

20030833

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 橋本 公二

平成16（2004）年3月

## 目 次

I.	班員構成 .....	1
II.	総括研究報告	
	難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究 .....	3
	橋本公二	
III.	分担研究報告	
	1. 重症多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準案の作成 .....	13
	橋本公二	
	2. 皮膚の多能性幹細胞の単離・培養と性状解析.....	19
	大河内仁志	
	3. 栄養障害型表皮水疱症遺伝子治療のための基礎研究 .....	23
	玉井克人	
	4. マウス角化細胞 side population の増殖能に関する研究 .....	26
	岡野栄之	
	5. 薬剤過敏症症候群発症における薬剤の免疫学的作用の検討 .....	34
	塩原哲夫	
	6. Stevens-Johnson 症候群（SJS）の早期診断の試み .....	38
	-SJS と EM major の鑑別診断は可能か-	
	飯島正文	
	7. 中毒性表皮壊死症，スチーブンス・ジョンソン症候群，薬剤性過敏症症候群 .....	42
	多形滲出性紅斑，紅斑丘疹型中毒疹におけるヒトヘルペスウイルス再活性化	
	の有無の検討	
	池澤善郎	
	8. 培養角化細胞による表皮様構造の形成機序に関する研究 .....	46
	加藤光保	
	9. 皮膚付属器を有する培養皮膚の作製 .....	49
	岸本治郎	
	10. 自己培養表皮シートによる表皮水疱症の治療に関する研究 .....	53
	白方裕司	
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表 .....	61

[I]

班員構成

班 員 構 成

研究者名		研究実施場所	職名	主な研究分担
主任研究者	橋本 公二	愛媛大学医学部皮膚科	教授	多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準の作成
分担研究者	大河内仁志	国立国際医療センター	部長	皮膚幹細胞の分離・同定
	玉井 克人	大阪大学遺伝子治療学	助教授	遺伝子治療開発
	岡野 栄之	慶応大学医学部生理学	教授	皮膚幹細胞の分離・同定
	塩原 哲夫	杏林大学医学部皮膚科	教授	多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準・治療指針の作成
	飯島 正文	昭和大学医学部皮膚科	教授	多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準・治療指針の作成
	池澤 善郎	横浜市立大学医学部皮膚科	教授	多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準・治療指針の作成
	岸本 治郎	資生堂リサーチセンター	副主任 研究員	付属器を含む培養皮膚の作製
	加藤 光保	筑波大学	教授	皮膚の重層化に関する研究
	白方 裕司	愛媛大学医学部皮膚科	助手	培養皮膚の移植法の確立

[II]

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の開発に関する研究

主任研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授

**研究要旨** 難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植の確立のために、角化細胞の完全無血清培養法を確立し、この培養法を用いて難治性皮膚疾患の代表である劣性栄養障害型表皮水疱症に対し自己培養表皮シート移植7例の患者に施行し良好な結果を得た。また、劣性栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療のために生体皮膚への遺伝子導入法を確立し、さらにVII型コラーゲン遺伝子プロモーターをクローニングした。表皮幹細胞研究に関しては、皮膚から多能性幹細胞を分離・培養し神経細胞、平滑筋細胞などへの分化誘導に成功した。またマウス角化細胞を用いて side population 細胞が高い増殖能力を有し、幹細胞としての性質を有することを示した。皮膚付属器の培養として、包皮由来の上皮細胞が毛包へ分化する能力を有していることを明らかにした。角化細胞が重層化する分子機序に転写因子のAP1が重要な役割を担っていることを明らかにした。重症多形滲出性紅斑（急性期）への自己培養皮膚の応用に関して先ずその診断基準案を作成し、類症との鑑別が重要であることを示し、さらに発症機序における免疫学的側面の重要性について明らかにした。

分担研究者：

大河内仁志（国立国際医療センター・部長）  
玉井克人（大阪大学医学部・助教授）  
岡野栄之（慶応義塾大学医学部・教授）  
塩原哲夫（杏林大学医学部・教授）  
飯島正文（昭和大学医学部・教授）  
池澤善郎（横浜市立大学医学部・教授）  
加藤光保（筑波大学医学部・教授）  
岸本治郎（資生堂研究所・副主任）  
白方裕司（愛媛大学医学部・助手）

**A. 研究目的**

本研究は、糖尿病性潰瘍、褥創、難治性下腿潰瘍、栄養障害型先天性表皮水疱症、重症多形滲出性紅斑（急性期）などの難治性皮膚疾患に対する自己培養皮膚移植法の確立ならびに栄養障害型先天性表皮水疱症に対する遺伝子治療法の開発、さらには重症多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準の整備を目的として行われたものである。具体的には、以下の研究を目的とした。

**皮膚付属器（毛包、血管）を有する培養皮**

## **膚の作製**

自己培養皮膚をさらに発展させ、皮膚付属器（毛包、血管）を含む機能的にも整容的にも優れた培養皮膚の作製が可能となれば、再生医療がさらに発展することが予想される。この目的のため、線維芽細胞、骨髄細胞、ES細胞からの汗腺、毛包、血管の細胞の誘導が可能か否かについて検討する。一種類の幹細胞から転写因子等を変更することにより多種の細胞が誘導可能となれば、培養が簡略化することができ、作製コスト、安全性の面からみても有効である。また、毛包、血管の再生のために、培養した毛乳頭細胞、血管内皮細胞を用いて、毛包、血管の再生が可能であるかについて検討する。

## **自己培養表皮シートによる栄養障害型表皮水疱症の治療**

栄養障害型表皮水疱症に対する自己培養皮膚移植法ならびに自己培養皮膚を用いた ex vivo 遺伝子治療の確立を目的とする。栄養障害型表皮水疱症に対しては、現在まで有効な治療法が乏しく自己培養表皮シート移植の有用性が示唆されている。そこで、栄養障害型表皮水疱症患者について、自己角化細胞の無血清培養法による培養ならびに自己培養表皮シート移植についての有用性の検討を行う。

## **栄養障害型表皮水疱症に対する遺伝子治療**

栄養障害型表皮水疱症に対しては、現在自己培養表皮移植の有用性が明らかになりつつある。しかし、将来的には有効な遺伝子治療法を開発することが必要であり、本研究ではVII型コラーゲンを高効率かつ安定的に発現させるための発現ベクター開発と、

これを用いたVII型コラーゲン産生培養皮膚を作製する。遺伝子導入法として、in vivo 法と ex vivo 法を並行して開発する。本研究は、栄養障害型表皮水疱症症例に対する有効な治療法を開発するのみならず、他の遺伝性皮膚疾患にも新たな遺伝子治療法を提供しうる。さらには、酵素欠損やホルモン異常などによる先天性疾患に対しても、本研究を基礎として、皮膚をバイオリアクターとした新たな補充療法が開発可能となる。

## **皮膚構成細胞の stem cell の研究**

皮膚構成細胞の stem cell の研究が培養皮膚開発に必須であることは当然であるが、表皮、毛包、汗腺、血管などの幹細胞を個々に同定し、その特徴を明らかにする必要である。特に、線維芽細胞、骨髄細胞などが、表皮、毛包、汗腺、血管の前駆細胞となる可能性が示唆されており、ES細胞も含めて皮膚構成細胞の stem cell に関して臨床応用の視点より、検討する。

以上の如く、自己培養皮膚移植の開発は、社会的に取り残されている難治性皮膚疾患患者にとって、多大な福音となることが期待される。

## **重症多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準案の作成**

重症多形滲出性紅斑（急性期）は口唇・口腔、眼、鼻、外陰などの皮膚粘膜移行部のびらんを主症状として、さらに多形紅斑が全身に多発し、しばしば水疱化を示す疾患である。しばしば重症化し、表皮の壊死性変化、表皮剥離をきたす。その原因は感染症、薬剤などが推定されているが、いまだ診断基準が整備されていない。表皮剥離

に対する培養皮膚移植の適応のためには、まずその診断基準の整備が必要と思われる。そこで重症多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準の整備を推進することを目的とする。

## B. 研究方法

### 皮膚付属器（毛包）を有する培養皮膚の作製

マウス毛乳頭画分の調製：生後 2-4 日目の新生児マウスの背部皮膚組織を剥離し、毛包が含まれる真皮組織のみを調整し、毛乳頭細胞を分離した。ヒト成人包皮由来上皮細胞の調製：包皮組織をデスパーゼ処理し、表皮シートをトリプシン-EDTA 処理することにより、表皮細胞の細胞懸濁液を得た。

#### 発毛誘導能の検証

分離した毛乳頭細胞画分  $1 \times 10^7$  と、別に調製したヒト上皮細胞  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  を移植直前に混合し、遠心して培養液を取り除き、細胞塊にした。この細胞塊をヌードマウス (balb/c nu/nu) 背部皮膚に埋め込んだシリコン製のドーム型チャンバー内に流し込んだ。1 週間後、チャンバーをはずし、さらに 2 週間目以降に移植部位の毛髪形成の有無の肉眼観察を行った。移植部位の形態観察：移植後 3-4 週間の時点で移植部位の組織片を採取し、毛包形成の有無は HE 染色による形態観察、ヒト細胞種の特特定は Hochest 33258 による核染色、毛包上皮の特特定にはヒトケラチン抗体による免疫染色を行った。

### 自己培養表皮シートによる栄養障害型表皮水疱症の治療

角化細胞の完全無血清培養法は平成 13 年度

に確立したので、この方法を用いて栄養障害型表皮水疱症患者 10 例より角化細胞を培養し、自己培養表皮シートを作製し患者に移植した。

### 栄養障害型表皮水疱症に対する遺伝子治療

水疱部皮膚への遺伝子導入方法の確立：真空吸引装置をヘアレスラット背部皮膚に装着し、陰圧をかけて吸引水疱を形成し GFP 遺伝子発現プラスミド DNA 溶液を水疱内に注入し、超音波エネルギーを照射して、遺伝子導入高率をルシフェラーゼアッセイにて検討した。また、COL7A1 プロモーター領域の塩基配列をデータベース上で検索し、約 4000 塩基対のプロモーター領域を PCR にて増幅した。この領域をルシフェラーゼ遺伝子および VII 型コラーゲン cDNA の上流に接続した。

### 皮膚構成細胞の stem cell の研究

マウス皮膚から細胞を分離し、2% B27 supplement を含む DMEM/F12 培地を使用し、EGF を最終濃度 20ng/ml、bFGF 10ng/ml となるように添加し浮遊系培養皿で 2 週間培養した。スフェアの形成数およびスフェア 1 個当たりの大きさを検討した。さらに種々の増殖因子を添加して control 群と比較検討した。また、取得したスフェアを、EGF、bFGF を除いた 1%ウシ血清を含む DMEM/F12 培地で 1 週間培養して分化を誘導し、ニューロンのマーカーの  $\beta$  III Tubulin、アストロサイトのマーカーの GFAP、平滑筋のマーカーの  $\alpha$  SMA、脂肪滴を染色する Oil red O を用いて免疫染色を行い各種抗体の陽性細胞の割合を検討した。

マウス新生児皮膚を剥離し、角化細胞を調整しヘキスト 33342 で染色後高速セルソーターで SP 細胞を分離し、無血清培養法で培養しコロニーの形成能を検討した。

界面培養法による角化細胞の重層化過程における AP1 系の関与を調べることを目的として、c-Fos, c-Jun, JunB, 転写活性化ドメインを欠失させた JunB (JunB  $\Delta$ N) の発現ベクターを作成し、ヒト角化細胞株 HaCaT に発現させ、安定発現細胞株を作成した。これらの細胞株を用いて界面培養を行い、角化細胞の重層化や分化に及ぼす AP1 系の作用を調べた。

### **重症多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準案の作成**

分担研究者の施設（愛媛大学、杏林大学、昭和大学、横浜市立大学）で経験した重症多形滲出性紅斑（急性期）の症例を詳細に検討することにより、その概念、疫学、病因、症状、検査所見の項目について診断基準案を作成した。

### **C. 研究結果と D. 考察**

#### **皮膚付属器（毛包）を有する培養皮膚の作製**

マウス毛乳頭細胞濃縮画分とヒト包皮由来上皮細胞の組合せによって移植後約 4 週間でマウス-ヒトキメラ毛包の形成が確認された。Hochest 核染色により、上皮部分はヒト由来、毛乳頭部はマウス種であることが確認された。毛包上皮部分は、中央が角化し、毛幹様構造が認められ、ヒトケラチン抗体で陽性であった。またキメラ毛包は一定領域に密集する傾向が認められた。初代

から継代 3 代目までの上皮細胞を用いた場合毛包形成が認められたが 4 代目以降では認められなかった。また成人の包皮由来の上皮細胞を用いた場合にも、同様にしてキメラ毛包が認められた。本実験で得られた毛包様構造もヒト-マウス間のキメラ毛包で毛幹伸長までは認められないが、ヒト様毛包が初めて認められたことは完全なヒト毛包再生に向けての重要なステップである。これまでの研究成果で、1) マウス毛乳頭-ヒト毛包上皮細胞からなるキメラ毛包の形成が確認され、2) 継代 3 代目までの培養表皮細胞で毛包再生が認められ、3) ヒト包皮由来表皮細胞が毛包上皮分化能を有すること、が明らかとなった。ヒト成熟皮膚組織由来細胞でヒト様毛包が形成されたことは、将来の上皮幹細胞の供給源の可能性として重要な知見であるばかりではなく、皮膚付属器を有する培養皮膚の作製に発展するものと考えられる。

#### **自己培養表皮シートによる栄養障害型表皮水疱症の治療**

栄養障害型表皮水疱症患者 10 例から無血清培養法にて全例角化細胞の培養に成功した。1 例は継代 3 代目で増殖しなくなり、3 代継代の細胞では培養表皮シートの作製はできず、2 代継代の細胞を用いて自己培養表皮シートの作製を行った。残り 9 例は順調に増殖し、4 代継代の細胞を用いて自己培養表皮シートの作製が可能であった。なお、表皮水疱症以外の患者から得た皮膚、ならびに正常皮膚からの培養と比較すると、栄養障害型表皮水疱症患者の角化細胞の培養は困難であり、細胞の増殖もやや不良の

印象を得た。栄養障害型表皮水疱症に対する有効な治療法はなかったが、自己培養表皮シートを用いて潰瘍の縮小をみることができた。栄養障害型表皮水疱症は潰瘍面積が広く、かつ繰り返し水疱・潰瘍を形成するため、培養皮膚の特徴である保存性と拡大性ともに生かされる疾患であると思われる。また、自己の細胞を用いることにより安全性を確保できたと考えられ、現時点においては自己培養表皮シート移植が最も有効な治療法であり、栄養障害型表皮水疱症に対する自己培養表皮シート移植法が確立できたと考えられる。

#### **栄養障害型表皮水疱症に対する遺伝子治療**

**水疱部皮膚への遺伝子導入方法の確立：**ヘアレスラット背部皮膚に作成した吸引水疱内に GFP 発現プラスミド単独、GFP 発現プラスミド/Optison 溶液を注入し、超音波エネルギー照射 24 時間後に GFP の発現を検討した。その結果、GFP 発現プラスミド単独に比べ、Optison と併用によって水疱部位の表皮細胞における GFP の強い発現が得られることを確認した。COL7A1 プロモーターのクローニング：COL7A1 プロモーター配列を基にして、転写開始部位上流 4000 塩基、3000 塩基、2000 塩基、および 1000 塩基のヒト DNA を PCR によりクローニングし、それぞれの DNA 断片を、ルシフェラーゼ遺伝子に接続した COL7A1/ルシフェラーゼ・レポータープラスミドを作成し、培養ヒト表皮細胞中に導入してルシフェラーゼ活性を確認、それぞれの DNA 断片が COL7A1 プロモーターとして機能することを確認した。栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療を成功さ

せるためには、強い外力を加えることなく、低侵襲性に水疱部、あるいは非水疱部皮膚に VII 型コラーゲン遺伝子を導入する必要がある。平成 14 年度には、非水疱部皮膚への遺伝子導入法として、ケミカルピーリングと超音波エネルギーを組み合わせることにより、生体皮膚へ直接プラスミド遺伝子を導入する新たな方法論を開発し報告した。しかし、この方法では水疱部皮膚への遺伝子導入は困難なため、水疱部及びその近傍の皮膚には新たな遺伝子導入法を開発する必要がある。そこで、平成 15 年度の研究では、超音波および造影剤を用い、水疱部およびその近傍の剥離皮膚に対する低侵襲性遺伝子導入法を開発した。本研究では、吸引水疱内に DNA/造影剤溶液を注入して超音波を照射することにより、水疱蓋及びその近傍の微小剥離表皮内に遺伝子導入が可能であることを明らかにした。この方法を応用することにより、栄養障害型表皮水疱症の水疱部表皮細胞内に VII 型コラーゲン発現ベクターを導入する遺伝子治療が可能になると考えられる。さらに今回われわれは、COL7A1 プロモーターのクローニングを行った。4000 塩基対の DNA は COL7A1 プロモーター領域全体をカバーするため、このプロモーターを用いて VII 型コラーゲン cDNA を発現させることにより、より生理的に近い状態で遺伝子治療が可能になると思われる。

#### **皮膚構成細胞の stem cell の研究**

マウス皮膚より浮遊培養系を用いて、sphere を形成させ、半年以上の長期継代に成功した。wild type マウスと GFP マウス

の細胞を混合して浮遊培養したところ、両者のキメラの sphere が出現した。さらに培養液にメチルセルロースを加えて細胞凝集を抑制し、1 個の細胞からの sphere の形成を確認した。スフェアを分化させた場合には  $\beta$  III Tubulin、GFAP、 $\alpha$  SMA、Oil red O 陽性細胞がそれぞれ 5 % 程度検出された。マウス皮膚より得られるスフェアの形成数は加齢により、減少することを確認した。本研究において分化条件により多分化能を証明し、長期培養により自己複製能と増殖能を検討して、幹細胞としての性質を証明した。さらに TGF- $\beta$  により sphere の形成率と細胞数の増加が見られたが、これは neurosphere においては報告されていない現象である。また皮膚組織から皮膚以外の細胞を誘導できる可能性が示唆されたので、自己の細胞を使った再生医療に応用する道がひらける。今後分化効率を高める研究をすすめれば、幹細胞ソースとして皮膚を用いることができると考えられた。

マウス表皮 SP 細胞は培養数日で大きなコロニーを形成したが、Main Population 細胞は小さなコロニーしか形成せず、長期間の培養でも大きなコロニーにはならなかった。細胞数を測定したところ、SP 細胞は 1 平方センチあたり 2000 個以上に増殖したが、MP 細胞は 100 個以下であった。Side population 細胞 (SP) は骨髄において当初検討された細胞であり、骨髄 SP 細胞は幹細胞である可能性が高いと報告されている。平成 14 年度に表皮角化細胞における SP の存在を示したが、今回の検討において SP が高度の増殖能を有していることが明らかと

なった。すなわち、SP 細胞は表皮幹細胞としての性質を一部有していると思われる。c-Fos, c-Jun, JunB, JunB  $\Delta$  N の発現ベクターを作成し HaCaT 細胞に導入し、安定発現細胞株を作成した。c-Jun と JunB  $\Delta$  N を強く発現する安定発現細胞株が複数個得られ、c-Jun 発現細胞株は、AP1 活性が亢進し、JunB  $\Delta$  N 発現細胞株は、AP1 活性が著明に抑制されていた。通常の 2 次元培養条件下では、これらの細胞群の増殖程度に著明な差は見られなかった。c-Jun 発現細胞株と JunB  $\Delta$  N 発現細胞株を、ヒト線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上に播き、界面培養を行なって、3 次元構造を形成させたところ、c-Jun 発現細胞株は、コントロールと同様の著明な多層化を示し、重層扁平上皮様構造を形成したが、JunB  $\Delta$  N 発現細胞株は、重層構造形成能が著しく低下していた。角化細胞の AP1 活性は、通常の 2 次元培養条件下では、JunD の発現などにより低く抑制されており、この条件での細胞増殖に、あまり影響していないが、表面を空気に露出 (界面培養) し、角化細胞が 3 次元構造を形成する時には、AP1 活性が必須であることが示唆された。

### **重症多形滲出性紅斑 (急性期) の診断基準案の作成**

分担研究者の施設で経験した重症多形滲出性紅斑の症例を詳細に検討することにより、その概念、疫学、病因、症状、検査所見の項目について診断基準案を作成した。診断基準案を用いた診断における感度、特異性の検討が不十分であり、この成果をもたらすには、症例の積み重ねによる解析が必要

不可欠である。また、治療に関してはステロイド大量投与方法、ガンマグロブリン大量投与方法、血漿交換療法など検討すべき問題が山積しており、診断基準の整備に引き続いて今後検討を行う予定である。

## E. 結論

角化細胞の完全無血清培養法を確立し、この培養法を用いて難治性皮膚疾患の代表である劣性栄養障害型表皮水疱症に対する自己培養表皮シート移植法を確立した。また、劣性栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療のために生体皮膚への遺伝子導入法を確立し、さらにⅦ型コラーゲン遺伝子プロモーターをクローニングした。表皮幹細胞研究に関しては、皮膚から多能性幹細胞を分離・培養し神経細胞、平滑筋細胞などへの分化誘導に成功した。side population細胞が幹細胞としての性質を有することを示した。皮膚付属器の培養として、包皮由来の上皮細胞が毛包へ分化する能力を有していることを明らかにした。角化細胞が重層化する分子機序に転写因子の AP1 が重要な役割を担っていることを明らかにした。重症多形滲出性紅斑（急性期）への自己培養皮膚の応用に関して先ずその診断基準案を作成し、類症との鑑別が重要であることを示した。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表（平成 15 年度）

論文発表：報告書巻末の別表に記載  
学会発表

1. Yamasaki K, Dai X, Nanba D, Shiraishi K, Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Higashiyama S, **Hashimoto K**: PLZF regulates and suppresses melanoma proliferation and tumor growth. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
2. Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, **Hashimoto K**, Amagai M: In vitro keratinocyte dissociation assay to evaluate blister-inducing activity of pemphigus IgG autoantibodies. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
3. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, **Hashimoto K**: Novel role of angiotensin II in fibroblasts: induction of fibroblast migration by angiotensin II via HB-EGF-mediated EGF receptor transactivation. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
4. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Higashiyama S, **Hashimoto K**: Keratinocyte-specific HB-EGF-deficient mice show marked retardation of skin wound healing. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA

5. Nanba D, Shirakata Y, Nakanishi Y, Hieda Y, Ishiguro H, Higashiyama S, **Hashimoto K**: Epidermal hyperplasia and impaired morphogenesis of hair follicles in mice overexpressing a soluble form of heparin-binding EGF-like growth factor. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
6. Dai X, Yamasaki K, Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, **Hashimoto K**: All trans-retinoic acid induces production of IL-8 in human keratinocytes via increased phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  in the NF $\kappa$ B pathway. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
7. Tohyama M, Shirakata Y, Yamasaki K, Sayama K, Tsuda T, Tan E, **Hashimoto K**: production of MIP-1 $\alpha$ /CCL3 is mediated via toll-like receptor 3 in human keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
8. Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Sugai M, Ichijo H, **Hashimoto K**: Epidermal differentiation regulates the production of innate antimicrobial peptides in the skin. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
9. Tokumaru S, Shirakata Y, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, **Hashimoto K**: EGF receptor transactivation by UV-irradiation is mediated via HB-EGF shedding in human keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
10. **Hashimoto K**: Drug induced hypersensitivity syndrome (DIHS). 13<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology, Daejeon Oct 2003, Korea
11. Ura H, Yano S, Fujimoto M, **Okochi H**: A keratinocyte outgrowth system useful as a new tool for analyzing proliferation, migration, and differentiation International Investigative Dermatology 2003 Miami Beach May 2003
12. Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, Fujimoto M, **Okochi H**: Effect of transforming growth factor-beta on the proliferation and differentiation of multipotential sphere colonies from skin International Investigative Dermatology 2003 Miami Beach May 2003
13. Fujimoto M, Asano N, **Okochi H**, Tedder TF, Sato S: Exaggerated B cell signaling by disrupted CD22/SHP-1 inhibitory regulation in the tight-skin mouse

International Investigative Dermatology  
2003 Miami Beach May 2003

14. Souma T, Tajima M, **Kishimoto J**: Localization of versican in human hair follicle -Implication of proteoglycan involvement in anagen induction and hair elongation. International Investigative Dermatology, May 1, 2003, Miami, USA

15. 江浜律子、出田立郎、矢野喜一郎、相馬勤、**岸本 治郎**: ヒト由来細胞によるキメラ毛包再構成の試み. 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 11 日 神戸

16. **塩原哲夫**: 重症薬疹治療におけるガンマグロブリン療法の問題点. 第 15 回日本アレルギー春季臨床大会、横浜、2003. 5. 12

17. 狩野葉子、勝田倫江、**塩原哲夫**: Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) の診断と治療. 第 15 回日本アレルギー春季臨床大会、横浜、2003. 5. 12

18. 勝田倫江、早川 順、狩野葉子、**塩原哲夫**: HIV 感染患者に出現した ST 合剤による薬疹の 2 例. 第 102 回日本皮膚科学会総会、浦安、2003. 5. 25

19. 佐久間恵一、狩野葉子、**塩原哲夫**: ステロイドと IVIG の同時投与が奏効した

DIHS の 1 例. 第 67 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、旭川、2003. 9. 27

20. **飯島正文**: シンポジウム 15-重症型薬疹の診断と治療-Stevens-Johnson 症候群/TEN の診断と治療. 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (横浜, 2003. 5)

21. **飯島正文**: シンポジウム 1-重症薬疹の病態とその対策-重症型薬疹の分類と診断. 第 55 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (松山, 2003. 10)

22. **飯島正文**: シンポジウム 7-治療薬による重篤な有害反応の予測・予防-Stevens-Johnson 症候群/TEN の早期診断と治療. 第 24 回日本臨床薬理学会年会 (横浜, 2003. 12)

23. **飯島正文**: 生涯教育講演会-TEN with spots の早期診断と皮膚科専門医の役割-第 226 回日本皮膚科学会東海地方会 (名古屋, 2003. 12)

24. 濱田和俊, 保坂浩臣, 西尾和倫, 北見周, 末木博彦, **飯島正文**, 平山良美: DLST でアセトアミノフェンに陽性を示した Stevens-Johnson syndrome (SJS) の幼児例. 第 33 回日本皮膚アレルギー学会 (東京, 2003. 7)

25. 宇野裕和, 杉山美紀子, 北見 周, 末木博彦, **飯島正文**, 真木剛浩, 小出良平: 明らかな薬剤摂取歴なしに発症した Stevens-Johnson Syndrome (SJS) の 1

例. 第 33 回日本皮膚アレルギー学会  
(東京, 2003.7)

26. 榊原佳奈子, 保坂浩臣, 北見 周, 中  
田土起丈, 末木博彦, **飯島正文**, 金沢  
日英: Stevens-Johnson 症候群(SJS)進  
展型 TEN の 1 例. 第 55 回日本皮膚科学  
会西部支部学術大会 (松山, 2003.10)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を  
含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

[III]

分担研究報告

重症多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準案の作成

分担研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授

**研究要旨** 重症多形滲出性紅斑（急性期）は 口唇・口腔、眼、鼻、外陰などの皮膚粘膜移行部のびらんを主症状として、さらに多形紅斑が全身に多発し、しばしば水疱化を示す疾患である。しばしば重症化し、表皮の壊死性変化、表皮剥離をきたす。その原因は感染症、薬剤などが推定されているが、いまだ診断基準が整備されていない。分担研究者の施設で経験した重症多形滲出性紅斑の症例を詳細に検討することにより、その概念、疫学、病因、症状、検査所見の項目について診断基準案を作成した。診断基準案を用いた診断における感度、特異性の検討が今後必要であると思われる。

**A. 研究目的**

重症多形滲出性紅斑（急性期）は 口唇・口腔、眼、鼻、外陰などの皮膚粘膜移行部のびらんを主症状として、さらに多形紅斑が全身に多発し、しばしば水疱化を示す疾患である。しばしば重症化し、表皮の壊死性変化、表皮剥離をきたす。その原因は感染症、薬剤などが推定されているが、いまだ診断基準が整備されていない。表皮剥離に対する培養皮膚移植の適応のためには、まずその診断基準の整備が必要と思われる。そこで重症多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準の整備を推進することを目的とする。

**B. 研究方法**

重症多形滲出性紅斑（急性期）は 口唇・口腔、眼、鼻、外陰などの皮膚粘膜移行部のびらんを主症状として、さらに多形紅斑が

全身に多発し、しばしば水疱化を示す疾患である。しばしば重症化し、表皮の壊死性変化、表皮剥離をきたす。その原因は感染症、薬剤などが推定されているが、いまだ診断基準が整備されていない。表皮剥離に対する培養皮膚移植の適応のためには、まずその診断基準の整備が必要と思われる。分担研究者の施設で経験した重症多形滲出性紅斑（急性期）の症例を詳細に検討することにより、その概念、疫学、病因、症状、検査所見の項目について診断基準案を作成する。

**C. 研究結果**

重症多形滲出性紅斑（急性期）の診断基準案

分担研究者の施設で経験した重症多形滲出性紅斑の症例を詳細に検討することにより、

その概念、疫学、病因、症状、検査所見の項目について診断基準案を作成した。

### 重症多形滲出性紅斑診断基準案

#### 概念

発熱を伴う口唇、眼結膜、外陰部などの皮膚粘膜移行部における重症の粘膜疹および皮膚の紅斑で、しばしば水疱、表皮剥離を認める。原因の多くは、薬剤である。

#### 主要所見 (必須)

- 1) 皮膚粘膜移行部の重篤な粘膜病変(出血性あるいは充血性)がみられること。
- 2) しばしば認められるびらんもしくは水疱は、体表面積の 10%未満であること。
- 3) 発熱。

#### 副所見

- 4) 皮疹は非典型的ターゲット状多形紅斑。
- 5) 病理組織学的に、表皮の壊死性変化を認める。

但し、TEN への移行があり得るため、初期に評価を行った場合には、極期に再評価を行う。

主要項目の 3 項目を全てみたす場合重症多形滲出性紅斑と診断する。

### TEN (中毒性表皮壊死症)

#### 概念

広範囲な紅斑と、全身の 10%以上の表皮の壊死性障害による水疱、表皮剥離・びらんを認め、高熱と粘膜疹を伴う。原因の大

部分は薬剤である。

#### 主要所見 (必須)

1. 体表面積の 10%を越える水疱、表皮剥離・びらん。
2. ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) を除外できる。
3. 発熱。

#### 副所見

4. 皮疹は広範囲のびまん性紅斑および斑状紅斑である。
5. 粘膜疹を伴う。
6. 病理組織学的に、顕著な表皮の壊死を認める。

主要 3 項目のすべてを満たすものを TEN とする。

#### サブタイプの分類

- 1 型: SJS 進展型 (TEN with spots)
- 2 型: びまん性紅斑進展型 (TEN without spots)

### D. 考察

分担研究者の施設で経験した重症多形滲出性紅斑の症例を詳細に検討することにより、その概念、疫学、病因、症状、検査所見の項目について診断基準案を作成した。診断基準案を用いた診断における感度、特異性の検討が不十分であり、この成果をもたらすには、症例の積み重ねによる解析が必要不可欠である。また、治療に関してはステロイド大量投与法、ガンマグロブリン大量投与法、血漿交換療法など検討すべき

問題が山積しており、診断基準の整備に引き続き今後検討を行う予定である。

## E. 結論

本研究により多彩な重症多形滲出性紅斑（急性期）の病態が明らかになり、診断指針の確立が可能となった。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表（平成 15 年度）

論文発表

英語論文

1. **Hashimoto K**, Yasukawa M, Tohyama M: Human herpesvirus 6 and drug allergy. **Curr Opin Allergy Clin Immunol** 2003, 3:255-60
2. Nanba D, Mammoto A, **Hashimoto K**, Higashiyama S.: Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. **J Cell Biol** 2003, 163:489-502
3. Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, **Hashimoto K**, Raab G, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Klagsbrun M, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003, 100:3221-6.
4. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y, Detmar M, **Hashimoto K**: Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for VEGF-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation. **J Biol Chem** 2003, 278:40026-31
5. Nakamura Y, Fukami K, Yu H, Takenaka K, Kataoka Y, Shirakata Y, Nishikawa SI, **Hashimoto K**, Yoshida N, Takenawa T.: Phospholipase Cdelta(1) is required for skin stem cell lineage commitment. **EMBO J** 2003, 22:2981-2991.
6. Masaki T, Fukunaga A, Tohyama M, Koda Y, Okuda S, Maeda N, Kanda F, Yasukawa M, **Hashimoto K**, Horikawa T, Ueda M: Human herpes virus 6 encephalitis in allopurinol-induced hypersensitivity syndrome. **Acta Derm Venereol** 2003, 83:128-31
7. Tsuda T, Tohyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Sayama K, **Hashimoto K**: Lack of evidence for TARC/CCL17 production by normal human keratinocytes in vitro. **J Dermatol Sci** 2003, 31:37-42
8. Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H,

- Kawai T, Yamada S, Fujiwara T, Yamazaki K, Sayama K, Taubman MA, Kurihara H, **Hashimoto K**, Sugai M: Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. **Infect Immun** 2003, 71:3730-9
9. Shibata R, Kai H, Seki Y, Kato S, Wada Y, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Yoshimura A, Imaizumi T: Inhibition of STAT3 prevents neointima formation by inhibiting proliferation and promoting apoptosis of neointimal smooth muscle cells. **Hum Gene Ther** 2003, 14:601-10
  10. Yamasaki K, Hanakawa Y, Tokumaru S, Shirakata Y, Sayama K, Hanada T, Yoshimura A, **Hashimoto K**: SOCS1/JAB and SOCS3/CIS3 negatively regulate the STATs signaling pathway in normal human epidermal keratinocytes. **J Invest Dermatol** 2003, 120:571-80.
  11. Yamasaki K, Toriu N, Hanakawa Y, Shirakata Y, Sayama K, Takayanagi A, Ohtsubo M, Gamou S, Shimizu N, Fujii M, Miyazono K, **Hashimoto K**: Keratinocyte growth inhibition by high-dose epidermal growth factor is mediated by transforming growth factor  $\beta$  autoinduction: A negative feedback mechanism for keratinocyte growth. **J Invest Dermatol** 2003, 120:1030-1037.
  12. Hamada K, Kohno S, Iwamoto M, Yokota H, Okada M, Tagawa M, Hirose S, Yamasaki K, Shirakata Y, **Hashimoto K**, Ito M.: Identification of the Human IAI.3B Promoter Element and Its Use in the Construction of a Replication-selective Adenovirus for Ovarian Cancer Therapy. **Cancer Res** 2003, 63:2506-12.
  13. Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaitu M, Ishida Y, Shirakata Y, Sayama K, **Hashimoto K**, Yasukawa M.: Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4+ T lymphocytes: analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells. **J Immunol** 2003, 170:2205-13.
  14. Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, **Hashimoto K**: Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex. **J Dermatol** 2003, 30:135-40.
  15. Wada T, Shirakata Y, Takahashi H, Murakami S, Iizuka H, Suzuki H,