

Table 2 : Clinical differences between measles and drug eruption

	Measles	Drug eruption
Incidence after exposure	100%	Less than 5%
Prodromal duration	9 to 12 days	7 to 14 days
Clinical manifestation of skin	MPE Purpura	MPE SJS/TEN Fixed drug eruption Eczema type Purpura Photosensitivity
Specific findings	Koplik macule	None
Fever	+	+/-
Lymphadenopathy	+	+/-
Extracutaneous involvements	Liver/Lung	Liver, sometimes
Outcome	Spontaneous recovery	Spontaneous recovery after cessation of drug, needs steroids occasionally

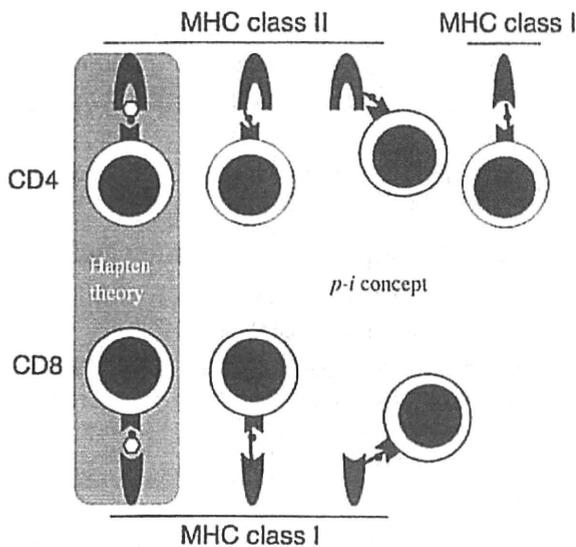


Fig. 6 : Hapten theory and p-i concept. Haptenized antigens settled in the MHC groove on APCs were recognized by CD4 + and CD8 + T cells (left). On the other hand, the groove of MHC in APCs did not serve as a conjugating site of drug for these cells, and promiscuous interaction between MHC and T cells promotes T-cell activation in the presence of drug in the p-i concept (right).

る場合があるということを示している。Pichler らは薬剤がある T 細胞受容体に特異的に親和性をもつことが、薬剤アレルギー機構に重要だとし、pharmacological interaction concept (*p-i* concept) を提唱した (Fig. 6 右)<sup>8)</sup>。彼らの説によると、薬疹の機序として①薬剤がハプテンとなってハプテン化抗原を生じる場合、② T 細胞に発現する受容体に薬剤が親和性を持つ場合 (*p-i* concept) とに分けられる。①については、感作の成立が前提であるが、②は薬剤抗原の感作は不要で、抗原エピトープの提示に関係なく、メモリー T 細胞がもつ T 細胞受容体と薬剤および MHC との間に結合力が生じることにより、T 細胞が無作為に活性化するもので、われわれの検討で明らかとなった MHC 非拘束性の T 細胞活性化に相当する。

薬疹とウイルス発疹

ウイルス感染で典型的皮疹を特徴とする麻疹と薬疹とを比較してみるとその類似点と相違点が明らかになる (Table 2)。麻疹は感染機会から通常 2 週間程度の潜伏期を経て発症する。皮疹は定型的で、紅斑および丘疹、時に紫斑を混じ、癒合傾向をもって全身に播種状に散布し、口腔には診断的価値のあるコプリック斑という粘膜疹がみられる。発熱ととも

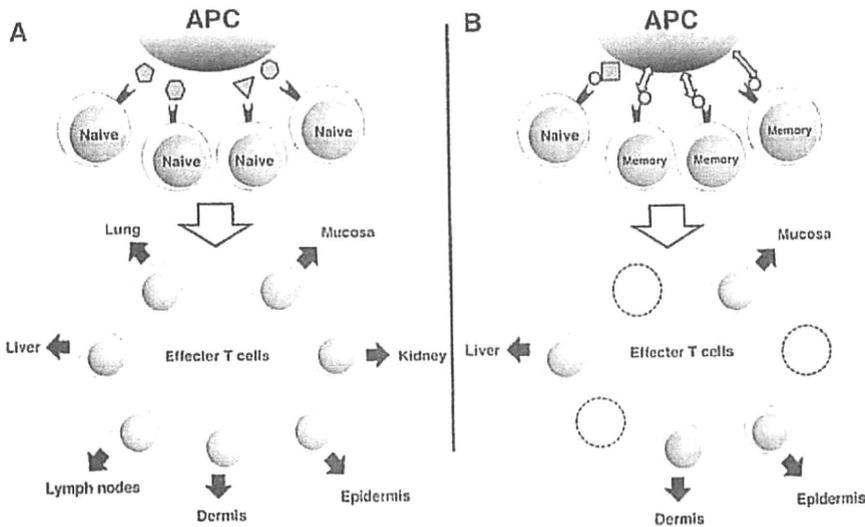


Fig. 7 : Possible explanation for similarity between viral eruptions and drug-induced eruptions.

にリンパ節腫大、咳症状があり、成人の場合の多くは肝機能障害を伴う。麻疹は特に感染力が強く、感染すればほとんどが発症する。一方、薬疹の出現頻度は、0.01%以下のものから5%以上起こすものもあり、薬剤によって大きく異なるが、麻疹などのウイルス感染症と比べて著しく頻度は低い。薬疹は、投与されて7~14日間の感作時期が必要となる場合が多い。その後皮疹が出現するが、圧倒的に多いのが紅斑丘疹型（MPE）であり、他には多形紅斑型、紅皮症型、日光過敏型、重症例ではSJSやTENなど個々によりさまざまな臨床型を呈する。リンパ節腫大、発熱や肝機能障害など、皮膚外症状を伴う例は重症例に多いが、通常は顕著でない。

ウイルス発疹と薬疹とは、臨床症状の類似点から、鑑別に苦慮することが多い。翻ってみると、両者においては炎症反応そのものが類似していると考えられる。感染ウイルスの進展は、個体差に依存せず、ある程度パターン化され、それに対する炎症症状も一定の傾向は存在するはずであり、臨床症状も画一的である。しかしながら、薬疹は個々においてその臨床像は多様である点で対比的である。そう考えると、薬疹は一見ウイルスとは無関係であるが、部分的にウイルス感染をまねた炎症反応ではないかという仮説に至る。

#### T細胞の記憶と薬疹

通常、ナイーブT細胞は抗原感作を受けた後メモリー細胞となり、再度抗原を提示されて活性化した

とき、エフェクター細胞として機能する。これまでの考え方では、薬剤ハプテン化抗原によって感作されたT細胞のみが、薬剤によって活性化する。薬疹の多くは、全身の皮膚に活性化したT細胞がリクルートするから、ある程度の数のT細胞の活性化が必要と考えられるが、薬剤のハプテン化抗原反応によって、一度に多くのT細胞を爆発的に活性化することを想像することはむずかしい。一方、*p-i* conceptに基づく反応はかなり曖昧（promiscuous）な反応であるために、ある条件下では、かなり多くのT細胞を一斉に活性化することができる。たとえば、あるウイルス抗原に感作されたメモリーT細胞のT細胞受容体の一部にある薬剤親和性を示す部分が偶然存在し、このT細胞が薬剤を介してAPCと接触する機会があれば、提示する抗原エピトープとは無関係に一斉に活性化する（Fig. 6b）。薬剤によるハプテン化抗原認識機構も薬疹の発症に重要であると思われるが、おそらく、薬剤のT細胞受容体の親和性に基づいたpromiscuousな反応によって一斉に活性化した多様な機能的T細胞が、患者の臨床症状を決定していくと思われる（Fig. 7）。メモリーT細胞におけるT細胞受容体のレパートアを形づける要因は、個人が経験した感染症の種類や数に依存する。ワクチン療法は、致命的な感染症のみならず、あらゆる感染症予防対策のひとつの戦略となっているが、これもメモリーT細胞のT細胞受容体のレパートアに影響を与えているはずである。さまざまな後天的な影響を受けて形成されたT細胞受容体レ

パートAは、ある確率的な頻度で薬剤親和性を生み、薬疹発症に寄与しているのではないかと推測される。薬疹は、薬剤を介して、記憶している感染病原体抗原に反応するT細胞の一部を、意図せず、活性化させる反応であると考え、ウイルス発疹との類似性を無理なく説明できる。

#### DIHSの発症メカニズムの謎

DIHSは、これまでわれわれが知る薬疹と大きく臨床的に異なる点が特徴的である。原因薬に限られており、また発症までに長期間を要すること、肝機能障害、発熱、リンパ節腫脹、異型リンパ球出現など、皮膚外症状が強いこと、薬剤を中止しても症状が持続すること、経過中にヒトヘルペスウイルス(HHV)-6を代表とする種々のヘルペスウイルス群の再活性化がみられることなどである。特に、なぜHHV-6の再活性化をおこすのかという点は、なお深い謎に包まれている。

それでも、本疾患概念がコンセンサスを得られるようになってから、蓄積した症例の検討から、HHV-6再活性化にかかわる新たな事実が判明している。HHV-6に対する抗体価の上昇は、発症後21日前後から起こることと、HHV-6の活性化は予後や重症度にも影響を与えるということ<sup>9)</sup>、そしてDIHSにおける免疫低下の背景には制御性T細胞の増加が関係しているということである<sup>10)</sup>。

われわれは、10名のDIHS患者の末梢血単核細胞を免疫学的にモニターすることによって、経時的な変化に気づいた。すなわち、FACSにおけるSSC/FSCの解析において、DIHS患者の末梢血単核細胞には、健常人や他の薬疹患者ではみられないリンパ球や単球以外の特殊な分画が出現することを見出したのである<sup>11)</sup>。しかも、この分画の多くはCD13陽性、CD14一部陽性で、cutaneous lymphocyte antigenを発現し、一部はHHV-6抗原を内在していて、発症3週目以降徐々に消失した。すなわち、monomyeloid precursorと考えられるこの分画は、おそらく骨髓内にHHV-6のreservoirとして存在し、薬剤投与による直接または間接的影響によって末梢血中に循環するようになり、皮膚内へ移行すると考えられる。まだ、この現象の意義は明らかでないが、DIHSにおけるHHV-6再活性化メカニズムにおいて、重要なイベントではないかと推測され、現在もさらに検討をすすめている。

#### さいごに

薬疹を、薬剤をハプテンとした抗原認識によって生じるアレルギー反応として単純にとらえることは誤りであり、むしろそこには複雑な非典型的な免疫反応が混在するという事実は、薬疹をもっぱらアレルギーという立場から眺めてきたわれわれにとって、衝撃でもあった。しかし、薬剤アレルギーにおけるT細胞活性化の機構は、まだまだ謎の部分が多い。近い将来、若い皮膚科医の熱意によって、そのひとつひとつが解きほぐされていくことを期待している。

#### 文 献

- 1) Hashimoto K, Yasukawa M, Tohyama M: Human herpesvirus 6 and drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3: 255-260, 2003
- 2) Hashizume H, Takigawa M, Tokura Y: Characterization of drug-specific T cells in phenobarbital-induced eruption. *J Immunol*, 168: 5359-5368, 2002
- 3) Britschgi M, Steiner UC, Schmid S, et al: T-cell involvement in drug-induced acute generalized exanthematous pustulosis. *J Clin Invest*, 107: 1433-1441, 2001
- 4) Pichler WJ: Immune mechanism of drug hypersensitivity. *Immunol Allergy Clin North Am*, 24: 373-397, v-vi, 2004
- 5) Naisbitt DJ, Britschgi M, Wong G, et al: Hypersensitivity reactions to carbamazepine: characterization of the specificity, phenotype, and cytokine profile of drug-specific T cell clones. *Mol Pharmacol*, 63: 732-741, 2003
- 6) Naisbitt DJ, Farrell J, Wong G, et al: Characterization of drug-specific T cells in lamotrigine hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 111: 1393-1403, 2003
- 7) Hashizume H, Seo N, Ito T, et al: Promiscuous interaction between gold-specific T cells and APCs in gold allergy. *J Immunol*, 181: 8096-8102, 2008
- 8) Pichler WJ, Beeler A, Keller M, et al: Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol Int*, 55: 17-25, 2006
- 9) 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
- 10) Takahashi R, Kano Y, Yamazaki Y, et al : Defective regulatory T cells in patients with severe drug eruptions : timing of the dysfunction is associated with the pathological phenotype and outcome, J Immunol, 182 : 8071-8079, 2009
- 11) Hashizume H, Aoshima M, Ito T, et al : Emergence of circulating monomyeloid precursors predicts reactivation of human herpesvirus-6 in drug-induced hypersensitivity syndrome, Br J Dermatol, 161 : 486-488, 2009

## Mechanism of Drug-induced Eruption: Why Does It Occur?

Hideo HASHIZUME<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Dermatology, Hamamatsu University School of Medicine  
1-20-1 Handa-yama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan

Drug-induced eruption seems to be mediated by the activation of T-cells in response to haptenized antigens. However, recent findings suggest that other mechanisms are also involved in the pathology. We and other researchers have found preferential proliferation of T cells bearing specific V  $\beta$  chains in a culture of T-cells from drug rash patients after stimulation with drugs. Surprisingly, the responses of some drug-specific T-cells did not show close MHC restriction, suggesting promiscuous interaction between T-cells and antigen-presenting cells (APCs) in the presence of drugs. The pharmacological interaction concept, which Pichler has recently developed, might explain these aberrant reactions of drug-specific T-cells. It is an interesting hypothesis concerning drug allergy that the promiscuous binding of T-cells to APCs via a drug promotes the non-specific activation of memory T-cells. Considering that experiences of infections influence the construction of the T-cell receptor (TCR) repertoire, a drug may activate memory T-cells sensitized to virus antigens via promiscuous binding of APC to TCR, resulting in manifestations like viral eruptions.

(J Environ Dermatol Cutan Allergol, 4 (2): 67-75, 2010)

**Key words :** drug-induced eruption, major histocompatibility complex, restriction, T-cell receptor, viral eruption

# モルトリンフオーマ

## MALT lymphoma

橋爪秀夫 HASHIZUME HIDEO  
浜松医科大学皮膚科学准教授

悪性リンパ腫の約8%を占めるモルト(mucosa-associated lymphoid tissue; MALT)リンフオーマは、節外性の辺縁帯B細胞由来の悪性リンパ腫の一型である。胃に原発するものが最も多く、肺、唾液腺のほか、眼結膜や付属器、皮膚(図1a)、甲状腺などさまざまな部位にみられるが、その病理学的な特徴は共通している<sup>1)</sup>。腫瘍細胞は辺縁帯B細胞に由来し、濾胞構造と小型で深くびれをもったセントロサイト様リンパ球の浸潤を濾胞間に認め、周辺には形質細胞がみられる(図1b)。最も特徴的であるのは、lymphoepithelial lesionと呼ばれる所見で、腺管上皮にリンパ腫細胞が浸潤し、その結果、腺管は膨張し、時に変性に至る。免疫組織学的には、正常辺縁帯B細胞と同様に、CD20陽性、CD23陰性、CD79a陽性、bcl-2陽性、IgD陰性、IgM陽性、CD5陰性、CD10陰性であり、bcl-6およびcyclin D1は発現しない(図1c)。この所見は、濾胞中心性リンパ腫との鑑別点となる。PCRやサザンブロット解析によって、IgHの遺伝子再構成が証明される。t(11;18)(q21;q21)遺伝子転座およびそれによるAPI-MALT1融合蛋白は胃のモルトリンフオーマで25%に検出され有名であるが、皮膚ではまれである。

リンパ球親和性ウイルスの感染によって腫瘍化するリンパ腫とは異なり、本症は病原体が持続的に感染することによって、抗原依存的にリンパ球が選択的に増殖し、その後遺伝子の転座などによって抗原刺激非依存的なNF- $\kappa$ Bの活性化が生じて腫瘍化すると考えられる<sup>2)</sup>。胃では*Helicobacter pylori*感染、眼付属器では*Chlamydia psittaci*感染、小腸では*Campylobacter jejuni*感染、皮膚では*Borrelia (B.) burgdorferi*感染が発症の契機として知られているが<sup>3)</sup>、これまでのわが国における皮膚原発の本症に、*B. burgdorferi*感染の関与の報告はない<sup>3)</sup>。

予後は比較的良く、とくに皮膚原発のものは良好で、5年生存率はほぼ100%である<sup>4)</sup>。*B. burgdorferi*感染に関連したも

のは、まず抗生物質を投与すべきである。放射線の局所照射、リツキシマブの全身または局所注射などが有効である<sup>5)</sup>。

### References

- 1) Bacon CM, Du MQ, Dogan A : *J Clin Pathol* 60 : 361-372, 2007
- 2) Suarez F, Lortholary O, Hermine O et al : *Blood* 107 : 3031-3044, 2006
- 3) Tsuji K, Suzuki D, Naito Y et al : *Eur J Dermatol* 15 : 480-483, 2005
- 4) Willemze R, Jaffe ES, Burg G et al : *Blood* 105 : 3768-3785, 2005
- 5) Senff NJ, Noordijk EM, Kim YH et al : *Blood* 112 : 1600-1609, 2008

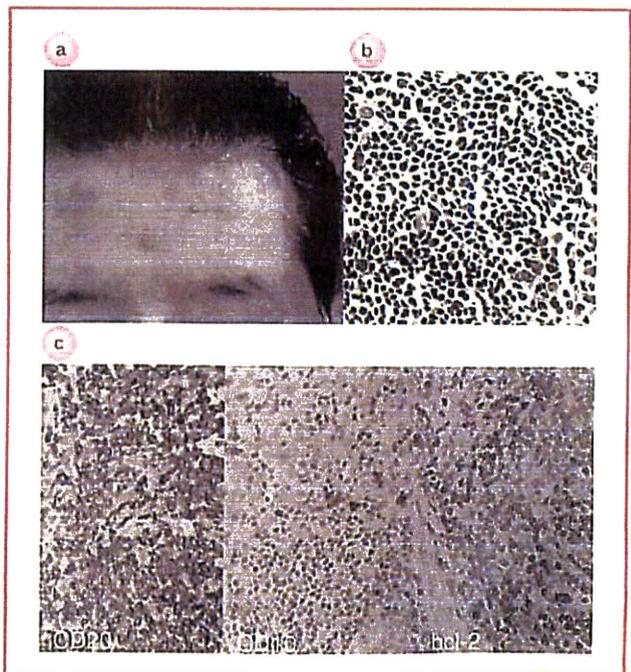


図1 皮膚モルトリンフオーマの臨床像と組織所見  
(→カラー58頁)

60歳代前半、男性。10年前から前額部に浸潤性紅斑が多発してきた(a)。濾胞間にセントロサイト様の小型で核が不整形の細胞がびまん性に浸潤し(b)。免疫組織学的染色(c)では、CD20陽性、CD5陰性、CD10陰性、bcl-2陽性、bcl-6陰性であった。抗*B. burgdorferi*抗体は陰性。

# 川崎病にみられる発疹

古川福実\* 伊豆邦夫\*\* 橋爪秀夫\*\*\*

## はじめに

一般に、血管炎は経時的かつ連続的に罹患血管を異にし、標的臓器も多彩である。川崎病は、40数年前に川崎富作博士<sup>1)</sup>によって発表された動脈を主な炎症の場とする血管炎であり、罹患臓器も単一ではない<sup>2,3)</sup>。全身諸臓器に動脈炎が観察されるが、まず非特異的炎症として全身の比較的細い動脈に炎症が起こる。次に、より太い血管に移行し

ていくことが Hamashima らによって明らかにされた<sup>2)</sup>。細動脈からより太い動脈（弾性型動脈や筋型動脈）への進展は第9病日から第14病日ときわめて早い（図1）。原因は未解明であるが、感染症とそれに関連したアレルギー反応が関係している可能性が高い<sup>1,2)</sup>。

## I 診断基準

表に示すように、主要症状と参考条項に区分さ

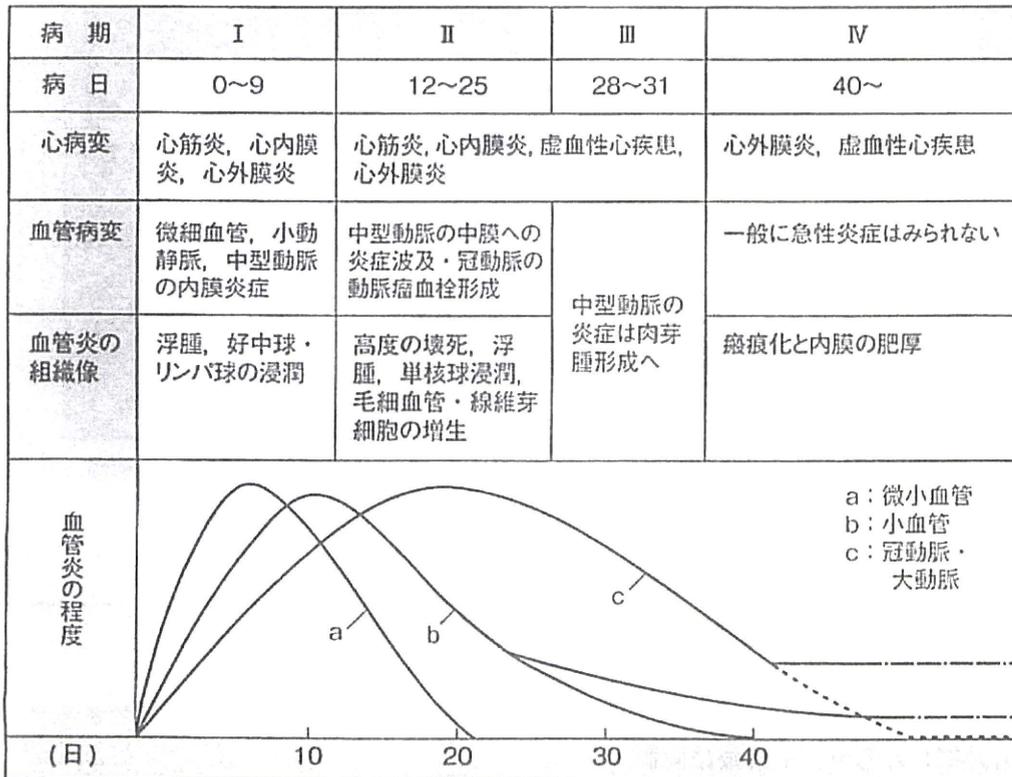


図1 川崎病の経時的な血管炎の病理変化

Furukawa Fukumi Izu Kunio Hashizume Hideo

\* 和歌山県立医科大学皮膚科 [〒641-0012 和歌山市紀三井寺 811-1]

TEL 073-441-0660 FAX 073-448-1908 E-mail: dajs@wakayama-med.ac.jp

\*\* 九州厚生年金病院皮膚科 \*\*\* 浜松医科大学皮膚科

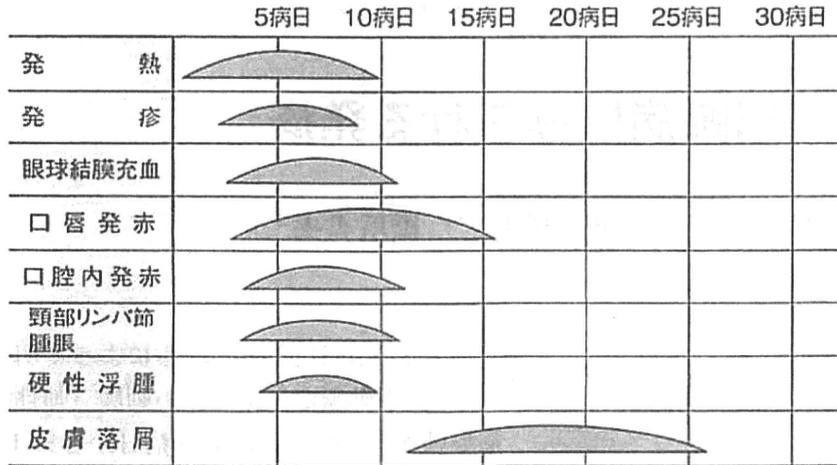


図2 川崎病 皮疹の経過

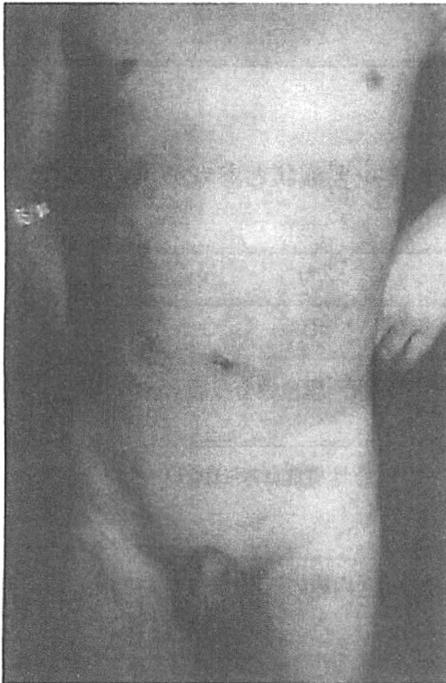


図3 体幹から下肢に出現したいわゆる不定形発疹

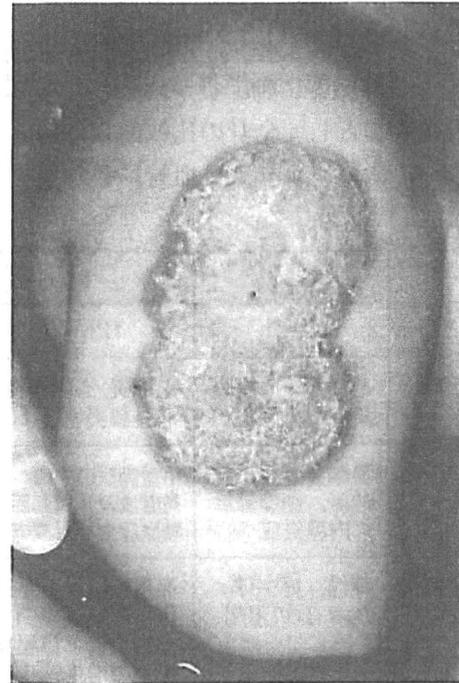


図4 BCG接種部位にみられた乾癬様の皮疹

れる。主要症状6つのうち4つが皮膚粘膜症状である。参考症状の皮膚症状として、BCG接種部位の発赤・痂皮形成、小膿疱、爪の横溝があげられている。主要な皮膚症状の一般的な出現順をみると、不定形発疹が有熱期にみられ、その後に両側眼球結膜の充血や手足の硬性浮腫があらわれ、指先からの膜様落屑が10日ごろから出現する(図2)<sup>4)</sup>。

## II 皮膚症状

皮膚は、初期の臨床症状として重要である<sup>2,4,5)</sup>。

### 1. 不定形発疹

出現率は約90%である。主に体幹から四肢に出現する皮疹で、最も高頻度に観察されるのは多型紅斑であろう(図3)。しかし、個疹の大きさや色調は一定でない。その組織所見は、通常の多形紅

川崎病 (MCLS、小児急性熱性皮膚粘膜リンパ節症候群) 診断の手引き  
(厚生労働省川崎病研究班作成改訂 5 版)

初版	1970年9月
改訂1版	1972年9月
改訂2版	1974年4月
改訂3版	1978年8月
改訂4版	1984年9月
改訂5版	2002年2月

本症は、主として4歳以下の乳幼児に好発する原因不明の疾患で、その症候は以下の主要症状と参考条項とに分けられる。

A 主要症状

1. 5日以上続く発熱 (ただし、治療により5日未満で解熱した場合も含む)
2. 両側眼球結膜の充血
3. 口唇、口腔所見: 口唇の紅潮、いちご舌、口腔咽頭粘膜のびまん性発赤
4. 不定形発疹
5. 四肢末端の変化: (急性期) 手足の硬性浮腫、拳蹠ないしは指趾先端の紅斑  
(回復期) 指先からの膜様落屑
6. 急性期における非化膿性頸部リンパ節腫脹

6つの主要症状のうち5つ以上の症状を伴うものを本症とする。

ただし、上記6主要症状のうち、4つの症状しか認められなくても、経過中に断層心エコー法もしくは、心血管造影法で、冠動脈瘤 (いわゆる拡大を含む) が確認され、他の疾患が除外されれば本症とする。

B 参考条項

以下の症候および所見は、本症の臨床で、留意すべきものである。

1. 心血管: 聴診所見 (心雑音、奔馬調律、微弱心音)、心電図の変化 (PR・QTの延長、異常Q波、低電位差、ST-Tの変化、不整脈)、胸部X線所見 (心陰影拡大)、断層心エコー図所見 (心膜液貯留、冠動脈瘤)、狭心症状、末梢動脈瘤 (腋窩など)
2. 消化器: 下痢、嘔吐、腹痛、胆嚢腫大、痙攣性イレウス、軽度の黄疸、血清トランスアミンナーゼ値上昇
3. 血液: 核左方移動を伴う白血球増多、血小板増多、赤沈値の促進、CRP陽性、低アルブミン血症、 $\alpha_2$ グロブリンの増加、軽度の貧血
4. 尿: 蛋白尿、沈査の白血球増多
5. 皮膚: BCG接種部位の発赤・痂皮形成、小膿疱、爪の横溝
6. 呼吸器: 咳嗽、鼻汁、肺野の異常陰影
7. 関節: 疼痛、腫脹
8. 神経: 髄液の単核球増多、けいれん、意識障害、顔面神経麻痺、四肢麻痺

備考 1. 主要症状Aの5は、回復期所見が重要視される。

2. 急性期における非化膿性頸部リンパ節腫脹は他の主要症状に比べて発現頻度が低い (約65%)
3. 本症の性比は、1.3~1.5:1で男児に多く、年齢分布は4歳以下が80~85%を占め、致命率は0.1%前後である。
4. 再発例は2~3%に、同胞例は1~2%にみられる。
5. 主要症状を満たさなくても、他の疾患が否定され、本症が疑われる容疑例が約10%存在する。この中には冠動脈瘤 (いわゆる拡大を含む) が確認される例がある。

連絡先 〒150-8935 東京都渋谷区広尾4-1-22  
日本医療センター小児科川崎病研究班  
電話 03-3400-1311, FAX03-3400-1394

斑の組織に似るが、真皮上層から中層にかけて密なリンパ球を中心とする炎症細胞浸潤を認めることがある。これらの炎症性細胞はCD4, HLA-DR陽性で、さらに角化細胞 (有棘細胞) にも高率に

HLR-DRが発現している。

多形紅斑の概念も曖昧な点があり、従来から不定形発疹と呼称されてきたのも致しかたがない。水疱・痂皮は形成せず、色素沈着は原則として認

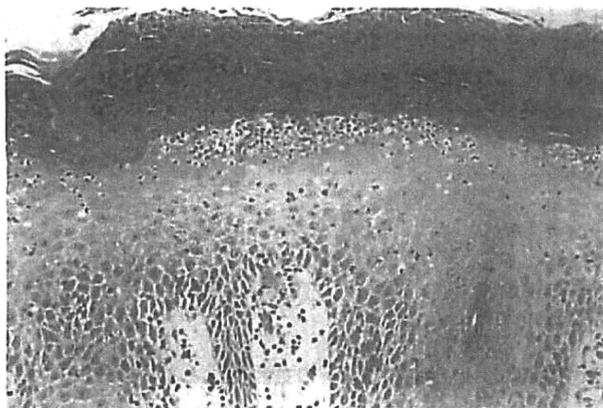


図 5 Kogoj の海綿状膿疱を伴う乾癬様組織 (図 4 の症例)

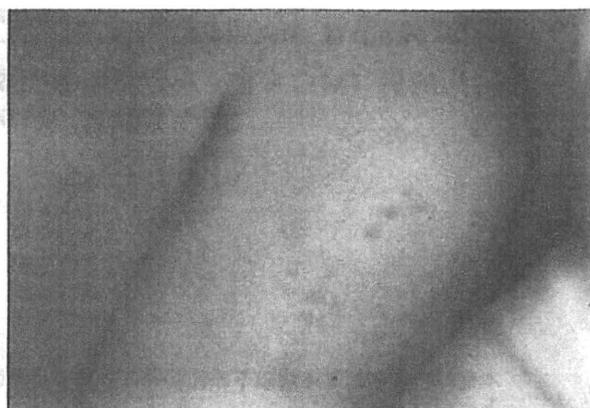


図 6 ステロイドの外用で、皮疹は 10 日で消退 (図 4 の症例)

めず、痒痒もない。

## 2. BCG 接種部位の限局性紅斑

接種後 1~12 か月では 60%以上の頻度で見られる。BCG 接種部位の限局性紅斑は川崎病を強く疑わせる所見であり、早期診断、不全型の診断に役立つ。図 4 は 10 か月患児の BCG 接種部位にみられた乾癬様の皮疹で、組織学的にも Kogoj の海綿状膿疱を認めた (図 5)<sup>6)</sup>。このような乾癬様皮疹では CD8 優位であるとの報告もある (私信)。



図 7 無菌性小膿疱

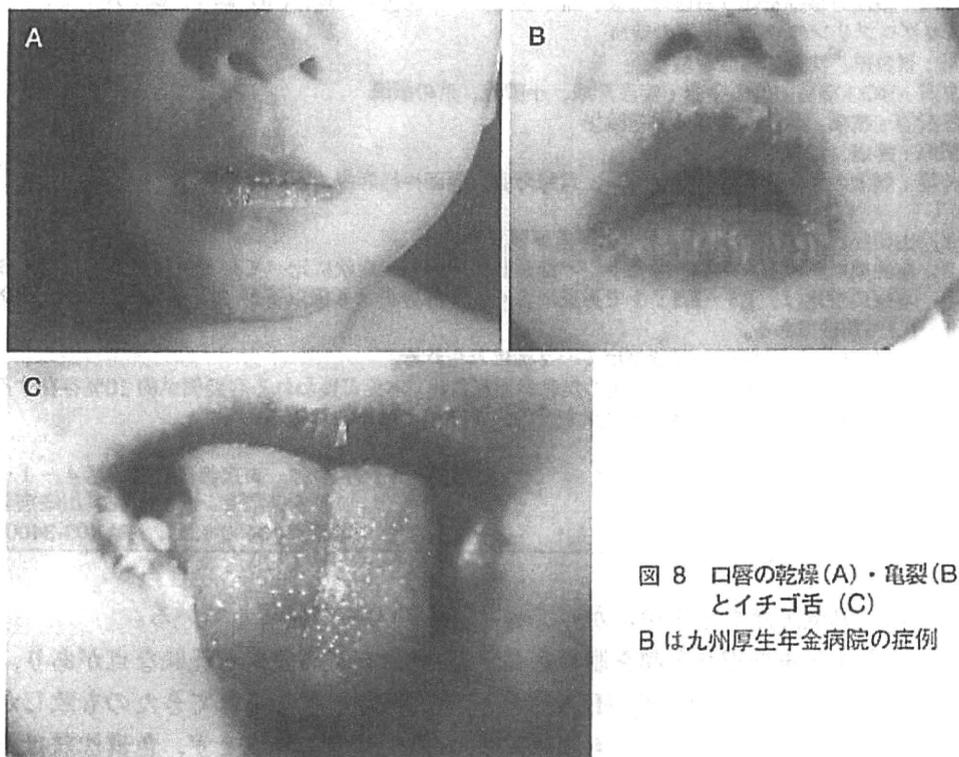


図 8 口唇の乾燥 (A)・亀裂 (B) とイチゴ舌 (C)  
B は九州厚生年金病院の症例

ステロイドの外用で、皮疹は10日で消退した(図6)が、容易に消退しない例もある。なぜ、このようなBCG接種部位の皮疹が出現するかは、本症の原因が不明であるかぎり結論は出ないであろう。筆者の一人は、接種によって生じた皮膚障害部のケプネル現象や細菌抗原由来のスーパー抗原に解決のヒントがあると思っているが、確証はない<sup>7,8)</sup>。

### 3. 無菌性小膿疱

6%前後に出現する無菌性膿疱であり(図7)、角層下あるいは表皮内に好中球やリンパ球からなる炎症細胞塊を認めることがある。

### 4. 口唇, 口腔所見

出現率は約90%である。口唇が発赤紅潮し、ついで乾燥・亀裂・出血をみる(図8A, B)。また、口腔咽頭粘膜はびまん性に発赤し、舌乳頭の腫大によりイチゴ舌となる(図8C)。

### 4. 両側眼球結膜の充血

出現率は約93%である。一般的には発熱後数日して認めることが多く、眼球結膜の毛細血管の1本1本が拡張して、その走行がはっきり区別できるのが特徴で、眼脂は原則として認めない(図9, <http://www.kawasaki-disease.org/>から)。

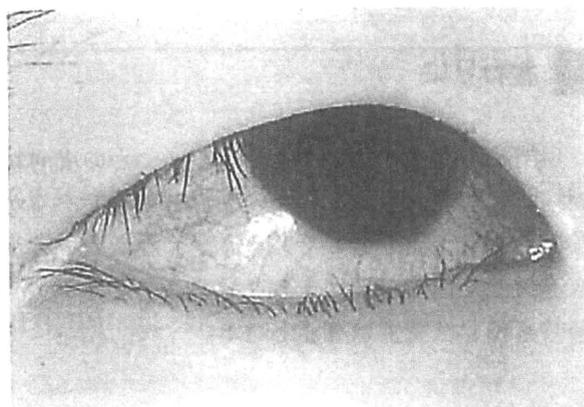


図9 眼球結膜の充血(毛細血管の1本1本が拡張)

### 5. 四肢末端の変化

出現率は急性期・回復期を合わせて約80%である。

急性期：両手掌・足趾がびまん性に紅潮し、手足が硬く腫れるが(てかてかパンパンと称される)、指圧による圧痕を残さない(硬性浮腫)。

回復期：爪と皮膚の移行部に亀裂が入り、そこから膜様の落屑がはじまる。この所見は指先からはじまることが多く(図10)、趾先の落屑は遅れるか、あるいは認めないこともある<sup>5)</sup>。

このような事象は、溶連菌感染症の際にみられることが多いが、その機序は不明といわざるをえない。

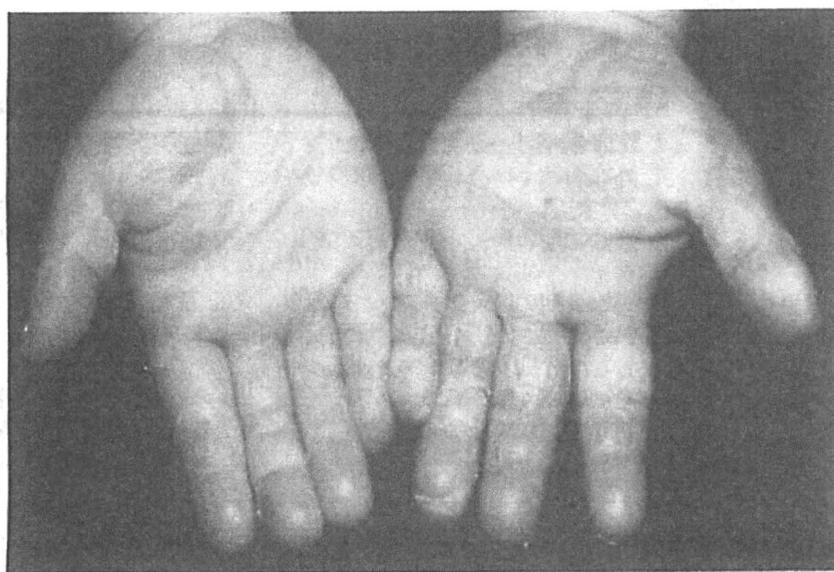


図10 膜様の落屑

## おわりに

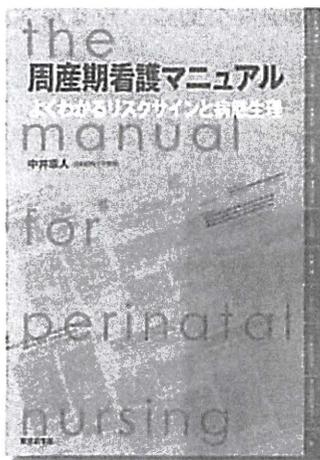
川崎病顔貌と称されるようないくつかの皮膚粘膜症状に特徴があり、個々の皮疹は多彩であるが診断的価値の高いものである。いくつかのウイルス感染症や細菌感染症と類似することがあるが、経験を積めば鑑別は可能となる。

### 文献

- 1) 川崎富作：川崎病発見から40年. 医学のあゆみ **222** : 841-844, 2007

- 2) Furukawa F : Kawasaki disease. Eur J Dermatol **5** : 549-557, 1995
- 3) 古川福実, 中村智之, 金澤伸雄 : 総説「時空をマーチする血管炎」. Visual Dermatology **6** : 452-457, 2007
- 4) 歯部友良 : 臨床症状. 大国真彦, 他編 : 川崎病ハンドブック, 中外医学社, 東京, pp41-50, 1988
- 5) 萩野広太郎 : 川崎病の診断のこつと免疫グロブリン療法のエビデンス. 医学のあゆみ **222** : 859-865, 2007
- 6) 岩崎加代子, 他 : 乾癬様皮疹を示した川崎病の1例. 臨皮 **48** : 653-655, 1994
- 7) 植木宏明, 古川福実 : (座談会) ケプネル現象を巡って. 皮膚アレルギーフロンティア **3** : 100-108, 2005
- 8) 古川福実 : 感染とアレルギー. 皮膚アレルギーフロンティア **3** : 7-12, 2005

EBMに基づく母子看護, 保健活動のスキルアップのための実践書



B5判 320頁 2色刷  
定価 5,040円  
(本体4,800円+税5%)  
ISBN978-4-88563-184-9

# 周産期看護マニュアル

## よくわかるリスクサインと病態生理

著者 / 中井章人 日本医科大学教授

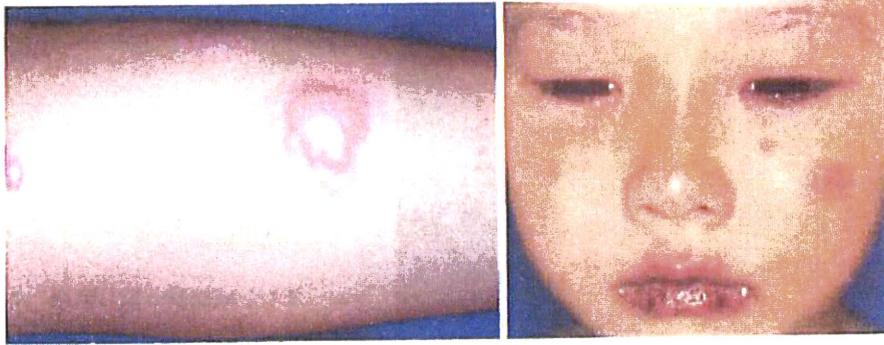
### 主要内容

- |                           |                      |
|---------------------------|----------------------|
| <b>I. 異常・疾病からみたリスクサイン</b> | <b>II. 産科診察法</b>     |
| 1. 妊娠前期(4~14週)のリスクサインと対応  | 1. 問診                |
| 2. 妊娠中期(15~28週)のリスクサインと対応 | 2. 全身所見, 外診, 内診      |
| 3. 妊娠後期のリスクサインと対応         | 3. 妊娠の診断, 妊婦健康診査(妊健) |
| 4. 偶発合併症のリスクサインと対応        | <b>III. 日常生活サポート</b> |
| 5. 分娩期のリスクサインと対応          | 1. 栄養サポート            |
| 6. 産褥のリスクサインと対応           | 2. 妊産婦とサプリメント        |
| 7. 新生児のリスクサインと対応          | 3. 日常生活サポート          |
|                           | 4. 妊婦スポーツの安全管理基準     |
|                           | 5. 育児準備サポート          |



東京医学社

〒101-0051 東京都千代田区神田神保町2-20-13 Y'sコーラルビル  
TEL 03-3265-3551 FAX 03-3265-2750  
<http://www.tokyo-igakusha.co.jp> E-mail: hanbai@tokyo-igakusha.co.jp



左：水疱を伴う多形滲出性紅斑，右：重症型の口唇粘膜症

■ 結節性紅斑 → p 80



両下腿の潮紅と圧痛のある皮下結節

■ 膠原病にみられる発疹 → p 84



A  
B  
C  
D

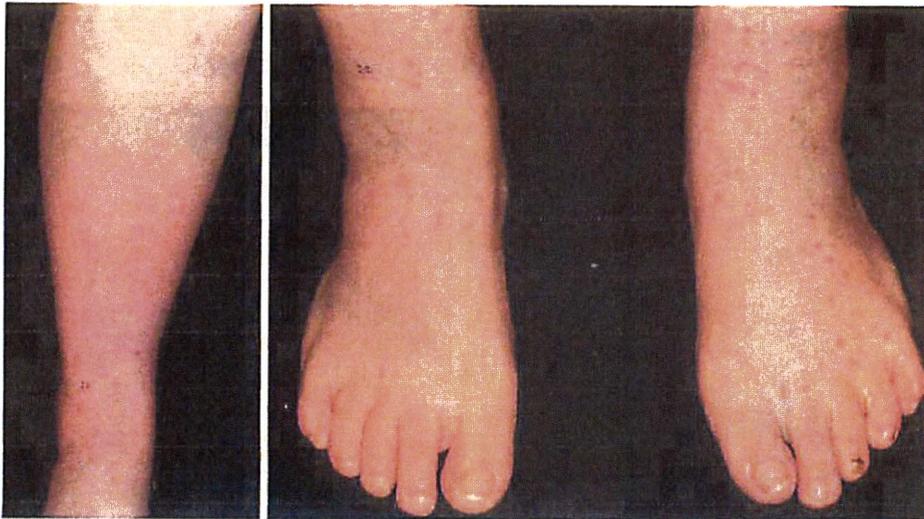
- A：全身型若年性特発性関節炎 リウマトイド疹
- B：全身性エリテマトーデス 円板状疹
- C：若年性皮膚筋炎 異所性石灰化，D：Gottron 丘疹・微瘰





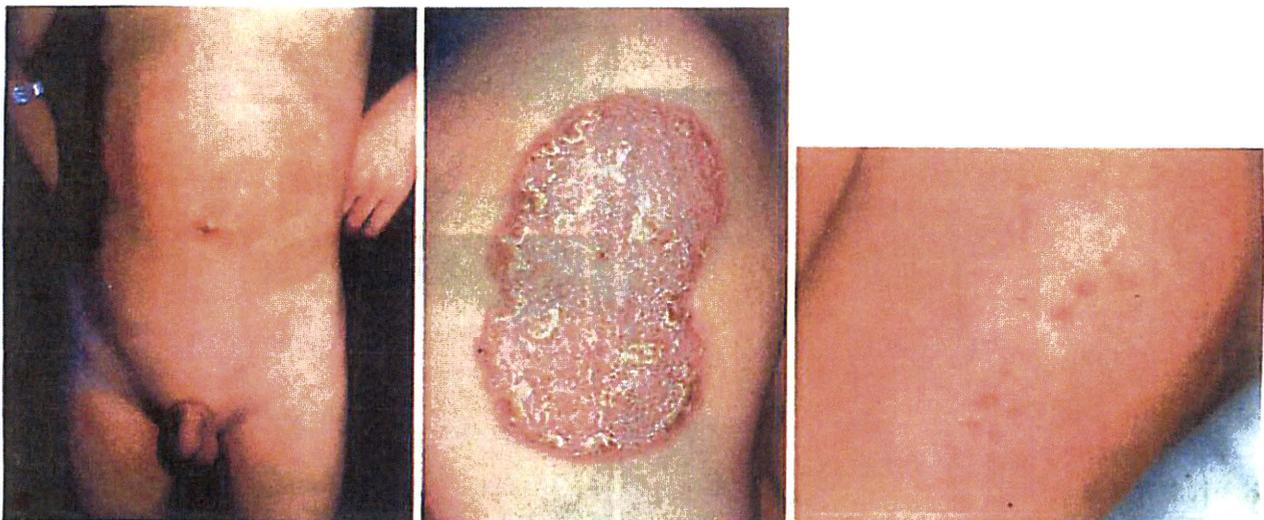
シェーグレン症候群 環状紅斑

■ 血管性紫斑病 → p 89



Henoch-Schönlein 紫斑

■ 川崎病にみられる発疹 → p 93



左：体幹から下肢に出現したいわゆる不定形発疹，中央：BCG 接種部位にみられた乾癬様の皮疹，右：ステロイドの外用による皮疹の消退

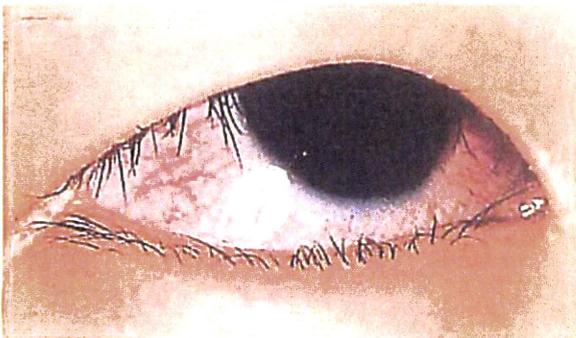


無菌性小膿疱



A  
B/C

A：口唇の乾燥，B：亀裂（九州厚生年金病院の症例），C：イチゴ舌



眼球結膜の充血（毛細血管の1本1本が拡張）



膜様の落屑

## INVESTIGATIVE REPORT

# *In vitro* Propagation and Dynamics of T cells from Skin Biopsies by Methods Using Interleukins-2 and -4 or Anti-CD3/CD28 Antibody-coated Microbeads

Hideo HASHIZUME<sup>1,4</sup>, Anker HANSEN<sup>2</sup>, Lars K. POULSEN<sup>2</sup>, Allan Randrup THOMSEN<sup>3</sup>, Masahiro TAKIGAWA<sup>4</sup> and Kristian THESTRUP-PEDERSEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology, Aarhus University Hospital, Aarhus, <sup>2</sup>Laboratory of Allergology, Rigshospitalet, Copenhagen University, <sup>3</sup>Department of Virology, Copenhagen University, Copenhagen, Denmark, and <sup>4</sup>Department of Dermatology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan

In order to explore the mechanisms of inflammatory skin disorders, we established two methods of expanding skin-derived lymphocytes, one using high levels of interleukin (IL)-2 and IL-4 (method A) and the other using low levels of cytokines and anti-CD3/CD28 microbeads (method B). Both methods provide advantages for functional studies. With either of these two, we could obtain more than  $10^7$  cells/ from a 3 mm skin biopsy in 21 days from 23 out of 26 biopsies of various skin diseases. The relevance of these cells was confirmed by shifted T-cell receptor  $\beta$  chain variable region (TCR-V $\beta$ ) repertoire and antigen-dependent proliferation in antigen-driven skin disorders. The propagation of skin-resident lymphocytes, seen especially in method A, seems to be mediated by a functional defect of regulatory T cells residing in skin sequentially expanding under the conditions of our methods. **Key words:** skin-derived lymphocytes; T-cell receptor repertoire; regulatory T cells.

(Accepted March 22, 2010.)

Acta Derm Venereol 2010; 90: 468–473.

Hideo Hashizume, Department of Dermatology, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, Japan. E-mail: hihashiz@hama-med.ac.jp

Skin has an exquisite immune system that protects against invasion by pathogens. Dysregulation of the skin immune system may influence chronic inflammatory skin diseases, including atopic dermatitis (AD) and psoriasis (1). An ideal way of exploring the mechanisms of such conditions would be to obtain large numbers of inflammatory cells resident in skin. However, it is difficult to expand a low number of cells from skin explants to obtain sufficient numbers of cells to investigate, and special techniques and devices are required (2, 3). We describe here the establishment of two simple methods of expanding skin-derived lymphocytes, which provide advantages for functional studies.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Twenty-three patients with AD (6 men, 3 women; mean age 44 years (range 36–61 years)), psoriasis (6 men, 1 woman; mean age 47.5 years (range 26–70 years)), acute/chronic eczema, which could not be further defined (2 men, 2 women; mean age 64 years (range 55–87 years)), pityriasis lichenoides (1 man, age 68 years) or drug eruption (2 men, age 56 and 64 years) were included in the study. Two healthy individuals (age 48 and 64 years) donated normal skin and a subject with an erythematous lesion following a tuberculin skin reaction (1 man, 64 years) also participated in this study. A total of 26 skin specimens were obtained from these 25 patients/persons. All of the patients were informed about the purpose of this study and agreed to participate. All studies were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki Principles for Human Tissue Research and were approved by the Institutional Review Board of Aarhus University and Hamamatsu University School of Medicine.

### Reagents, monoclonal antibodies and culture media

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled anti-V $\alpha$  $\beta$  common frame and anti-cutaneous lymphocyte antigens (CLA) monoclonal antibodies (MoAbs) were obtained from PharMingen, Sorrent Valley, CA, USA. Twenty-four T-cell receptor  $\beta$  chain variable region (TCR-V $\beta$ ) gene products were analysed with IOtest Beta Mark, TCR-V $\beta$  repertoire kit (Beckman Coulter Co., Marseille, France). FITC- and phycoerythrin (PE)-labelled anti-CD3 (SK7), anti-CD4 (SK3), and anti-CD8 (SK1) were obtained from Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA. MoAbs against chemokine receptors were obtained from R & D System Inc. Minneapolis, MN, USA.

To detect the expression of Foxp3, a PE anti-human Foxp3 staining set (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) was used according to the manufacturer's protocol.

Cells were cultured in RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK) supplemented with L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM),  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, 1% of a 100  $\times$  mixture of non-essential amino acids (Gibco), antibiotics and pooled human AB serum or 10% heat-inactivated foetal calf serum. For culture of these cells, the medium was supplemented with recombinant human interleukin 2 (rIL-2, Takeda Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan and R & D System Inc.) and/or recombinant human IL-4 (R & D System Inc.).

### Establishment of skin-derived lymphocyte cell lines

Skin-derived lymphocyte cell lines were established by two methods (A and B), as follows.

**Method A.** A 3-mm skin biopsy was cut into 1 mm square pieces with a sharp blade and immersed in 10 ml RPMI-1640 containing IL-2 (1,000 U/ml) and IL-4 (250 U/ml) in a 25 ml culture bottle (Corning) for 14–21 days. When the cell density yielded more than  $10^6$  cells/ml, half of the culture medium was exchanged with RPMI-1640, as above, containing IL-2 and IL-4 at the same concentrations.

**Method B.** A 3-mm skin biopsy was cut as in method A and cultured in 10 ml RPMI-1640 containing IL-2 (50 U/ml) and 10  $\mu$ l anti-CD3/CD28 Ab-coated microbeads (CD3/CD28 T-cell expander, Dynal Biotech, Oslo, Norway) in a 25 ml culture bottle for 7 days. On day 8, the cells were harvested and the bound microbeads were detached with a magnetic device (Dynal), and transferred into a new flask containing RPMI-1640 with IL-2 and new microbeads at the same concentration (re-stimulation). At 6–8-day intervals re-stimulation was performed in order to further expand the cells for 2 months.

*Cell preparations for antigen-presenting cells*

Freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were incubated in a 6-well-plate for 45 min, and the adherent cells were harvested and cultured in RPMI with serum containing GM-CSF (10 ng/ml, R & D) and IL-4 (10 ng/ml) for 14–21 days to obtain monocyte-derived dendritic cells as antigen-presenting cells (APCs).

*Lymphocyte proliferation assay with 5- or 6-(N-succinimidyl-oxycarbonyl)-fluorescein 3',6'-diacetate labelling method*

After labelling with 5- or 6-(N-succinimidyl-oxycarbonyl)-fluorescein 3',6'-diacetate (CFSE), as described previously (4), cells were cultured in 96-well flat-bottomed plates (Corning Glass Works, Corning, NY, USA) in the presence or absence of antigens (tetanus toxoid (TT) 3 fpu/ml, purified protein derivatives (PPD) 1–10  $\mu$ g/ml or salazosulfapyridine 10  $\mu$ g/ml and APCs in selected cell lines, and were analysed with flow cytometry after 3 days culture.

*Flow cytometric analysis*

Aliquots of  $10^5$  cells were stained with FITC-, PE- and PerCP-conjugated MoAbs, and analysed as described previously (4).

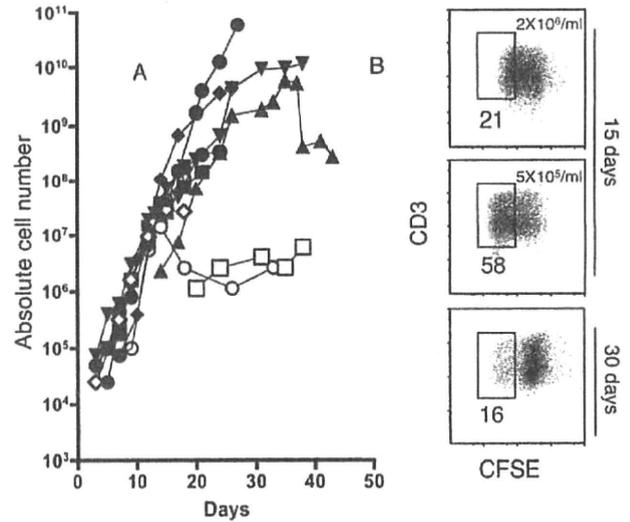
*Statistical analysis*

Mann-Whitney *U* test was used for non-parametric analysis and Student's *t*-test for parametric analysis. *p* < 0.05 was considered statistically significant.

**RESULTS**

*Propagation of skin-derived lymphocytes from a skin biopsy*

The cell number increased progressively to more than  $10^7$  cells/specimen from all the skin pieces in method A (filled symbols) and B (open symbols), in 23 out of 26 biopsies (Fig. 1a and b). In method A, the proliferation activity peaked between 14 and 20 days in culture and decreased over the next 30 days (Fig. 1b). The optimal proliferation response was observed at a cell density of approximately  $5 \times 10^5$  cells/ml (Fig. 1b). In method B, although the proliferation activity was inferior to



**Fig. 1.** Proliferation of cells derived from skin specimens. (a) Absolute number of cells expanded from skin lesions by methods A (filled symbols) and B (open symbols). Total cell number per skin piece was indicated. The x-axis indicates culture period. Circle, AD; square, drug eruption; triangle, psoriasis. (b) Cell division activity depending on cell density and culture days. After labelling with 5- or 6-(N-succinimidyl-oxycarbonyl)-fluorescein 3',6'-diacetate, cells harvested at day 15 and day 30 were cultured for 72 h at different cell densities ( $2 \times 10^6$ /ml and  $5 \times 10^5$ /ml), followed by flow cytometry (FCM) analysis. Numbers indicate the percentage of divided cells in the total cells, as shown in a box.

that in method A (Fig. 1a), periodic stimulations with anti-CD3/CD28 Ab-coated microbeads could maintain cell viability for at least 3 months in 12 out of 14 biopsies.

*Analysis of phenotype and TCR-V $\beta$  usage of skin-derived cell lines*

The phenotypes of cells expanded by methods A and B from skin lesions were examined for their TCR-V $\beta$  repertoire of lymphocytes. In both methods, the expanded cells from all the specimens were CD3<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>

**Table 1.** Phenotype of expanded cells during culture

			D12*	D20*	D28*
Method A	PPD reaction	CD4	77.5	14.0	n.d.
		CD8	20.3	85.9	n.d.
	Psoriasis	CD4	59.6	93.1	99.5
		CD8	24.6	4.7	0.5
	Drug eruption	CD4	81.1	49.0	15.9
		CD8	17.6	47.9	77.5
Normal skin	CD4	97.6	88.0	25.5	
	CD8	0.15	11.7	74.2	
Method B	Drug eruption	CD4	35.6	29.8	11.4
		CD8	64.4	67.6	85.2
	Normal skin	CD4	60.5	55.5	40.0
		CD8	35.2	45.0	58.0

The percentage of cells positive for CD4/CD8 among total lymphocytes is indicated.

\*Indicates culture days. n.d.: not done.

PPD: purified protein derivatives.

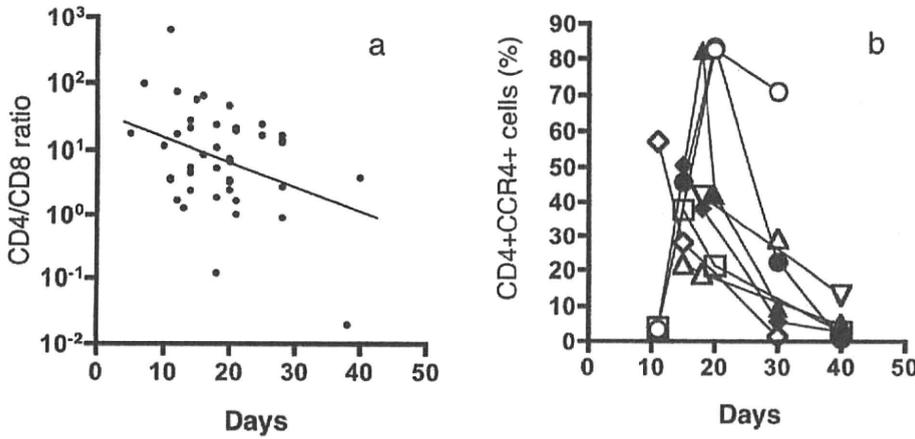


Fig. 2. Phenotypic changes of expanded cells during culture. (a) Ratio of CD4<sup>+</sup> cell number to CD8<sup>+</sup> cell number during culture. Each plot indicates the ratio at that time-point. (b) Percentage of CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> cells in total cells expanded from atopic dermatitis (*n*=4, open symbols) and psoriasis (*n*=4, filled symbols) lesions during culture. Symbols indicate individual patients.

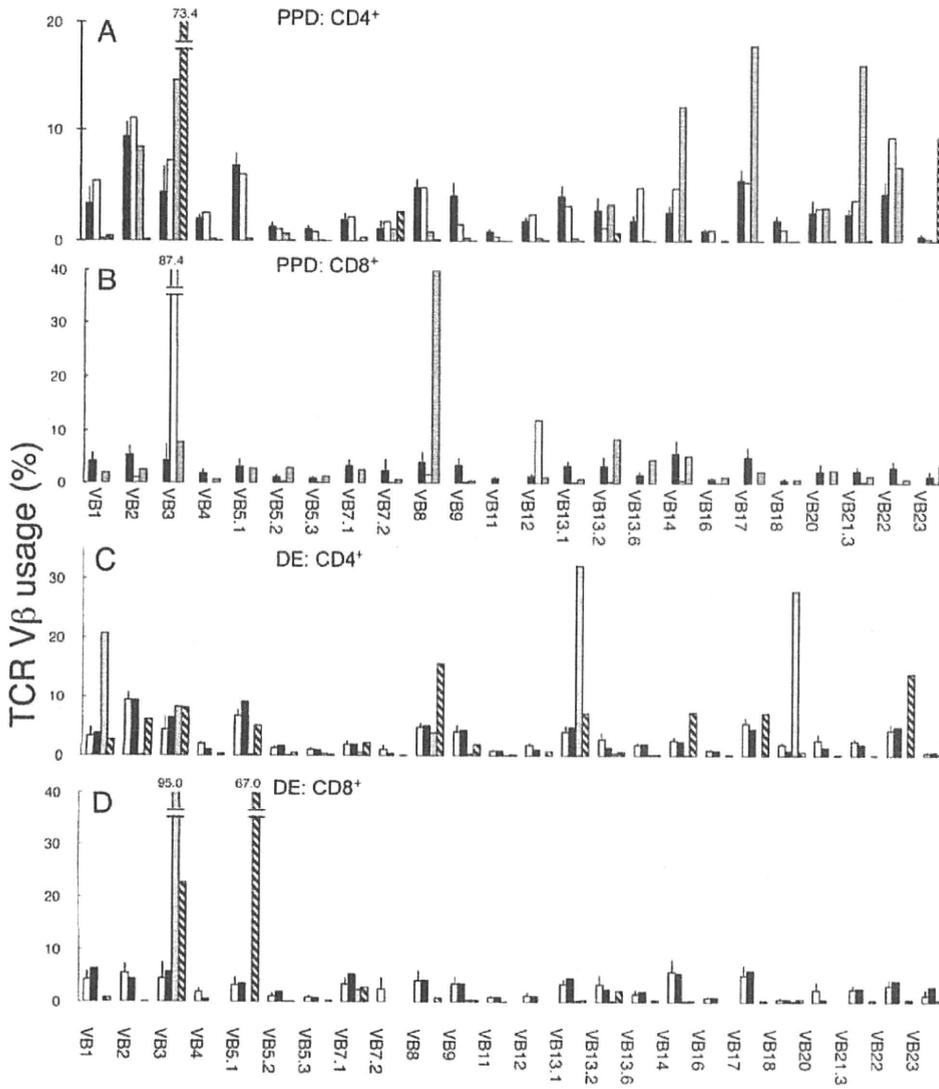


Fig. 3. T-cell receptor  $\beta$  chain variable region (TCR-V $\beta$ ) repertoire of T cells expanded from skin. (A and B) TCR-V $\beta$  usage of cells expanded by method A from the positive tuberculin test (grey) and the normal site 5 cm away from the lesion (hatched) and circulating lymphocytes of normal subjects (black) and the tested subject (white) was analysed by FCM using antibodies against V $\beta$ s at the gate of (A) CD4<sup>+</sup> cells and (B) CD8<sup>+</sup> cells. (C and D) TCR-V $\beta$  usage of cells expanded by method A (dark-grey) and method B (light-grey) from drug eruption (DE) lesions and circulating lymphocytes of normal subjects (black) and the patient (white) was analysed by FCM using antibodies against V $\beta$ s at the gate of (C) CD4<sup>+</sup> cells and (D) CD8<sup>+</sup> cells. Vertical bar: standard deviation. Numbers indicate the percentage of total cells.

CD19<sup>-</sup>CD20<sup>-</sup> cells, indicating T lymphocytes. A decrease in CD4/CD8 ratio was noted (Table I and Fig. 2a) with a transient increase in CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> cells (Fig. 2b) during the culture in method A, but not in method B.

We established two cell lines by method A from the skin samples of a positive tuberculin lesion and clinically normal skin 5 cm away from the tuberculin lesion in the same individual (Fig. 3A and B). CD4<sup>+</sup> cells from the tuberculin reaction showed preferential usage of Vβ3, Vβ14, Vβ17 and Vβ21.3, while those from normal skin predominantly expressed Vβ3 and Vβ23 (Fig. 3A). Among CD8<sup>+</sup> cells, the expanded cells from the lesion highly expressed Vβ8 (Fig. 3B), whereas all the cells from the normal skin site were negative for CD8. This suggests that CD8<sup>+</sup> T cells accumulating in inflamed skin expand easily compared with normal skin.

We next compared the Vβ usage of cells expanded from drug eruptions using methods A and B at 21 days (Fig. 3C and D). We observed divergence in the T-cell receptor repertoire of expanded cells between the two methods. While CD4<sup>+</sup> cells bearing Vβ1, Vβ13.1 and Vβ18 proliferated preferentially by method A, those positive for Vβ8, Vβ14 and Vβ22 expanded significantly by method B (Fig. 3C). Additionally, we found that 95% of CD8<sup>+</sup> cells were positive for Vβ3 in method A, and 65% were Vβ5.1 in method B (Fig. 3D). The highly skewed TCR-Vβ repertoire of the skin-derived cells and their remarkable difference from the circulating lymphocytes suggest special compartmentalization of skin-specific T cells.

*Relevance of lymphocytes derived from inflammatory skin lesions*

To investigate whether the lymphocytes expanded from skin lesions by these two methods were pathogenic, we investigated the immune responses of expanded lymphocytes to causative antigens in the tuberculin reaction and drug eruption. Despite an absence of proliferative response in the culture without PPD or APCs, irrespective of their CD4 or CD8 expression, CFSE-labelled cells expanded from the tuberculin reaction by method A were proliferating in response to PPD antigens, but not to tetanus toxoid (TT) in the presence of autologous APCs (Fig 4a). The cells expanded from normal skin in the tested individual did not respond to PPD. In the same way, we found drug-specific proliferation of skin-resident cells from salazosulfapyridine-induced eruption lesion by method B (Fig 4b), although CD4<sup>+</sup> cells predominantly expanded rather than CD8<sup>+</sup> cells (data not shown). These observations indicated that the cells expanded from skin lesions by our methods contained antigen-specific T cells in the antigen-driven skin diseases.

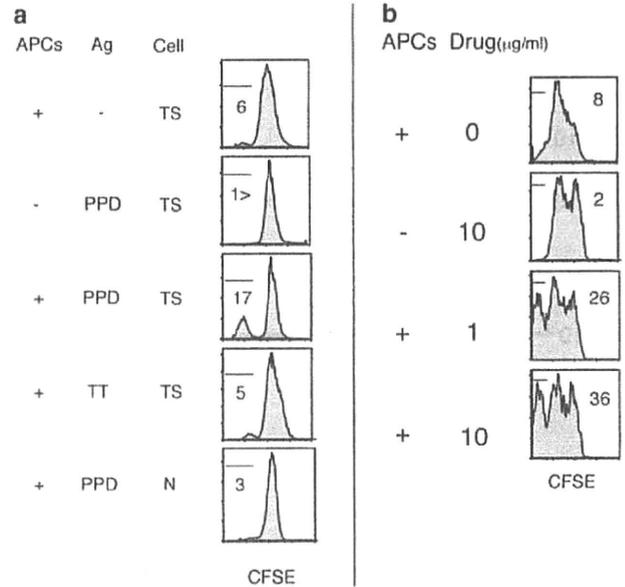


Fig. 4. Antigen response of the expanded cells by (a) method A and (b) method B in inflammatory conditions. After labelling with 5-or 6-(N-succinimidylloxycarbonyl)-fluorescein 3',6'-diacetate (CFSE), the expanded cells were cultured for 72 h with or without antigen-presenting cells (APCs) and in the presence of antigens, followed by FCM analysis. (a) Proliferation of the cells expanded by method A from positive tuberculin test site (TS) in response to PPD antigens. +: added; -: not added; TT: tetanus toxoid; N: cells expanded from normal site near the positive test site in the same individual. Number indicates percentage of total cells. (b) Proliferation of the cells expanded by method B from the drug eruption lesion in response to the culprit drug, salazosulfapyridine (drug, 0, 1 and 10 μg/ml). +: added; -: not added. Numbers indicate percentage of total cells.

*Transient expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells by high level of IL-2 and anti-CD3/CD28 microbeads*

A high level of IL-2 promotes vigorous expansion of natural regulatory T cells (Tregs), being parallel to augmentation of an anti-tumour effect in patients with cancer (5, 6). Because of the high IL-2 level in method A, we investigated the number of Tregs among CD4<sup>+</sup> cells expanded from various disease skins including AD (n = 5) and psoriasis (n = 4) by enumeration of cells co-expressing CD25 and Foxp3 (6). In method A, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cell population was 5.0% ± 4.7% (mean ± SD) at day 10–13 (Fig 5A–C) and significantly increased to 23.2% ± 17.4% from day 14 to day 20, while they decreased to 7.9% ± 6.7% after day 21 and disappeared after day 35. In cultures from AD lesions, comparable increments of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells were found between methods A (40.1%) and B (32%) at day 16.

*Cytotoxic activity of blood lymphocytes against expanded skin-resident cells*

We investigated the cytotoxic activity of blood lymphocytes against expanded cells from skin lesions of AD

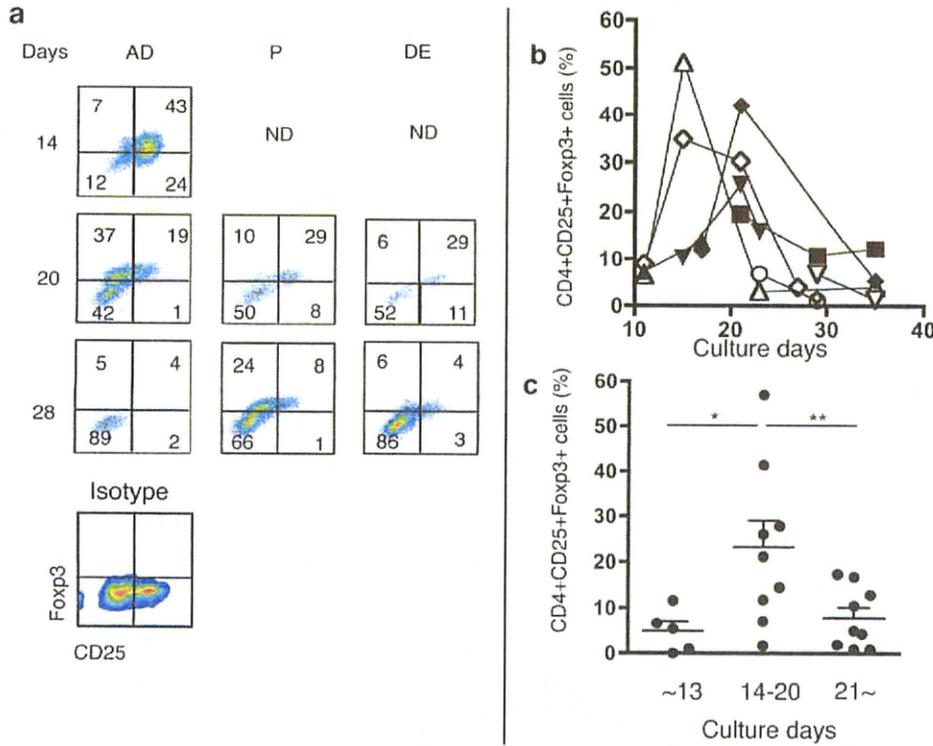


Fig. 5. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells during cultures. (a) Percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells in cells expanded by method A from skin lesions of atopic dermatitis (AD), psoriasis (P) and drug eruption (DE) during culture. After reaction with fluorescence-conjugated Abs against CD4, CD25 and Foxp3, cells were analysed with FCM at the gate of CD4<sup>+</sup> lymphocyte population. Numbers indicate gated population in the total cells. Representative results shown. (b) Percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells in cells expanded from atopic dermatitis (*n*=5, open symbols) and psoriasis (*n*=4, filled symbols) lesions by method A during culture. (c) Percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells in cells expanded by method A during culture. Plots include all data for various skin diseases (*n*=10) in this study (some values are missing). \**p*<0.02, \*\**p*<0.03. Mann-Whitney *U* test. ND: not done.

(*n*=6), psoriasis (*n*=4) and a positive tuberculin test. However, no cytotoxic activity was detected.

DISCUSSION

In order to obtain a large number of skin-resident T cells, we established two methods of expanding T-cell lines from 23 out of 26 skin pieces, including AD, drug eruption, psoriasis, acute/chronic dermatitis, pityriasis lichenoides, PPD reaction and normal skin. Our methods rendered more than 10<sup>7</sup> cells for 21 days, and are superior to the previous “gold-standard” method of Cavani et al. (7) and the recently-developed method that can propagate at most 2.5 × 10<sup>5</sup> cells from a skin sample for 21 days (8).

Although large numbers of skin-resident T cells could be used to obtain a direct insight into the mechanisms central to the skin disease in question, it is practically difficult to obtain high numbers of such cells. Only low numbers of skin-resident cells are obtained using pre-existing methods of mechanical dissociation combined with chemical reagents (2, 8), and the cells need to be expanded in culture in order to obtain larger numbers to analyse the cell functions, as in the case of establishing T-cell clones and lines with complicated culture techniques (8). To overcome these issues, researchers have developed various methods, including cell culture with a high-dose of IL-2 alone (9), plus IL-4 (10–13) and special devices (3, 7). However, these methods cannot ensure that the expanded cells are relevant to pathogenic

cells in the skin. The present study clearly showed the functional relevance of expanding skin cells.

A difference of our methods from those of others is that the skin specimens are placed floating in the medium in a 25 ml flask. Intact skin explants may supply skin tissue-releasing factors that are important for survival and proliferation of skin-resident lymphocytes such as IL-7 (7). Considering that maintaining the viability of cultured lymphocytes usually requires cell-cell contact, the cell density in our methods may be low, since lymphocytes emigrated from skin pieces are less than 100 cells in 10 ml culture media on the first day, suggesting that high cell density is not important to expand the skin-resident cells using our methods. One explanation may be that our culture conditions prevent skin-resident lymphocytes from the inhibitory effects of skin-resident Tregs.

We observed a phenotypic divergence from CD4-dominance to CD8-dominance among the expanding cells between day 18 and 28 in method A, confirming a previous report (12), with a transient increase in CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs preceding this phenomenon. It has been shown that high IL-2 treatment propagates natural Tregs, but that they lose their function simultaneously, being paralleled with augmentation of cytotoxicity against cancer cells (5, 14). Alternatively, the high level of IL-2 in method A may promote early incrementation of CD4<sup>+</sup> cells that predominantly express high-affinity IL-2 receptors and, subsequently, an expansion of CD8<sup>+</sup> cells that predominantly express low-affinity IL-2 receptors, which might depend on

their profile of IL-2 receptor expression (15). Although method A is a very simple way to obtain a large number of skin-resident cells, including Tregs, it must be noted that these cells may be phenotypically and functionally biased under Th2 cytokine condition. On the other hand, method B is useful for functional investigation of skin-resident lymphocytes, although repeated stimulations with anti-CD3/CD28 microbeads are necessary for propagation.

Easy isolation and expansion of skin-resident cells will enable further investigation of how T cells contribute to cutaneous pathology in skin diseases; the two methods described here will be a beneficial strategy for use in investigating this issue.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This study was partially supported by funding from the Danish Dermatological Association.

*The authors declare no conflict of interest.*

#### REFERENCES

1. Wittmann M, Werfel T. Interaction of keratinocytes with infiltrating lymphocytes in allergic eczematous skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6: 329–334.
2. Schaerli P, Britschgi M, Keller M, Steiner UC, Steinmann LS, Moser B, et al. Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. *J Immunol* 2004; 173: 2151–2158.
3. Clark RA, Chong BF, Mirchandani N, Yamanaka K, Murphy GF, Dwigert RK, et al. A novel method for the isolation of skin resident T cells from normal and diseased human skin. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1059–1070.
4. Hashizume H, Takigawa M, Tokura Y. Characterization of drug-specific T cells in phenobarbital-induced eruption. *J Immunol* 2002; 168: 5359–5368.
5. Wei S, Kryczek I, Edwards RP, Zou L, Szeliga W, Banerjee M, et al. Interleukin-2 administration alters the CD4+FOXP3+ T-cell pool and tumor trafficking in patients with ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 7487–7494.
6. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006; 126: 375–387.
7. Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani F, Albanesi C, Girolomani G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 295–302.
8. Yamanaka K, Clark R, Rich B, Dwigert R, Hirahara K, Hurwitz D, et al. Skin-derived interleukin-7 contributes to the proliferation of lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2006; 107: 2440–2445.
9. Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, et al. CCR7 expression and memory T-cell diversity in humans. *J Immunol* 2001; 166: 877–884.
10. Aiba S, Tagami H. In vitro propagation of tissue-infiltrating lymphoid cells from lesional skin by culture in IL 2-containing medium. *Acta Derm Venereol* 1986; 66: 391–397.
11. Reinhold U, Kukel S, Goeden B, Neumann U, Wehrmann W, Kreysel HW. Interleukin-4 promotes the expansion of skin-infiltrating lymphocytes from atopic dermatitis in vitro. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 370–375.
12. Kalfott K, Bisballe S, Dyrberg T, Boel E, Rasmussen PB, Thestrup-Pedersen K. Establishment of two continuous T-cell strains from a single plaque of a patient with mycosis fungoides. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992; 28A: 161–167.
13. Bang K, Lund M, Mogensen SC, Thestrup-Pedersen K. In vitro culture of skin-homing T lymphocytes from inflammatory skin diseases. *Exp Dermatol* 2005; 14: 391–397.
14. Thestrup-Pedersen K, Parhar R, Wu K, Bertilsson PA, Meyer B, Abu-Amero S, et al. Skin-homing CD8+ T lymphocytes show preferential growth in vitro and suppress CD4+ T-cell proliferation in patients with early stages of cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol* 2007; 87: 118–126.
15. Elkord E. Role of regulatory T cells in allergy: implications for therapeutic strategy. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006; 5: 211–217.
16. Ohashi Y, Takeshita T, Nagata K, Mori S, Sugamura K. Differential expression of the IL-2 receptor subunits, p55 and p75 on various populations of primary peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1989; 143: 3548–3555.