

に多臓器型となることもあるため、注意深い経過観察が望ましい。

7) 「再燃した小児 LCH に対するビスフォスフォネート治療の日本における全国調査」

Nationwide survey of bisphosphonate therapy for children with reactivated Langerhans cell histiocytosis in Japan.

Morimoto A, et al. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Jan; 56(1):110-5.

【背景】いくつかの研究によって、ビスフォスフォネート治療が LCH に効果的であることが示唆されている。しかし、小児 LCH に対するビスフォスフォネート治療の有効性と安全性については明らかではない。

【方法】ビスフォスフォネート治療を受けた小児 LCH 症例のデータを日本小児白血病/リンパ腫研究グループに参加する病院から後方視的に収集した。【結果】組織学的に証明された 21 例の小児 LCH 症例が見つかった。これらのうち、再燃 LCH に対して、パミドロネート治療が行われた 16 例の臨床データを詳細に分析した。パミドロネート治療後の観察期間の中央値は 2.8 年(範囲:0.9~9.3 年)であった。パミドロネート治療の開始時年齢の中央値は 9.4 歳(範囲:2.3~15.0 歳)であった。全例に、1 つまたは複数の骨病変があったが、リスク臓器浸潤を伴う例はなかった。多くの症例において、パミドロネート治療は 1.0 mg/kg/コースの用量で、4 週間隔で 6 コース投与されていた。16 例中 12 例で、皮膚病変(3 例)と軟部組織病変(3 例)含む、すべての活動性病変が消失した。これらのうち、8 例はパミドロネート治療後、中央値 3.3 年(範囲:1.8~9.3 年)の時点で、活動性病変はなかった。無増悪生存率は、3 年の時点で 56.3±12.4%であった。無増悪生存率は、2 回目以降の再燃例と比較し、1 回目の再燃例において有意に高かった。【結論】パミドロネート治療は、骨病変を有する再燃 LCH に対して効果的な治療法かもしれない。小児の再燃 LCH に対するパミドロネート治療の有効性を検証する前方視的臨床試験の実施が望まれる。

9) 「LCH と Rosai-Dorfman 病の共存：まれに 2 つの組織球性疾患が関連する可能性」

Co-occurrence of Langerhans cell histiocytosis and Rosai-Dorfman disease: possible relationship of two histiocytic disorders in rare cases.

O'Malley DP, et al. *Mod Pathol*. 2010 Dec; 23(12):1616-23.

8) 「LCH の発症機序における p16 の役割」

Role of p16 in the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis.

Kim SY, et al. *Korean J Hematol*. 2010 Dec; 45(4):247-52.

【背景】細胞レベルでの遺伝子変異が、LCH 細胞の増殖とアポトーシスを制御する細胞機構に大きな影響があるかもしれないという仮説が立てられている。

【方法】p16 蛋白の発現が LCH 症例の予後の予測に有用かどうかを調べた。1998 年 3 月~2008 年 2 月の間にアサン医療センターとチュンナム大学病院で LCH と診断され経過観察されている小児の保存パラフィンブロックを検討した。【結果】標本を p16 抗体で染色し、LCH 細胞の染色性を以下の尺度を用いて半定量的に評価した、すなわち、陰性：無染色、±：弱陽性、1+：周囲のリンパ球と同程度に染色、2+：リンパ球よりも強い染色、3+：リンパ球よりはるかに強い染色。陰性と±を低発現グループに、1+と 2+、3+を高発現グループとした。51 例(男児 27、女児 24)の年齢の中央値は 49 か月(範囲:0.6~178 か月)で、LCH は CD1a 陽性に基いて診断された。p16 蛋白は、1 例を除いて、様々な程度で発現していた。多臓器型、リスク臓器浸潤および再燃の頻度は、低発現グループに比べ高発現グループで高い傾向があった。【結論】p16 蛋白は LCH 細胞の増殖とアポトーシスを制御する細胞機構に大きな影響を与える可能性があり、したがって、LCH の臨床転帰と予後に影響を及ぼす可能性がある。

10) 「成人 LCH の内分泌学的症候」

Endocrine manifestations of Langerhans cell histiocytosis diagnosed in adults.

García Gallo MS, et al. *Pituitary*. 2010 Dec; 13(4):298-303.

LCH は、病因不明のまれな肉芽腫性疾患である。我々

Rosai-Dorfman 病と LCH は、両者ともに免疫補助細胞の異常である。今までに、Rosai-Dorfman 病と LCH が共存した症例が 2 例報告されている。我々は、さらに 9 例を追加し、特徴的な臨床像といくつかの分子学的研究を報告する。組織学的な検討を行った。スライドまたはブロックが使用可能であったすべての症例において免疫組織化学的染色を行った。CD1a、S-100、CD3、CD20、langerin、CD68、CD163、CD21、CD35 および CD123 の免疫組織化学的染色を組み合わせを行った。高解像度アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーションを、5 症例の 6 検体で行った。7 例が女性で 2 例が男性、平均年齢は 25 歳(範囲：15 か月～59 歳)であった。大半の症例で、病変はリンパ節であった。LCH の部分では、好酸球浸潤を伴い、「コーヒー豆」様の異型性のない核と明るい細胞質の LCH 細胞が存在する典型的な組織像を示していた。免疫染色の所見も典型的で、CD1a、S100、CD68 と langerin が陽性であった。Rosai-Dorfman 病の部分では、全例において細胞内細胞貫入現象がみられた。細胞は中型から大型で、大きな円形の核と明るいまたは淡い広い細胞質を伴っていた。病変部位の細胞は S100、CD68、CD163 陽性であったが、langerin や CD1a は発現していなかった。アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーションでは、6 検体中 4 検体で増幅および/または欠失を示した。1 検体では、増幅も欠失も見られなかった、もう 1 検体では LCH の部分では増幅および欠失を認めたが、Rosai-Dorfman 病の部分では異常がみられなかった。これらの知見は、以前の LCH の研究において報告された結果に一致した。我々は、LCH と Rosai-Dorfman 病の共存例の臨床的および病理学的所見を報告した。さらに、我々の症例に基づけば、この 2 疾患が共存している場合には、病態生理学的に関連している可能性が示された。

は、病理組織学的に LCH と診断された、4 例(男性 3、女性 1)、平均年齢 33.5 歳(範囲：21-40 歳)のデータを後方視的に解析した。全例に内分泌障害を示唆する症状を認めた。主訴は、2 例が甲状腺腫大、3 例が多飲多尿であった。LCH の診断より前に、2 例に尿崩症と性腺機能低下症の症状があったが原因は精査されていなかった。症状の発症から LCH 診断までの期間は平均 6.25 年(範囲：2～13 年)であった。病理組織学的診断は、2 例は甲状腺全摘術、1 例は皮膚病変生検、もう 1 例は下垂体茎生検によって確定されていた。最初の 2 例は、細針吸引生検により分化型甲状腺癌であると誤って診断されて手術適応となり、免疫組織化学検査によって LCH と確定診断された。3 例が化学療法で治療された、そのうちの 1 例は、すでに視床下部-下垂体領域に放射線療法を受け、放射線照射後の下垂体機能低下症を発症していた。

第 19 回 最新学術情報(2012. 03) 最近掲載された LCH 関連の論文抄録を紹介します。

1) 「視床下部-下垂体病変を有する成人発症 LCH 患者の治療」

Treatment of patients with hypothalamic-pituitary lesions as adult-onset Langerhans cell histiocytosis.

Imashuku S, et al. Int J Hematol. 2011 Dec;94(6):556-60.

視床下部-下垂体部位に中枢神経系病変のある成人発症 LCH の 4 例を報告する。初発症状は、2 例が尿崩症、

2) 「肺 LCH における気管支肺胞洗浄液のプロテオーム解析」

Proteome analysis of bronchoalveolar lavage in pulmonary langerhans cell histiocytosis.

Landi C, et al. J Clin Bioinforma. 2011 Nov 10;1:31.

【背景】肺 LCH は、遠位気管支の壁にランゲルハンス細胞が集積し肉芽腫を形成する、まれな間質性肺疾患である。肺 LCH はびまん性肺疾患で、病因として喫煙

1例が甲状腺機能低下症、1例が性欲減退/勃起不全であった。初期には中枢神経系病変がLCHによる二次的なものと疑われないために診断は遅れ、症状の出現から治療までの年数の中央値は3.0年(範囲: <1~5.3年)であった。3例で、化学療法によって腫瘍は著明に縮小したが、すべての患者で下垂体機能は低下したままであった。成人の中枢神経LCH患者の転帰を改善するためには、早期の診断と治療開始が必要である。

3) 「多発椎体病変を有するLCH」

Langerhans cell histiocytosis with multiple spinal involvement.

Jiang L, et al. Eur Spine J. 2011

Nov;20(11):1961-9.

多発椎体LCHの臨床・放射線所見、治療転帰を明らかにする。我々の施設の計42例の椎体LCH症例を再検討したところ、5例に多発椎体病変があった。多発椎体LCHの論文報告は50例あった。我々の例を含めた全例の年齢、性別、臨床・放射線所見、治療と転帰を分析した。我々の5例のうち、3例に神経症状、4例に軟部組織腫瘍、3例に後弓への進展を認めた。8つの大きなケースシリーズのデータをまとめると、椎体LCHの27.2%が多発性であった。これらの55例は、女性が26例、男性が29例で、平均年齢は7.4歳(0.2~37歳)であった。計182か所の椎体病変を認め、頸椎が28.0%、胸椎が47.8%、腰椎が24.2%であった。椎体以外の病変を54.2%に、内臓病変を31.1%に、扁平椎を50%に認めた。ほとんどの例で、傍椎椎や硬膜

が関連しているが、そのほかはまだよくわかっていない。【方法】本研究では、肺LCHの発症メカニズムの知見を得る、肺LCHの疾患感受性に対する喫煙の影響を研究する、新しいバイオマーカーを見出すことを目的に、肺LCH患者・健康な喫煙者・非喫煙者(対照)のBALタンパク質の組成をプロテオミクスによって分析した。【結果】二次元電気泳動と画像解析によって、被験者の3グループで異なる発現(定量的、定性的)を示すタンパク質が明らかになった。これらのタンパク質は質量分析により同定され、様々な機能(酸化防止、炎症性、抗プロテアーゼ作用)を持ち、由来は様々(血漿、局所産生など)であった。多くのタンパク質、例えばプロテアーゼ阻害剤(ヒトserpin B3)や抗酸化タンパク質(グルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシシン)などは、既に肺LCHの病因として関連が報告されていたが、他のタンパク質は今まで肺LCHとの関連は報告されていなかった。興味深いことに、多数の血漿タンパク質の分解断片(キニノゲン-1N断片とハプトグロビンを含む)も同定され、この炎症性肺疾患においてタンパク質分解活性が増強していることが示唆された。3つのグループ間でタンパク質発現が異なることが主成分分析により確認された。

【結論】肺LCH患者と喫煙者、非喫煙者(対照)のBALプロテオームの分析は、この稀な、びまん性肺疾患の病因メカニズムの研究やバイオマーカーの同定のために有用であることが証明された。

4) 「9例の成人LCHにおける骨盤と四肢骨の放射線学的所見」

Radiologic findings of adult pelvis and appendicular skeletal Langerhans cell

histiocytosis in nine patients.

Song YS, et al. Skeletal Radiol. 2011

Nov;40(11):1421-6.

【目的】成人LCHの骨盤と四肢骨格の放射線所見を、CTおよびMR所見を重視して評価する。【対象および方法】病理学的に証明された9例のLCH患者(男性5例、女性4例、平均年齢37.11歳)の画像を後方視的に検討した。画像解析は、長管骨と扁平骨に限定した。CTスキャンは5例に、MRIは8例で行われた。CTとMRIによって以下の点について画像評価をおこなった: 病変の位置と数、皮質の破壊・骨内膜の非薄化・骨膜反応の有無(CTまたはMRIで評価)、軟部組織腫瘍の辺縁・骨髄浮腫の有無・“出芽”様変化(MRIで評価)、硬化縁または中隔形成の有無(CTで評価)。

【結果】骨病変部位は、骨盤7例、大腿骨5例、上腕

外の進展の記載はなかった。開放生検をされた8例を含め、47例で病理診断が行われていた。治療法は、施設ごとに様々であった。1例が死亡、2例が再発し、それ以外の例は平均観察期間7.2年（範囲1～21年）で無病生存していた。無症候性の椎体病変は装具を装着したりして無治療経過観察できるかもしれないが、多発病変に対しては化学療法への適応がある。外科的減圧術は、神経学的症状が放射線治療に反応しない、または、放射線治療をするにはあまりにも急速に進行するような稀な例に止めるべきである。

5) 「LCHの初発症状として中枢性尿崩症：26例の小児と青年の自然経過と医学的評価」

Central diabetes insipidus as the inaugural manifestation of Langerhans cell histiocytosis: natural history and medical evaluation of 26 children and adolescents.

Marchand I, et al. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Sep;96(9):E1352-E1360.

【背景】孤発性の中枢性尿崩症（CDI）は、LCHの初発症状となることがあり、未分化胚細胞腫や他の炎症性病変との鑑別が困難なことがある。【方法】2010年、フランス国立LCH登録に18歳未満のLCH患者が1236例登録された。26例では孤発性のCDIがLCHの初発症状であった。それらの例の臨床像とMRI所見を再検討した。【結果】CDI診断時の年齢の中央値は9.6歳（1.8～16.3歳）、CDI診断後の経過観察の中央値は9.9年（3.5～26.6年）であった。CDIに加えて、2例に視野欠損、4例に二次性無月経、11例に下垂体前葉欠損症があった。22例の患者でCDIの診断から3か月以内に脳画像検査（2例のCT検査を含む）が行われ、14例で下垂体茎の肥厚（3.0～7.0mmの軽度肥厚が9例、>7.0mmの著明肥厚が5例）を認め、8例において、病変は第三脳室底に進展していた。1例では、軽度のトルコ鞍の拡大を示した。経過観察中、22例の患者において、下垂体以外の病変（骨病変が15例、肺病変9例、皮膚病変9例）を認めた。下垂体生検は8例に行われ、6例で診断が確定した。【結論】下垂体茎の肥厚は、第三脳室底に進展する病変と同様にLCHで認められる。1例を除き、トルコ鞍の拡大は認められなかった。骨、皮膚、肺病変の出現に細心の注意をしながら長期的に経過観察することにより、LCHの診断につながる可能性がある。

7) 「IL-17AのmRNAとタンパクともにLCHの病変で検出できない」

骨2例、脛骨2例、腓骨1例、鎖骨1例、肩甲骨1例、胸骨1例であった。骨内膜の非薄化、骨膜反応、および出芽様変化は、MRIやCTでよくみられた。皮質の破壊や軟部組織腫瘍の形成は稀であったが、軟部組織腫瘍の辺縁は明瞭であった。【結論】CTやMRIでの、骨内膜の非薄化と骨膜反応を伴った出芽様変化は、成人患者において悪性腫瘍とLCHの鑑別に有用な所見と考えられる。

6) 「LCH診断時の疾患活動性の新しい臨床スコア」

New clinical score for disease activity at diagnosis in Langerhans cell histiocytosis.

Choi WI, et al. Korean J Hematol. 2011 Sep;46(3):186-91.

【背景】LCHの臨床症状と経過は、単発性で自然治癒する骨病変から、リスク臓器浸潤を有する多臓器疾患に至るまで、さまざまである。LCHの治療は、無治療経過観察から集中的な多剤併用療法まで幅広く、骨髄移植が行われる例もある。LCH患者の疾患活動性を評価するための客観的なスコアを作成する必要がある。LCHの臨床転帰を予測し、臨床経過と相関する、診断時の疾患活動性を評価する新しい臨床スコアを提案する。【方法】1998年3月から2009年2月の間に峨山医療センターと漢陽大学病院でLCHと診断された小児から得られた臨床データを後方視的に検討した。スコアシステムは、基本的な生物学的データ、X線所見、および身体所見をもとに作成され、133例の患者情報を含むデータベースに適用された。【結果】133例（男性74、女性59）の年齢の中央値は52か月（範囲：0.6～178か月）であり、CD1a陽性に基づいてLCHと診断された。診断時のスコアの分布は非常に非対称であった：スコア1～2が75.9%、スコア3～6が15.8%、スコア>6が8.3%であった。初期のスコア>6の患者は、再燃および晩期合併症を伴う率が高かった。【結論】この新しいLCHの疾患活動性スコアは、診断時および経過観察時の両方で、疾患の重症度を評価するための客観的な指標となる。

8) 「チロシンホスファターゼSHP-1は、免疫組織染色により、単一臓器に比べて多臓器LCHで高発現してい

Neither IL-17A mRNA nor IL-17A protein are detectable in Langerhans cell histiocytosis lesions.

Peters TL, et al. Mol Ther. 2011 Aug;19(8):1433-1439.

LCHは、CD207/ CD1a 陽性樹状細胞を含む多種の細胞浸潤病変により、重大な障害や死亡をもたらすことを特徴とするまれな疾患である。LCHの病因ははまだ推論の域を出ず、その起源が腫瘍であるか炎症性であるか、何十年も前から議論されている。最近の研究では、LCHの病変部位の樹状細胞だけでなく、活動性病変のある患者の血漿中からも、多量のインターロイキン-17 (IL-17A) タンパクが同定されている。さらに、樹状細胞が IL-17A 発現の新たな源として同定されている。しかし、その後の我々の研究では、LCH病変内の CD207 陽性樹状細胞や CD3 陽性 T 細胞に IL-17A の遺伝子発現を確認することはできなかった。本研究では、さらに検討をしたが再び LCH 病変部位において IL-17A 遺伝子発現を同定することができなかった。さらに、ウエスタンブロッティング、免疫沈降、スペクトル解析、酵素免疫測定法 (ELISA) によっても LCH 病変容解物中に IL-17A 抗原を検出することができなかった。また、LCH 病態に IL-17A 仮説を打ち立てた元研究で使用された抗体は非特異的タンパク質を認識することが、ウエスタンブロット、免疫沈降、および ELISA による実験で示された。IL-17A が LCH において重要な要因であるという証拠はまだ不十分であり、IL-17A を標的とした臨床試験は不当だと結論する。

9) 「中枢神経系 LCH に対する 15 年間の静脈内免疫グロブリンによる治療」

Fifteen years of treatment with intravenous immunoglobulin in central nervous system Langerhans cell histiocytosis.
Gavhed D, et al. Acta Paediatr. 2011 Jul;100(7):e36-9.

【目的】中枢神経系 LCH (CNS-LCH) はしばしば進行性である、運動失調、構音障害、嚥下障害、筋緊張亢進、知的障害や行動異常等の神経学的症状を臨床的特徴とする神経炎症疾患であるが、広く受け入れられている治療は現在ない。我々は進行性の CNS-LCH 患者に免疫調整/抗炎症治療を適用した。【方法】画像によ

る」

Tyrosine phosphatase SHP-1 is expressed higher in multisystem than in single-system Langerhans cell histiocytosis by immunohistochemistry.
Murakami I, et al. Virchows Arch. 2011 Aug;459(2):227-234.

LCHは、ランゲルハンス細胞様の CD1a 陽性細胞 (LCH 細胞) が増殖する原因不明の疾患である。LCHには、予後良好な単一臓器 LCH (LCH-SS) と予後不良の多臓器 LCH (LCH-MS) のタイプがある。LCHは、LCH細胞のモノクローナルな特性から、腫瘍性疾患と考えられている。チロシンホスファターゼ SHP-1 の発現レベルは腫瘍において様々で、卵巣癌では過剰発現 (発がん蛋白候補)、胃癌、前立腺癌、悪性リンパ腫、白血病ではメチル化による発現抑制 (がん抑制遺伝子と推定) と報告されており、本研究は、LCHにおける SHP-1 発現を調べることを目的とした。LCH (LCH-SS=21 例、LCH-MS=12 例)、皮膚病性リンパ節症 (9 例)、LCH 病変部位の近くの正常表皮のランゲルハンス細胞 (3 例) で、SHP-1 の発現量を免疫組織化学によって比較した。免疫組織化学の結果は半定量的に Photoshop のソフトウェアを用いて分析した。皮膚病性リンパ節症、LCH-SS、LCH-MS、およびランゲルハンス細胞の平均強度スコア (IS) はそれぞれ、47、100、139、および 167 (任意単位) であった。IS 値には、LCH-SS、LCH-MS、および皮膚病性リンパ節症の間で有意な差があった ($p < 0.01$)。SHP-1 は、LCH-SS に比べ LCH-MS で有意に高く発現していた。SHP-1 は、LCH の病変進行マーカーとなるかもしれない。SHP-1 は、正常リンパ節 LCH と皮膚病性リンパ節症の鑑別にも有用である。

10) 「内視鏡による LCH の生検：内視鏡生検による著明な圧座アーティファクト」

Langerhans cell histiocytosis in endoscopic biopsy: marked pinching artifacts by endoscopy.
Noh S, et al. Brain Tumor Pathol. 2011 Jul;28(3):285-9.

鞍上部腫瘍を診断する際に様々な疾患を考慮する必要がある。尿崩症は、視床下部-下垂体系に浸潤した LCH 患者の初発症状となることが報告されており、LCH の診断に役立つ。鞍上部腫瘍に対して内視鏡生検を用いることが多くなっている。しかし、アーティファクトが多いために内視鏡下生検で診断することが困難であり、病理医は注意しなければならない。単独病変

り病変が確認されている重症の神経変性 CNS-LCH 患者に対し、免疫グロブリン静脈療法 (IVIg) を 15 年間、毎月行った。【結果】IVIg の治療中、当初は神経学的所見の進行が止まった様に見えたが、時間経過とともにさらにいくらか進行した。【結論】IVIg が部分的に CNS-LCH の神経変性の進行を抑えるのに有益かもしれないが、さらなる研究が必要である。

として視床下部-下垂体系に浸潤する LCH はまれである。神経科医、放射線科医、および病理医に様々な示唆を与える 8 例を報告する。

第6回 LCH全国患者会プログラム

日時： 2011年8月7日(日) 10:15~16:45(開場 10:00)

場所：エッサム本社ビル3階 グリーンホール

〒101-0041 東京都千代田区神田須田町1-26-3

10:15~12:00 午前の部 成人発症LCHと小児LCH患者の成人期への移行

座長 天野美知子(患者会)

森本哲(自治医科大学)

10:15~10:30 患者会役員・医師世話人・LCH研究会会長 挨拶

10:30~11:00 成人参加者の簡単な自己紹介(紹介文書参照)

11:00~11:20 講演 成人LCHの基礎的・臨床的諸問題(仮題)

東條有伸(東京大学医科学研究所・血液内科)

11:20~12:00 追加発言：質問と討論等

12:00~12:30 昼食休憩

12:30~16:45 午後の部

12:30~12:40 役員のご挨拶と出席医師の紹介

LCHとはどんな病気？(臨床と臨床研究の現状) 座長 工藤寿子(静岡子ども病院)

12:40~13:00 講演 LCH研究と治療の現状(仮題)

森本 哲(自治医科大学)

13:30~14:00 講演 LCHの病像：国立成育医療センター100人

塩田曜子(成育医療研究センター)

14:00~14:15 休憩

14:15~15:00 特別講演

尿崩症と視床下部・下垂体障害のホルモン補充療法

—特に成長期から成人に至るホルモン補充療法の留意点について—

岡本新悟先生(岡本内科こどもクリニック)

15:00~16:45 全体討論 座長 天野美知子(患者会代表)

前田美穂(日本医科大学小児科)

恒松由記子(こども教育宝仙大学)

LCH患者会、NPO法人日本LCH研究会 共催

厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業

「乳児ランゲルハンス細胞組織球症の標準治療の確立と新規治療法の開発」森本班 後援

乳児 LCH 長期フォローアップガイドライン 2011

国立成育医療研究センター 腫瘍科 塩田曜子

1. はじめに

LCH はさまざまな部位に発症することから、症例ごとに適切な方法と頻度での評価を必要とする。小児期発症の LCH 症例においては、初期に適切な治療が行われても、多くの症例で何らかの晩期合併症が認められる (Haupt R 2004, Lau LM 2008)。多臓器病変例での頻度が高いが、単一病変型においても機能障害を残すことがある。代表的な晩期合併症としては、尿崩症 (Shioda Y 2011) を代表とする視床下部-下垂体障害 (Donadieu J 2004)、難聴 (Nanduri V 2010)、小脳・基底核の変性病変に伴う運動障害や認知障害 (Vrijmoet-Wiersma CM 2009, Imashuku S 2008, Grois N 2010)、整形外科的障害 (Garg S 2004) や各浸潤臓器の障害、二次がんなど、さまざまな病態が挙げられる。これらの合併症は、LCH 診断後から数年経過後に明らかとなることが多く、10 年以上経過して現れる場合もある。また、再燃は診断後 3 年以内に多いが、再燃例には合併症の頻度が高い (Minkov M 2008, Morimoto A 2008)。このように、LCH はほかの小児がんとは異なる性質を持っており、すべての LCH 症例は、長期的なフォローアップを要する。

2. 病変ごとのフォローアップ計画 (表)

LCH の経過は様々であり、標準的なフォローアップ計画を基として、各症例によって適切な評価を適宜加えて行う必要がある。

初期に炎症所見が明らかであった例は、CRP や血沈値などの血液検査の推移が LCH 再燃の指標になることがある。

骨病変は、部位を変えて再燃することがあり注意を要するが、骨痛や局所の腫脹などの症状が参考となる。中耳炎・外耳道炎 (側頭骨病変) をともなう症例は、耳鼻科医による定期的な診察、聴力検査を受けることが望ましい (Nanduri V 2010)。上顎・下顎骨、口腔内病変症例は、歯科での定期的な検診を行う。椎体や大腿骨の骨病変など骨の変形をともなう症例は、成長とともに整形外科的な問題が明らかとなることがあり (Haupt R 2004)、年 1 回程度の整形外科受診が望まれる。

CNS リスク部位 (頭蓋冠以外の眼窩・側頭骨・頭蓋底・上顎などを含む部位) に病変のある例においては、尿崩症やその他の中枢神経病変を合併する頻度が高いことが知られている (Grois N 2006)。LCH の診断時にすでに尿崩症を発症している例もあるが、LCH の治療終了から数年後に尿崩症を生じることもある。尿崩症発症後、さらに数年経過し成長ホルモンをはじめとする下垂体前葉ホルモン異常を合併することがあり (Donadieu J 2004)、長期の内分泌的フォローが必要である。具体的には、定期的な診療の中で、多飲多尿の有無の確認、成長曲線・二次性徴についての評価、血液検査でのホルモン基礎値

の評価などを続ける。成長率の低下や二次性徴の遅延（女児；12歳を過ぎても乳房腫大なし、14歳を過ぎても初潮なし、男児；14歳を過ぎても二次性徴の発現なし）、肥満などを認めた場合には、早期に内分泌専門医による評価が必要となる。

中枢神経変性病変として知られる小脳や基底核の異常は、神経症状出現の数年前からMRI画像の変化を認めるため（Prosch H 2007）、定期的な頭部MRIフォローが必要である。また、画像変化の有無にかかわらず認知障害が問題となる例もあり（Nanduri VR 2003）、精神神経学的評価も重要である。多臓器型あるいはCNSリスク部位に浸潤のあるLCH症例においては、頭部MRI評価（年1回）および精神神経学的評価（就学などにあわせて1-3年ごと）を10年以上の長期にわたって行う必要がある。中枢神経変性病変を認めた場合には、6か月毎に神経学的評価と頭部MRI評価を続ける。

このほかに、過去に行われた治療内容により、免疫機能回復の評価、心機能評価などが必要となる場合がある。

表 治療終了後の検査計画

	多臓器型		多発骨型
	リスク臓器浸潤あり	リスク臓器浸潤なし	
治療終了1年まで			
身体所見	1か月ごと	1-2か月ごと	2-3か月ごと
血液・尿検査	1-2か月ごと	2-3か月ごと	3-6か月ごと
身体計測・二次性徴	6か月ごと	6か月ごと	6か月ごと
骨放射線検査	所見の改善傾向まで3-6か月毎、以降は病変が疑われるとき		
リスク臓器評価	肝エコー・肺CTなど所見にあわせて3-6か月ごと		
頭部MRI	頭蓋内・視床下部-下垂体病変陽性例：NADとなるまで3-6か月ごと 多臓器型の全例およびCNSリスク病変陽性例：年1回		
精神学的検査	多臓器型の全例およびCNSリスク病変陽性例：年1回		
内分泌評価	異常が疑われるとき。		
治療終了1年～2年まで			
身体所見	3か月ごと	3-6か月ごと	3-6か月ごと
血液・尿検査	3-6か月ごと	3-6か月ごと	6か月ごと
身体計測・二次性徴	6か月ごと	6か月ごと	6か月ごと
骨放射線検査	病変が疑われるとき		
リスク臓器評価	肝エコー・肺CTなど所見にあわせて6か月ごと		
聴力・視力検査	CNSリスク病変陽性例：年1回		
頭部MRI	多臓器型の全例およびCNSリスク病変陽性例：年1回		
精神学的検査	頭蓋内病変・視床下部下垂体病変・異常が疑わしい例：年1回		
内分泌評価	異常が疑われるとき		

	多臓器型		多発骨型
	リスク臓器浸潤あり	リスク臓器浸潤あり	
治療終了2年以降10年以上			
身体所見	6-12 か月ごと	6-12 か月ごと	6-12 か月ごと
血液・尿検査	6-12 か月ごと	6-12 か月ごと	6-12 か月ごと
身体計測・二次性徴	6-12 か月ごと	6-12 か月ごと	6-12 か月ごと
骨放射線検査	病変が疑われるとき		
リスク臓器評価	肝エコー・肺CTなど所見にあわせて適宜		
聴力・視力検査	CNS リスク病変陽性例：3年に1回		
頭部MRI	多臓器型の全例およびCNS リスク病変陽性例：2年に1回		
精神学的検査	頭蓋内病変・視床下部下垂体病変・異常が疑わしい例：1-3年ごと		
内分泌評価	異常が疑われるとき		

3. 文献

- Haupt R, Nanduri V, Calevo MG, Bernstrand C, Braier JL, Broadbent V, Rey G, McClain KL, Janka-Schaub G, Egeler RM. Permanent consequences in Langerhans cell histiocytosis patients: a pilot study from the Histiocyte Society-Late Effects Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2004; 42: 438-444.
- Lau LM, Stuurman K, Weitzman S. Skeletal Langerhans cell histiocytosis in children: permanent consequences and health-related quality of life in long-term survivors. *Pediatr Blood Cancer*. 2008; 50: 607-612.
- Shioda Y, Adachi S, Imashuku S, Kudo K, Imamura T, Morimoto A. 9. Analysis of 43 cases of Langerhans cell histiocytosis (LCH)-induced central diabetes insipidus registered in the JLSG-96 and JLSG-02 studies in Japan. *Int J Hematol*. 2011; 94: 545-551.
- Donadieu J, Rolon MA, Thomas C, Brugieres L, Plantaz D, Emile JF, Frappaz D, David M, Brauner R, Genereau T, Debray D, Cabrol S, Barthez MA, Hoang-Xuan K, Polak M; French LCH Study Group. Endocrine involvement in pediatric-onset Langerhans' cell histiocytosis: a population-based study. *J Pediatr*. 2004; 144: 344-350.
- Nanduri V, Tatevossian R, Sirimanna T. High incidence of hearing loss in long-term survivors of multisystem Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2010; 54: 449-453.
- Vrijmoet-Wiersma CM, Kooloos VM, Koopman HM, Kolk AM, van der Laan I, Grootenhuis MA, Egeler RM. Health-related quality of life, cognitive functioning and behaviour problems in children with Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2009; 52: 116-122.
- Imashuku S, Shioda Y, Kobayashi R, Hosoi G, Fujino H, Seto S, Wakita H, Oka A, Okazaki N,

- Fujita N, Minato T, Koike K, Tsunematsu Y, Morimoto A; Japan LCH Study Group (JLSG). Neurodegenerative central nervous system disease as late sequelae of Langerhans cell histiocytosis. Report from the Japan LCH Study Group. *Haematologica*. 2008; 93: 615-618.
8. Grois N, Fahrner B, Arceci RJ, Henter JI, McClain K, Lassmann H, Nanduri V, Prosch H, Prayer D; Histiocyte Society CNS LCH Study Group. Central nervous system disease in Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr*. 2010; 156: 873-881.
 9. Garg S, Mehta S, Dormans JP. Langerhans cell histiocytosis of the spine in children. Long-term follow-up. *J Bone Joint Surg Am*. 2004; 86-A: 1740-1750.
 10. Minkov M, Steiner M, Pötschger U, Aricò M, Braier J, Donadieu J, Grois N, Henter JI, Janka G, McClain K, Weitzman S, Windebank K, Ladisch S, Gadner H; International LCH Study Group. Reactivations in multisystem Langerhans cell histiocytosis: data of the international LCH registry. *J Pediatr*. 2008; 153: 700-705.
 11. Morimoto A, Kobayashi R, Maeda M, Asami K, Bessho F, Imashuku S; Japan LCH Study Group. Impact of reactivation on the sequelae of multi-system Langerhans cell histiocytosis patients. *Pediatr Blood Cancer*. 2008; 50: 931-932.
 12. Grois N, Pötschger U, Prosch H, Minkov M, Arico M, Braier J, Henter JI, Janka-Schaub G, Ladisch S, Ritter J, Steiner M, Unger E, Gadner H; DALHX- and LCH I and II Study Committee. Risk factors for diabetes insipidus in langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2006; 46: 228-233.
 13. Prosch H, Grois N, Wnorowski M, Steiner M, Prayer D. Long-term MR imaging course of neurodegenerative Langerhans cell histiocytosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007; 28: 1022-1028.
 14. Nanduri VR, Lillywhite L, Chapman C, Parry L, Pritchard J, Vargha-Khadem F. Cognitive outcome of long-term survivors of multisystem langerhans cell histiocytosis: a single-institution, cross-sectional study. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 2961-2967.

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Imashuku S, Morimoto A.	Management of Langerhans cell histiocytosis (LCH)-induced central diabetes insipidus and its associated endocrinological/neurological sequelae.	Kamoi K	Diabetes Insipidus	InTech - Open Access Publisher	Croatia	2011	1-10
翁 由紀子、森本 哲.	ランゲルハンス細胞組織球症.	堀部敬三	小児がん診療ハンドブック	医薬ジャーナル社	大阪	2011	395-403

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Imashuku S, Kudo N, Kaneda S, Kuroda H, Shiwa T, Hiraiwa T, Inagaki A, Morimoto A.	Treatment of patients with hypothalamic-pituitary lesions as adult-onset Langerhans cell histiocytosis.	Int J Hematol.	94(6)	556-560,	2011
Kanayama M, Morimoto J, Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Kurotaki D, Ito K, Yoshida T, Uede T.	$\alpha 9 \beta 1$ Integrin-Mediated Signaling Serves as an Intrinsic Regulator of Pathogenic Th17 Cell Generation.	J Immunol.	187(11)	5851-5864	2011
Murakami I, Oka T, Kuwamoto S, Kato M, Hayashi K, Gogusev J, Imamura T, Morimoto A, Imashuku S, Yoshino T.	Tyrosine phosphatase SHP-1 is expressed higher in multisystem than in single-system Langerhans cell histiocytosis by immunohistochemistry.	Virchows Arch.	459(2)	227-234	2011
Shioda Y, Adachi S, Imashuku S, Kudo K, Imamura T, Morimoto A.	Analysis of 43 cases of Langerhans cell histiocytosis (LCH)-induced central diabetes insipidus registered in the JLSG-96 and JLSG-02 studies in Japan.	Int J Hematol.	94(6)	545-551	2011
Uede T.	Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases.	Pathol Int.	61(5)	265-280	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Tyrosine phosphatase SHP-1 is expressed higher in multisystem than in single-system Langerhans cell histiocytosis by immunohistochemistry

Ichiro Murakami · Takashi Oka · Satoshi Kuwamoto · Masako Kato · Kazuhiko Hayashi · Jean Gogusev · Toshihiko Imamura · Akira Morimoto · Shinsaku Imashuku · Tadashi Yoshino

Received: 12 April 2011 / Revised: 6 May 2011 / Accepted: 7 May 2011 / Published online: 22 May 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Langerhans cell histiocytosis (LCH) is a proliferative disorder of Langerhans cell (LC)-like CD1a-positive cell (LCH cell) with unknown causes. LCH consists of two subtypes: single-system LCH (LCH-SS) with favorable prognosis and multisystem LCH (LCH-MS) with poor prognosis. LCH has been indicated as a neoplastic disorder from monoclonal characteristics of LCH cells. This study aimed to investigate an expression of tyrosine phosphatase

SHP-1 in LCH, since its expression levels were variously reported in many tumors, overexpression in ovarian cancers (a candidate oncoprotein), and downregulation by methylation in gastric cancers, prostate cancers, malignant lymphomas, and leukemias (a putative tumor suppressor). By immunohistochemistry (IHC), the SHP-1 expression in LCs and LCH cells was compared in LCH (two subtypes: LCH-SS=21, LCH-MS=12), dermatopathic lymphadenopathy (DLA) ($n=9$) and normal epidermal LCs ($n=3$) near LCH lesion. IHC results were analyzed semiquantitatively using a Photoshop software. The mean intensity score (IS) of DLA, LCH-SS, LCH-MS, and LCs were 47, 100, 139, and 167 (in arbitrary unit), respectively. The IS had significant differences among LCH-SS, LCH-MS, and DLA ($p<0.01$). SHP-1 is expressed significantly higher in LCH-MS than in LCH-SS. SHP-1 can be a progression marker of LCH. SHP-1 is also useful for differential diagnosis between LCH in lymph nodes and DLA.

I. Murakami (✉) · S. Kuwamoto · M. Kato · K. Hayashi
Faculty of Medicine, Division of Molecular Pathology,
Tottori University,
86 Nishi-cho Yonago-shi,
Tottori 683-0834, Japan
e-mail: ichiro.murakami.09@gmail.com

T. Oka · T. Yoshino
Department of Pathology,
Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences,
Okayama, Japan

J. Gogusev
Inserm U90 and U507, Hôpital Necker-Enfants-Malades,
Paris, France

T. Imamura
Department of Pediatrics,
Kyoto Prefectural University of Medicine,
Kyoto, Japan

A. Morimoto
Department of Pediatrics,
Jichi Medical University School of Medicine,
Shimotsuke, Japan

S. Imashuku
Division of Pediatrics and Hematology, Takasago-seibu Hospital,
Takasago, Japan

Keywords Langerhans cell histiocytosis · Tyrosine-protein phosphatase nonreceptor type 6 (PTPN6, SHP-1) · Immunohistochemistry · Photoshop-assisted image analysis · Staining intensity

Abbreviations

B-ALL	B lymphoblastic leukemia
CMYK	Cyan/magenta/yellow/key
IF	Immunofluorescence
IHC	Immunohistochemistry
IS	Intensity score
ISs	Intensity scores
LC	Langerhans cell
LCH	Langerhans cell histiocytosis
LCH cell	Langerhans cell-like CD1a-positive cell

LCH-MS	Multisystem LCH
LCH-SS	Single-system LCH
LCS	LC sarcoma
meV	Viable motheaten mice
MHC	Major histocompatibility complex
PTPN6	Tyrosine–protein phosphatase nonreceptor type 6
SHP-1	Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1
SHPS-1	Substrate of SHP-1
T-ALL	T lymphoblastic leukemia

Introduction

Langerhans cells (LCs) are specialized immature dendritic cells (DCs) in the skin. When LCs encounter exogenous antigens, they capture and process them to generate major histocompatibility complex (MHC)/peptide complexes on their surface. LCs migrate from epidermis to draining lymphoid tissues in order to initiate and present the MHC/peptide complexes to the T cells. During this migration, LCs mature, and the expressions of their cell-surface molecules are changed [1, 2]. Langerhans cell histiocytosis (LCH) is a proliferative disorder of Langerhans cell (LC)-like CD1a-positive cell (LCH cell) with unknown causes. Patients with LCH develop as two clinical subtypes: single-system LCH (LCH-SS) and multisystem LCH (LCH-MS).

LCH tissues are known to have monoclonal characteristics of LCH cells by the *human androgen receptor* gene assay [3, 4]. LCH cells of two LCH patients suffering from T lymphoblastic leukemia (T-ALL) have T cell receptor rearrangement of the same cell origin as T-ALL cells [5]. In addition, LC sarcoma (LCS) cells in a patient who suffered from B lymphoblastic leukemia (B-ALL) were found to have identical immunoglobulin heavy chain rearrangements in both LCS cells and B-ALL cells [6]. Signal transduction pathways, such as the IL-17A-dependent pathway, have been reported to have abnormalities in LCH cells [7, 8]. More recently, *BRAF* mutation (V600E) was reported in 57% of LCH cases [9].

These accumulated data indicate that LCH is a neoplastic disease with abnormalities of signal transduction pathways. Tyrosine–protein phosphatase nonreceptor type 6 (PTPN6, src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1), Hep, HepH, HPTP1C, SH-PTP1, HCP) is known to be one of nonmembranous type phosphatases and plays an important role in many signal transduction pathways especially in hematopoietic neoplasms. Downregulation of SHP-1 was widely reported in lymphomas and leukemias at a high rate by our group and other groups [10, 11], while SHP-1 was overexpressed in epithelial tumors such as

ovarian cancers [12, 13]. In cases of downregulation, epigenetic mechanisms such as methylation have been proposed, and loss of SHP-1 function in cytokine signaling has been shown to have a relationship with neoplastic mechanisms. In contrast, affected signaling events of overexpressed SHP-1 were not known in ovarian cancers [13], although some epithelial cell lines such as 293 cells and HeLa cells, SHP-1 acts positively for stimulation such as epidermal growth factor [14, 15].

LCH cells in LCH-MS are known to have an immature character of LC compared with LCH-SS [16], and one of the substrates of SHP-1, termed as SHPS-1, was reported to regulate the induction of murine LCs into maturation [17]. However, to date, little is known about the role of SHP-1 in both LCs and LCH cells in humans. Such paucity of data has driven us to analyze SHP-1 in human LCs and LCH tissues. We hypothesized that downregulation of SHP-1 might have a role in the pathogenesis of LCH because LC is one myeloid-derived dendritic cell. The objective of the present study was to clarify the relationship of the expression levels of SHP-1 between tissues from patients with LCH-SS and LCH-MS and other control tissues, the dermatopathic lymphadenopathy (DLA) as a control of mature LC, and the epidermal LC as a control of immature LC, using the immunohistochemical method.

Materials and methods

Patients, samples, and clinical data

The study was approved by the Institutional Review Board of Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan. Tissues of LCH were obtained from patients registered with the Japan LCH Study Group (JLSG) between 2002 and 2009. Tissues of DLA and normal skin tissues contained in the dermal tumors (such as dermatofibroma) were from patients who visited Okayama University Hospital between 2002 and 2009. Histological sections and immunohistochemistry (IHC) such as the CD1a of all the specimens were reviewed by pathologists to confirm the diagnosis. Information on patients including laboratory data at onset of disease was obtained from the JLSG registration center and the medical records of patients at Okayama University Hospital. The clinical data are as follows: hemoglobin, platelet, white blood cell, lymphocyte, total protein, albumin, total bilirubin, lactate dehydrogenase, glutamic–oxaloacetic transaminase (aspartate aminotransferase), glutamic pyruvic transaminase (alanine transaminase), C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, and soluble interleukin-2 receptor.

Antibodies for immunofluorescence and immunohistochemistry

Rabbit polyclonal antibody directed against SHP-1 (SH-PTP1 (C-19): sc-287, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) was used at 1:1,600 dilution. Anti-CD1a antibody (monoclonal mouse anti-human CD1a antibody (IgG1, kappa), O10, Dako Japan, Kyoto, Japan) was used at 1:100 dilution.

Immunofluorescence

Tissue samples were fixed in 10% neutral-buffered formalin and embedded in paraffin. Sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded ethanol series. Antigen retrieval was performed by heating slides in 0.01 M citrate-buffered solution, pH 6.0, in a pressure cooker at 98°C for 15 min. The slides were incubated for 1 h in 5% skim milk, then primary antibodies were applied against both SHP-1 and CD1a, and the slides were maintained for 3 h at 37°C. After washing first antibodies, second antibodies, Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG (H+L) and Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) were applied for 1 h at room temperature. Images were captured and analyzed using Image Gauge version 3.3 (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan).

Immunohistochemistry

For IHC, treatment of tissue samples is the same as described in immunofluorescence (IF). For blocking endogenous peroxidase activity, hydrogen peroxide was used. Antigen retrieval and incubation were the same as described. Next, 1 h of incubation of secondary antibody at room temperature and staining were performed using the DAKO EnVision+ system (Dako Japan, Kyoto, Japan) and 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen. The slides were counterstained with hematoxylin. As appropriate, positive controls and negative controls, normal lymph nodes, and skin samples, respectively, were used throughout. An isotype control was not performed.

Digital image capture

Digital images for photomicroscopy of the best-stained area of the sections as representative of the overall immunostaining were acquired with the Olympus DP71 microscope digital camera (Olympus, Tokyo, Japan). All images were obtained using a $\times 40$ objective of the Olympus BX51 microscope. The software used was the Olympus DP2-BSW. For the entire study, the camera was manipulated with manual controls with its auto mode turned off and

used to adjust the image intensity, which was kept at an identical level during the entire study. Conditions were as follows: manual exposure, 720 μ s; ISO 1600; tagged image format, 4,140 \times 3,096 pixel shift. Files were saved in uncompressed TIFF format so that their sizes were fixed to 36.7 MB.

Quantification of immunohistochemical chromogen

The determination of immunostaining intensity was assisted by the use of Adobe Photoshop, version 5.0 J (Adobe Systems Incorporated, Japan office, Shinagawa, Tokyo, Japan) as described by Lehr et al. [18]. Using the magic wand tool in the select menu of Photoshop, the cursor was placed on SHP-1-positive cytoplasm. The tolerance level of the magic wand tool was adjusted so that the entire positive cytoplasm was selected automatically. This selection was confirmed by checking both the selected figure and its inverted figure, which was made using the inverse tool. A yellow optical density plot of the selected area was generated using the histogram tool in the image menu as described by Pham et al. [19]. The mean staining intensity was calculated as follows: intensity score (IS)=255–mean of brightness of yellow channel score on a cyan/magenta/yellow/key color model (in arbitrary unit, AU). Immunohistochemical data as IS (AU) of LC, DLA, LCH-SS, and LCH-MS were plotted using the SPSS software (version 15.0 J, SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan).

Necrosis and mitotic index in LCH specimens

In LCH specimens, we also determined necrosis (+ or –) and mitotic index (mitotic number/10 high-power field using an Olympus BX50 microscope with SWH10X-H/26.5 eyepieces), compared between LCH-SS and LCH-MS subtypes.

Statistical analysis

Analyses were performed using the SPSS software or Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Tokyo, Japan). Comparisons of immunohistochemical data of SHP-1 between LCH and DLA, between LCH-MS and LCH-SS, were performed using Wilcoxon's signed-rank test. Immunohistochemical data of SHP-1 and histological data such as necrosis were compared using Wilcoxon's signed-rank test. The correlation of SHP-1 data, mitotic index, and clinical data were determined using regression analyses. Comparisons of the LCH subtypes and histological data such as necrosis or mitotic index were performed using Fisher's exact test or Wilcoxon's signed-rank test. Differences between values were considered statistically significant at $p < 0.01$ or $p < 0.05$.

Results

Characteristics of patients

The characteristics of patients are summarized in Table 1. The numbers of patients were 21 patients with LCH-SS, 12 patients with LCH-MS, and nine patients with DLA. The median ages of the LCH-SS patients were 6 years 6 months old (range, 0–71 years old). The median ages of the LCH-MS patients were 1 year 6 months old (range, 0–62 years old). The median age of DLA patients was 78 years old (range, 72–87 years old). The male to female ratio of LCH-SS was 16:5. The male to female ratio of LCH-MS was 6:6. The male to female ratio of DLA was 6:3. Epidermal LCs were analyzed from three dermal LCH.

IF: identification of SHP-1-and CD1a-double positive cells

We first demonstrated that CD1a-positive LCs [20] in normal epidermis were proven to express SHP-1 by double staining. Spinous cells showed weak positivity and granular cells showed strong positivity (Fig. 1a).

Quantification of IHC of SHP-1 in epidermal LC, DLA, and LCH

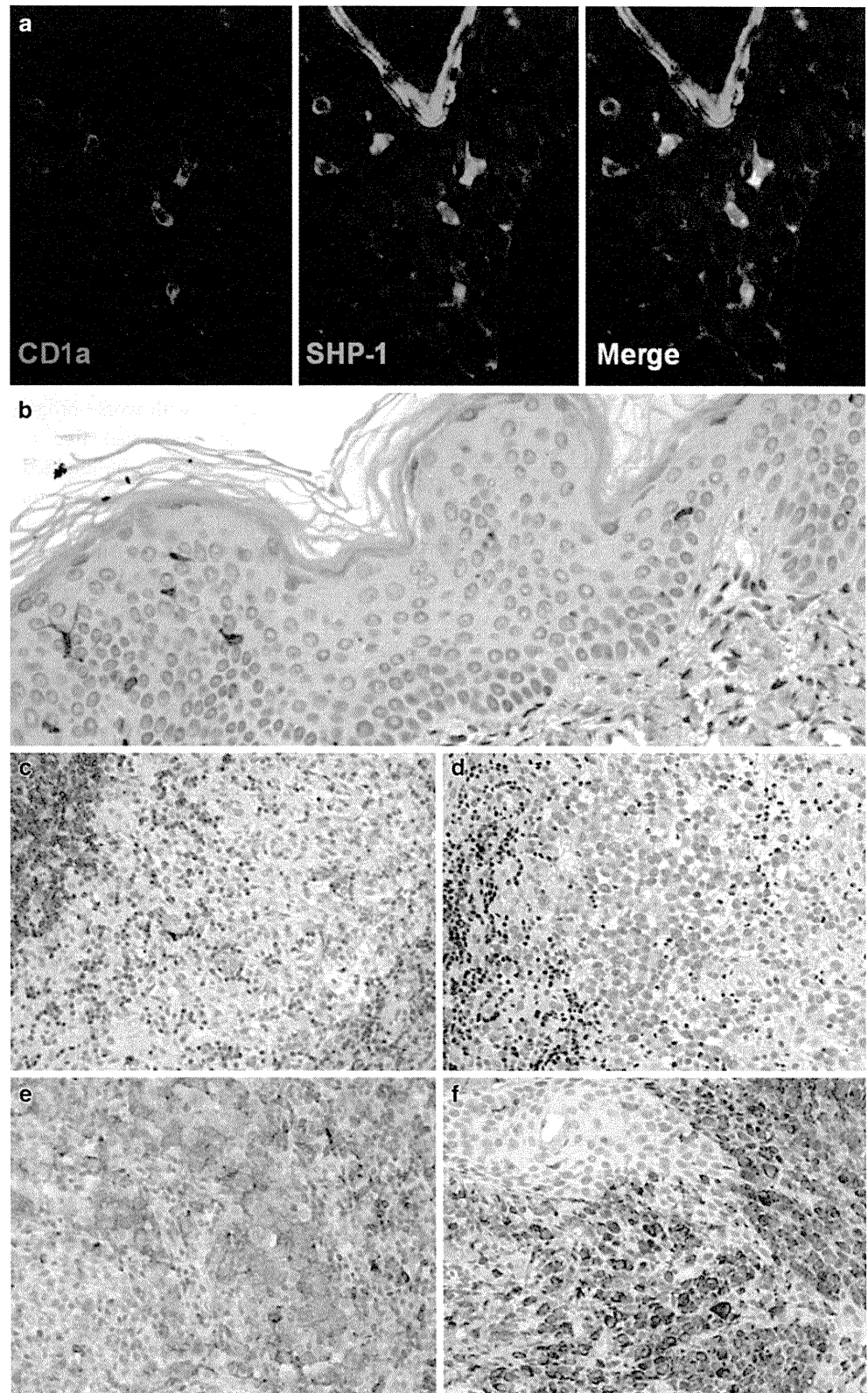
LCs in the epidermis expressed SHP-1, and spinous cells showed weak positivity and granular cells showed just a little strong positivity (Fig. 1b). LCs in DLA and LCH cells in LCH showed negative to high expression of SHP-1 as shown in Fig. 1c–f. Immunohistochemical data as ISs (AU)

Table 1 Clinical characteristics of LCH patients and SHP-1 intensity score

Patient number	Age	Sex	Subtype	Biopsy site	Necrosis	MI	IS
1000114	2 years 3 months	M	SS	Bone	+	0	68
1000115	1 year 1 month	M	SS	Bone	–	0	63
1000179	58 years	F	SS	LN	–	15	96
1000202	71 years	M	SS	Skin	–	12	78
1000219	2 years 11 months	M	SS	Bone	+	4	114
1000222	5 years 1 month	F	SS	Bone	–	1	118
1000227	1 years 5 months	M	SS	Bone	–	0	103
1000267	4 years 2 months	M	SS	Bone	–	0	97
1000275	6 years 6 months	M	SS	Bone	–	2	140
13001	11 years	F	SS	Bone	+	0	126
130011	65 years	M	SS	Orbit	+	2	112
130012	29 years	M	SS	Lung	–	0	100
130015	32 years	M	SS	LN	–	9	62
130016	61 years	M	SS	Lung	+	2	105
130017	2 years 5 months	M	SS	Bone	–	23	60
13002	39 years	M	SS	Lung	–	0	58
13003	7 years	M	SS	Bone	+	3	93
13005	0 month	M	SS	Bone	+	1	111
13006	4 years	F	SS	Bone	+	4	158
13007	4 years	F	SS	Bone	+	0	131
13008	7 years	M	SS	Bone	+	0	97
1000159	2 years	F	MS	Bone	–	0	108
1000178	1 month	F	MS	Liver	–	1	97
1000185	10 months	M	MS	LN	+	6	85
1000201	5 months	M	MS	Bone	+	1	128
1000216	1 year 1 month	F	MS	LN	+	20	179
1000230	4 months	F	MS	Skin	+	20	179
1000234	4 year 2 months	F	MS	Bone	–	0	161
1000249	62 years	M	MS	Skin	–	17	176
1000273	7 years 8 months	M	MS	Bone	–	1	94
1000277	0 month	M	MS	Skin	–	4	180
130014	7 years	M	MS	Skin, LN	+	1	128
13009	8 years	F	MS	Bone	+	4	150

MI mitotic index, M male, F female, LN lymph node

Fig. 1 **a** Detection of CD1a and SHP-1 in skin (epidermis) by IF is shown from a 55-year-old female abdominal skin. Left, CD1a positive LCs. Middle, IF of SHP-1 revealed the strong immunoreactivity in LCs and granular cells, and weak positivity in spinous cells. Right, merge of left and middle images. **b** Detection of SHP-1 protein expression by IHC in normal skin of baby with LCH-MS (1000277). LCs (IS=164 AU) and granular cells in epidermis showed positivity for SHP-1. Spinous cells in epidermis showed vague positivity. **c–f** Detection of SHP-1 protein in the tissues from DLA and LCH by IHC. **c** LCs (IS=45 AU) in DLA of 87-year-old male (150034678). Lymphocytes showed positivity. **d** Bone lesion (IS=93 AU) of LCH-SS (13003). **e** Lung lesion (IS=105 AU) of LCH-SS (130016). **f** Skin lesion (IS=179 AU) of LCH-MS (1000230)



of epidermal LC, DLA, LCH-SS, and LCH-MS were plotted respectively, as shown in Fig. 2, using the SPSS software. As shown, ISs of SHP-1 ranged from 42 (negative) to 180 (strong staining) in the cytoplasm of

LCs/LCH cells of DLA and LCH. On the other hand, ISs of SHP-1 expressed in the cytoplasm of LCs in normal epidermis of dermal LCH cases were 164 (patient 1000277), 165 (patient 1000249), and 173 (patient

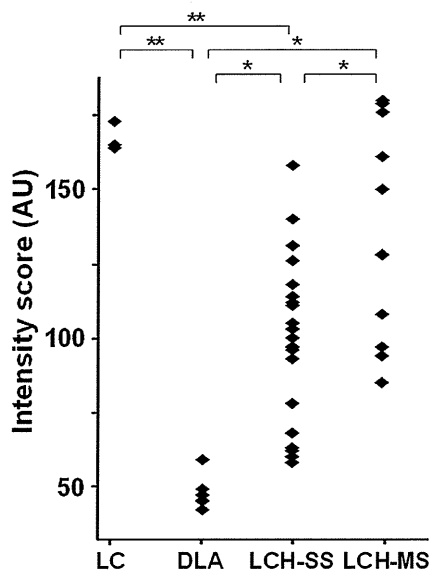


Fig. 2 Dot plots of IS of LCs in the normal epidermis of LCH patients, proliferating cells in DLA, LCH-SS, and LCH-MS. The x-axis shows LC, DLA, LCH-SS, and LCH-MS. An *asterisk* means $p < 0.01$. A *double asterisk* means $p < 0.05$

1000230). The mean IS of DLA, LCH-SS, LCH-MS, and epidermal LC were 47, 100, 139, and 167 AU. A significant difference of SHP-1 reactivity was observed between DLA and LCH-SS ($p < 0.01$), DLA and LCH-MS ($p < 0.01$), and LCH-SS and LCH-MS ($p < 0.01$). Also, a significant difference of SHP-1 reactivity was observed between epidermal LC and DLA ($p < 0.05$) and epidermal LC and LCH-SS ($p < 0.05$). Between epidermal LC and LCH-MS, there was no significant difference. In skin samples, the dermis as negative control did not give background staining.

Correlation of LCH subtypes with necrosis/mitotic index

LCH subtypes did not have a relationship with the rates of necrosis (Fisher's exact test) or mitotic index (Wilcoxon's signed-rank test) in LCH tissues.

Correlation of SHP-1 expression with necrosis/mitotic index and various clinical variables in LCH

The expression levels of SHP-1 did not correlate with the rates of necrosis (Wilcoxon's signed-rank test) or mitotic index in LCH tissues (regression analyses), nor with any clinical variables (regression analyses).

Discussion

LCs are specialized immature DCs in the skin. Ramachandran et al. showed that SHP-1 was an important inhibitor of mice

DC signaling, targeting multiple activation pathways [21]. Accumulated data showed that SHP-1 exerted either putative oncogenic or tumor suppressive functions, depending on the cellular context. Considering the fact that no data of SHP-1 in human LCs were available in the past, our data could be the first in human LCs

The aim of our study was to determine whether SHP-1 expression was related to LCH. Our hypothesis was that SHP-1 was negative or showed low expression in LCH, as in other hematopoietic cell neoplasms such as malignant lymphoma or leukemia. The results of SHP-1 expression analysis showed the opposite of this hypothesis. Higher SHP-1 expression was correlated with worse LCH subtype and thus with worse prognosis (LCH-MS).

Our study had five novel findings: (1) LCs in the epidermis were highlighted compared with spinous cells in the epidermis, except for granular cells, using highly diluted anti-SHP-1 polyclonal antibody (1,600:1). At a dilution of 1,600:1 of anti-SHP-1 antibody, LCs in epidermis (not LCH cells that were in the dermis) of patients 1000249, 1000277, and 1000230 were strongly positive and the epidermis showed faint positivity in IHC and IF, as shown in Fig. 1a, b. Differences of sensitivity between IF and IHC were thought to cause faint positivity of granular cells as well as spinous cells in IHC of Fig. 1b compared with IF of Fig. 1a. (2) Semiquantitative analyses could be performed among LCH cells using highly diluted anti-SHP-1 antibody (1,600:1). (3) LCH cells in LCH-MS did not show a significant difference in SHP-1 intensity compared with LCs in the epidermis. (4) SHP-1 intensity of LCH cells in LCH-SS was weaker in IHC compared with that of LCH-MS (Fig. 1d–f). (5) Proliferating nonneoplastic LC of DLA showed negative or very weak reaction of SHP-1 in IHC (Fig. 1c).

Based on the formerly described data about cell volume of LCs [22], LCH cell diameters [23], and LCH cell nucleus diameters [24], LCH cell cytoplasm volumes are thought to reach 8.7 times those of epidermal LCs. The cell size differences between LCH cells and epidermal LCs and calculation of SHP-1 staining intensity in AU indicate difficulty to compare total volumes of SHP-1 between LCH cells and epidermal LCs.

From the pathological point of view, LCH-SS was described to have more necrotic tissues compared with LCH-MS by Bank et al. [25]; however, our data of almost all Japanese patients were different from those of Bank et al., and we could not confirm this. SHP-1 expression correlates with neither mitotic index in LCH tissue nor any other clinical data at onset of disease.

Low or negative expression of SHP-1 in LCs in DLA is compatible with the theory that SHP-1 negatively regulates LCs migration to lymph nodes from epidermis [17]. Thus, our SHP-1 data could be compatible with data by Geissman