院となった。

初診時現症：口唇、口腔内、外陰部にびらん、潰瘍が存在。頭部、顔面、体幹、上肢に径2~20mmのびらんを認め、一部では水疱を形成していた(図1)。Nikolsky現象は認めなかった。

臨床検査所見：末梢血、生化学検査では軽度の貧血と、

LDH、総コレステロールの軽度上昇を認めた。

病理組織学的所見：背部の小水疱から生検した。H-E染色では、基底層を1層残した表皮内水疱を認め、内部では棘融解細胞を認めた(図2a)。蛍光抗体直接法では表皮細胞間にIgG、C3の沈着を認めた(図2b, c)。

治療および経過：皮膚に多発する破れやすい弛緩性水疱、水疱に続発する難治性のびらん、可視粘膜部の非感染性びらんに加え、ELISA法にて血清中の抗Dsg3抗体価987、抗Dsg1抗体価86.5であり、病理組織学的所見をあわせて粘膜皮膚型の尋常性天疱瘡と診断した。入院時の重症度スコアは7点であったが、摂食障害を認めたため重症と判断した。内科にてPSL20mg/日内服中であったが、水疱の新生は3個/日程度認められたため、入院4日目よりPSL50mg/日(0.86mg/kg/日)内服とした。外用はデルモベート<sup>®</sup>軟膏を用いた。しかし、抗Dsg3抗体価は上昇傾向で、5個/日程度の水疱新生を認めたため、入院20日目からPSL80mg/日(1.38mg/kg/日)内服に増量した。その後抗Dsg3抗体価は400台まで低下し、30日目からは水疱新生も認めなくなったため、34日目からPSL60mg/日(1.03mg/kg/日)内服に減量した。しかしその翌日から再び水疱が新生したため入院39、40日目に二重濾過膜血漿交換療法(DFPP)を施行した。その後も5個/日前後水疱新生があり、抗Dsg3抗体も低下せず、びらんも上皮化傾向を示さないため、入院47日目からシクロスポリン180mg/日(3.1mg/kg/日)内服併用を開始したが、頭部顔面、体幹の水疱新生は止まらなかった。再度入院60、61日目にDFPPを行い、引き続いて62日目より3日間メチルプレドニゾン1g/日のパルス療法を行った。しかし顔面のびらんは拡大し、頭部体幹のびらんも上皮化しなかった。入院65日目よりPSL90mg/日(1.55mg/kg/日)内服に増量し、顔面のびらんは若干上皮化傾向を認めたが、頭部体幹のびらんは上皮化傾向なく、時に1個程度

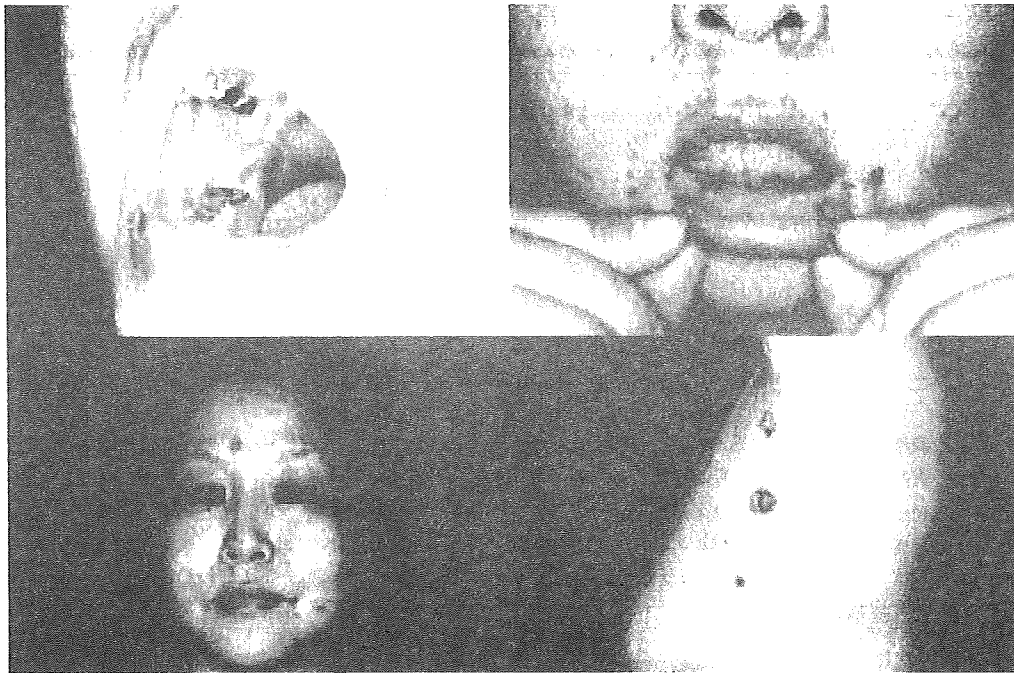


図1 初診時臨床像  
口唇, 口腔内に小水疱, びらんが存在し, 顔面, 体幹にも径数 cm までのびらん・水疱を認める

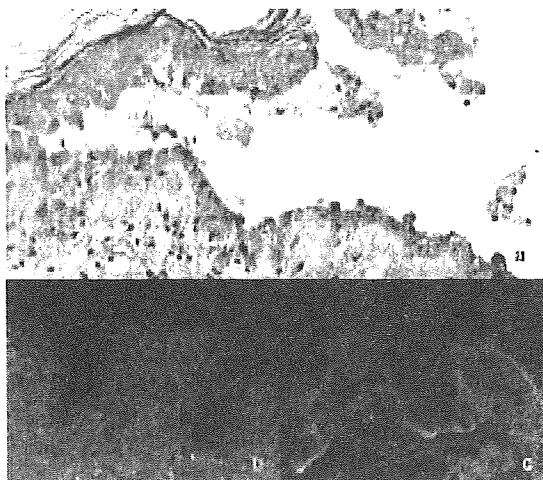


図2 背部の小水疱の組織所見  
a: 基底層を1層残した表皮内水疱を認め, 内部では棘融解細胞を認める(H-E染色,  $\times 400$ )  
b: 蛍光抗体直接法 IgG  
c: 蛍光抗体直接法 C3

の水疱新生が続いた。抗 Dsg3 抗体価は上昇傾向であったため, 入院 77 日目から 81 日目にかけて大量ガンマグロブリン静注療法を施行した(献血グロベニン<sup>®</sup>-I-ニチヤク 400 mg/kg/日 $\times$ 5 日間)。入院 79 日目より頭部のびらんの上皮化が始まり, 81 日目には顔面も大部分上皮化した(図 3 a, b)。入院 85 日目より前胸部のびらんも上皮化が始まった。入院 87 日目には後頭部髪際部に少数びらんを残すも, 頭部顔面はほぼ上皮化した。入院 92 日目には11

腔内の潰瘍は消失し, 背部のびらんも上皮化傾向となった。抗 Dsg3 抗体価も徐々に低下し, 入院 96 日目より PSL の減量を行い 139 日目には PSL 40 mg/日 (0.69 mg/kg/日) に減量できた(図 4)。

### か ん が え

大量ガンマグロブリン静注療法は, 本邦では血小板減少性紫斑病, ギランバレー症候群, 川崎病, 慢性炎症性脱髄性多発根神経炎, 多巣性運動ニューロパチーで保険適用の治療として行われている<sup>18)19)</sup>。一方これらの適用疾患以外で自己免疫性疾患に対する有効性が主に症例報告でなされており, 皮膚科領域では多発性筋炎・皮膚筋炎, 全身性エリテマトーデスに対する有効性の報告がみられる<sup>20)21)</sup>。尋常性天疱瘡の治療は, ステロイド全身投与が基本で, 補助療法として血漿交換療法, 免疫抑制剤などがあるが<sup>1)~5)</sup>, 近年大量ガンマグロブリン静注療法の有用性が海外で多く報告されてきた<sup>6)~17)</sup>。ほとんどの報告が有効であるとしているが, エビデンスレベルが低く, 症例数も少ないものであった。本邦における報告はわずかであり<sup>22)</sup>, その理由としては薬剤費が高額で, 保険適用でなかったため容易には施行できない経済的な問題があったためである。本症例においては大学病院が医療費を負担することで大量ガンマグロブリン静注療法を行うことができた。本邦では, 2004 年から 2006 年に全国でステロイド抵抗性の天疱瘡患者に対して, 大量ガンマグロブリン静注療法の有効性に関して臨床試験が施行された<sup>23)</sup>。ガンマグロブリン 400 mg/kg/日 $\times$ 5 日間投与群 21 例, 200 mg/kg/日 $\times$ 5 日間投与群 20 例, プラセボ(生理食塩液) $\times$ 5 日間投与群 20 例での二重盲験試験が行われ, 400





図3 大量ガンマグロブリン静注療法前後の臨床像  
 a: 大量ガンマグロブリン静注療法前(入院73日目)  
 b: 大量ガンマグロブリン静注療法後(入院81日目)。73日目(前)に比べ81日目(後)には顔面も急速に上皮化が進んでいる

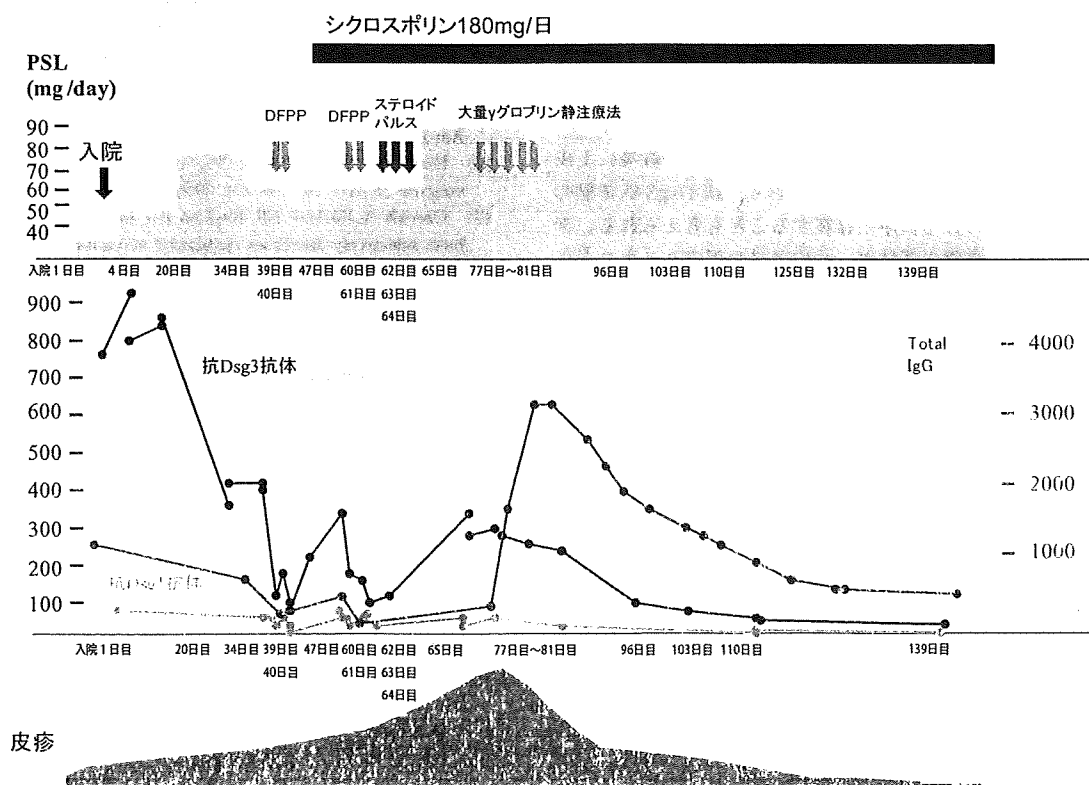


図4 治療と経過

mg/kg/日×5日間投与群が、プラセボ投与群に比較しプロトコール・オフまでの日数が有意に長く、大量ガンマグロブリン静注療法の有効性が確認された。(プロトコール・オフとは臨床症状の不変または悪化によりステロイド剤の増量、種類の変更、または他の追加治療を実施せざる

を得ないと判断した日時である。)このような臨床試験の結果をもとに、2008年10月より、献血グロベニン<sup>®</sup>-I-ニチヤク 400 mg/kg/日×5日間が尋常性天疱瘡に対して保険適用になった。従来の治療に抵抗性の尋常性天疱瘡の患者に効果的で、安全な治療法と考えられる。

本症例は、長期大量ステロイド内服、血漿交換療法、シクロスポリン内服療法、ステロイドパルス療法を行い、PSL 90 mg/日に増量しても皮疹は軽快せず、抗 Dsg3 抗体価も低下しない、非常に難治な症例であった。しかし、大量ガンマグロブリン静注療法開始後、数日で皮疹の改善が見られた。ガンマグロブリン投与中に 37.6 度の発熱を 1 日認めしたが、特に治療せず軽快した。その後抗 Dsg3 抗体価も徐々に低下したため、大量ガンマグロブリン静注療法が奏効したと考えた。

また、本症例は極めて抗体産生が強いため、DFPP 後にシクロスポリン内服療法、ステロイドパルス療法、PSL 90 mg/日内服を併用せざるを得なかった。しかし DFPP 後の低ガンマグロブリン血症時に、強い免疫抑制療法を加えるのは、日和見感染のリスクが高まるため、そのリスクを少しでも下げる意味においても大量ガンマグロブリン静注療法は選択肢として有用であると考えられる。さらに Aoyama ら<sup>22)</sup> が報告しているように、DFPP 後のリバウンド対策としても大量ガンマグロブリン静注療法は有用な治療法であると考えた。

大量ガンマグロブリン静注療法のメカニズムは、さまざまな仮説が言われているがいまだ不明である。大量にガンマグロブリンを投与することによって、ガンマグロブリンの異化が亢進し、抗 Dsg3 抗体も分解されるという考えもある<sup>10)</sup>。本症例も、総 IgG 量の低下とともに、すみやかに抗 Dsg3 抗体価も低下した。しかし、本症例のもう一つの特徴として、大量ガンマグロブリン静注療法直後に上皮化などの明らかな改善がみられており、抗 Dsg3 抗体価の減少とは別個の作用機序が存在することも考えられる。今後さらなる症例の蓄積が、治療効果の判定やメカニズムの解明において必要であろう。

本論文の要旨の一部は第 30 回水疱症研究会(2008 年 10 月, 東京), 第 49 回愛媛地方会(2009 年 3 月 1 日, 愛媛), 第 108 回日本皮膚科学会総会(2009 年 4 月, 福岡市)において報告した。

## 文 献

- 1) Stanley JR, Amagai M: Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *New Engl J Med* 355: 1800-1810, 2006.
- 2) Harman KE, Albert S, Black MM: Guidelines for the management of pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 149: 926-937, 2003.
- 3) Ikeda S et al: History of the establishment and revision of diagnostic criteria, severity index and therapeutic guidelines for pemphigus in Japan. *Arch Dermatol Res* 295: S12-S16, 2003.
- 4) Chams-Davatchi C et al: Randomized controlled open-label trial of four treatment regimens for pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 57: 622-628, 2007.
- 5) Hashimoto T: Treatment strategies for pemphigus vulgaris in Japan: expert opin. *Pharmacother* 9: 1519-1530, 2008.
- 6) Tappeiner G, Steiner A: High-dosage intravenous gamma globulin: Therapeutic failure in pemphigus and pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 20: 684-685, 1989.
- 7) Segura S et al: High-dose intravenous immunoglobulins for the treatment of autoimmune mucocutaneous blistering diseases: Evaluation of its use in 19 cases. *J Am Acad Dermatol* 56: 960-967, 2007.
- 8) Ahmed AR et al: Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin. *New Engl J Med* 355: 1772-1779, 2006.
- 9) Sami N et al: Corticosteroid-sparing effect of intravenous immunoglobulin therapy in patients with pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 138: 1158-1162, 2002.
- 10) Bystryn JC, Jiao D, Natow S: Treatment of pemphigus with intravenous immunoglobulin. *J Am Acad Dermatol* 47: 358-363, 2002.
- 11) Ahmed AR: Intravenous immunoglobulin therapy in the treatment of patients with pemphigus vulgaris unresponsive to conventional immunosuppressive treatment. *J Am Acad Dermatol* 45: 679-690, 2001.
- 12) Ahmed AR, Dahl MV: Consensus statement on the use of intravenous immunoglobulin therapy in the treatment of autoimmune mucocutaneous blistering diseases. *Arch Dermatol* 139: 1051-1059, 2003.
- 13) Beckers RC et al: Adjuvant high-dose intravenous gammaglobulin in the treatment of pemphigus and bullous pemphigoid: experience in six patients. *Br J Dermatol* 133: 289-293, 1995.
- 14) Harman KE, Black MM: High-dose intravenous immune globulin for the treatment of autoimmune blistering diseases: an evaluation of its use in 14 cases. *Br J Dermatol* 140: 865-874, 1999.
- 15) Mignogna MD et al: Adjuvant high-dose intravenous immunoglobulin therapy can be easily and safely introduced as an alternative treatment in patients with severe pemphigus vulgaris. *Am J Clin Dermatol* 9: 323-331, 2008.
- 16) Baum S et al: The role of IVIg treatment in severe pemphigus vulgaris. *JEADV* 20: 548-552, 2006.
- 17) Czernik A, Beutner EH, Bystryn JC: Intravenous immunoglobulin selectively decreases circulating autoantibodies in pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 58: 796-801, 2008.
- 18) 木村 淳: CIDP, MMN に対する献血グロベニン-I-ニチヤクの使用成績調査結果. *診療と新薬* 40: 297-316, 2003.
- 19) 日本製薬株式会社: 川崎病における献血グロベニン-I-ニチヤクの使用成績調査結果. *診療と新薬* 44: 845-870, 2007.
- 20) Saito E et al: Efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin therapy in Japanese patients with steroid-resistant polymyositis and dermatomyositis. *Mod Rheumatol* 18: 34-44, 2008.
- 21) Zandman-Goddard G, Levy Y, Shoenfeld Y: Intravenous immunoglobulin therapy and systemic lupus erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol* 29: 219-228, 2005.
- 22) Aoyama Y et al: Severe pemphigus vulgaris: successful combination therapy of plasmapheresis followed by intravenous high-dose immunoglobulin to prevent rebound increase in pathogenic IgG. *Eur J Dermatol* 18: 557-560, 2008.
- 23) Amagai M et al: A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* (J Am Acad Dermatol 60: 595-603, 2009.) (2009 年 3 月 17 日 受付・2009 年 5 月 14 日 採用決定)

別刷請求先: 〒791-0295 東温市志津川  
愛媛大学大学院医学系研究科  
感覚皮膚医学  
石川真奈美

## Successful Treatment of Severe Intractable Pemphigus Vulgaris with High-dose Intravenous Immunoglobulin

Manami ISHIKAWA, Yuji SHIRAKATA, Shinji MURAKAMI, Mikiko TOHYAMA,  
Keiko TANIMOTO, Yukari URABE, Naoki SATO, Saori MIYAWAKI,  
Hidenori OKAZAKI, Satoshi HIRAKAWA, Sho TOKUMARU, Yasushi HANAKAWA,  
Koji SAYAMA and Koji HASHIMOTO

Department of Dermatology, Ehime University Graduate School of Medicine  
Toon 791-0295, Japan (Director : Prof. K. Hashimoto)

We report a case of a 46-year-old Japanese female with severe pemphigus vulgaris successfully treated with high-dose intravenous immunoglobulin. Oral high-dose corticosteroids and double-filtration plasmapheresis (DFPP) was unsuccessful in suppressing her disease activity. Addition of cyclosporine and DFPP, immediately followed by pulse therapy with intravenous (IV) methylprednisolone (1,000 mg/day for 3 days), was only partially successful. We decided to use intravenous immunoglobulin (IVIg; 400 mg/kg/day for 5 days). After IVIg therapy, erosions began to heal rapidly, and the bullae completely disappeared, along with a decrease in anti-Dsg3 antibody titer.

---

## Repeated episodes of fixed eruption 3 months after discontinuing pegylated interferon- $\alpha$ -2b plus ribavirin combination therapy in a patient with chronic hepatitis C virus infection

M. Sato, H. Sueki and M. Iijima\*

Division of Dermatology, Showa University Fujigaoka Hospital, Yokohama, Japan; and \*Department of Dermatology, Showa University School of Medicine, Tokyo, Japan

doi:10.1111/j.1365-2230.2009.03560.x

### Summary

We report a 73-year-old man who developed repeated episodes of erythematous, bullous plaques beginning 3 months after discontinuation of combination treatment with pegylated interferon (IFN)- $\alpha$ -2b and ribavirin for hepatitis C virus infection. The first episode resolved within a week without treatment, but the lesions recurred about once a month and were associated with high fever. Physical examination found darkly reddish, pigeon-egg-sized erythematous plaques with occasional flaccid blisters, predominantly on the trunk and proximal limbs, lip and penis. Histological examination showed well-demarcated foci of full-thickness epidermal necrosis and exocytosis of lymphoid cells. Pegylated IFN- $\alpha$ 2b and ribavirin produced no response in lymphocyte stimulation tests. Systemic prednisolone led to rapid healing of skin lesions at the time of the fifth episode, leaving pigmented macules, but lesions recurred at the same sites within weeks of discontinuation of this treatment. It is uncertain whether this case represented a prolonged drug rash provoked by pegylated IFN- $\alpha$ 2b or a fixed eruption in response to another antigen.

A combination of pegylated interferon IFN- $\alpha$ 2b and ribavirin is currently recommended for the treatment of chronic hepatitis C virus (HCV) infection, because it yields a better therapeutic response than either drug as monotherapy.<sup>1</sup> However, a high prevalence of adverse skin reactions to this combination, including eczema, prurigo, lichenoid eruption, maculopapular rash, injection-site reactions, and worsening of psoriasis, has been reported.<sup>2,3</sup> Some cases have shown a delay between implementation of this treatment and the occurrence of adverse skin reactions.<sup>4</sup> We report a patient with repeated episodes of fixed eruption 3 months after discontinuing this combination treatment.

### Report

A 73-year-old man presented with a fever and multiple pruritic bullous-erythematous plaques on the trunk and proximal limbs. The patient had a history of HCV infection, and had been receiving amulodipine besilate, doxazosin mesilate, clonidine hydrochloride and ursodesoxycholic acid for several years. Combination treatment with pegylated IFN- $\alpha$ 2b and ribavirin for the HCV infection was started in February 2006, but this was discontinued on July 25, 2006, because of worsening transaminase levels. Injection sites were limited to both upper arms, and appreciable injection-site reactions, consisting of redness and swelling with pruritus, were noted during the treatment. In mid October 2006, round pruritic erythematous plaques initially developed on the bilateral femoral areas, distant from injection sites, without further medication or supplements. The skin lesions resolved within a week. These episodes recurred about once every month. The quantity of HCV RNA significantly increased just before

Correspondence: Dr Hirohiko Sueki, 1-30, Fujigaoka, Aoba-ku, Yokohama 227-8501, Japan  
E-mail: hirsueki@med.showa-u.ac.jp

Conflict of interest: none declared.

Accepted for publication 6 March 2009