

C. 研究結果

胎生 14 日目に GFP 骨髄を移植したマウスでは、出生 6 週目以降においても移植 GFP 骨髄由来細胞が骨髄、胸腺、脾臓の各組織に長期生着していた。また、10 週目に移植した GFP マウス皮膚片は拒絶されることなく生着し、また抗 GFP 抗体の産生も ELISA により検出し得なかった。一方胎生期に GFP 骨髄移植を行わなかった群では、GFP マウス皮膚は全例で拒絶され、また抗 GFP 抗体の産生が ELISA にて確認された。

D. 考察

胎生期 GFP 骨髄移植により生後長期間 GFP 発現骨髄細胞に対する免疫寛容が成立することが明らかとなった。胎生期に発現した抗原に対し、胸腺において中枢性免疫寛容が誘導されることが知られている。本研究においても、胎生期に移植した遺伝子導入骨髄細胞は胸腺に生着していることが確認されており、導入遺伝子産物に対して中枢性免疫寛容が誘導されている可能性が示唆される。出生前診断により妊娠早期に胎児遺伝子の両アレルにナンセンス変異の存在が確認された場合、胎児骨髄細胞を採取して治療用遺伝子を導入し、再び胎児循環系に移植することにより、治療用導入遺伝子産物に対する免疫寛容を誘導することが可能になると思われた。

E. 結論

マウス胎仔循環系に対する骨髄細胞移植により免疫寛容を誘導するという、遺伝子治療法確立のため新たな可能性を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（平成 17 年度）

論文発表

1. Yang L, Shirakata Y, Tamai K, Dai X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Shiraishi K, Nagai H, Wang X, Murakami S, Sayama K, Kaneda Y, Hashimoto K. Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalents. *J Dermatol Sci*. 2005;40:105-14.
2. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2542-7.
3. Ito M, Yamamoto S, Nimura K, Hiraoka K, Tamai K, Kaneda Y. Related Articles, Links Rad51

siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. J Gene Med. 2005;7:1044-52.

4. Mima H, Tomoshige R, Kanamori T, Tabata Y, Yamamoto S, Ito S, Tamai K, Kaneda Y. Biocompatible polymer enhances the in vitro and in vivo transfection efficiency of HVJ envelope vector. J Gene Med. 2005 ;7:888-97

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

改変パラミクソウイルスおよびその作製方法

（発明者：佐賀公太郎、玉井克人、金田安史；出願人；ジェノメディア（株）、大阪大学）2005年11月24日出願、特願 2005-338449

ターゲッティングウイルスおよびその作製方法（発明者：河地正子、玉井克人、金田安史；出願人；ジェノメディア（株）、大阪大学）2005年11月24日出願、特願 2005-339474

学会発表

1. 河地正子、玉井克人、金田安史：表皮細胞高親和性 HVJ-E ベクターの開発（平成17年12月8日；第28回日本分子生物学会；博多）
2. 佐賀公太郎、玉井克人、金田安史：siRNA の利用による HN 低含有 HVJ ウイルス粒子の生産（平成17年12月8日；第28回日本分子生物学会；博多）

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ヒト表皮角化細胞 side population 特異的遺伝子発現に関する研究

分担研究者 岡野栄之 慶応義塾大学医学部生理学 教授

研究要旨 表皮角化細胞の幹細胞を明らかにする目的で、ヒト角化細胞の side population 細胞（SP 細胞）に特異的に発現している遺伝子について検討した。ヒト角化細胞を培養し、ヘキスト 33342 で染色後セルソーターを用いて SP 細胞と main population 細胞（MP 細胞）をソーティングした。それぞれの分画から mRNA を抽出し、PCR にて増幅した後、micro array 解析を行った。SP 分画でより強く発現している遺伝子は約 100 個、逆に減少している遺伝子は約 200 個が認められた。

A. 研究目的

表皮角化細胞を用いた再生医療を推進するうえで、効率のよい細胞の分離と培養が必要である。このためには、表皮角化細胞の幹細胞を分離・培養することが最も適していると思われる。昨年度までの研究成果により、抗体を用いない幹細胞の分離法として骨髓細胞で行われているヘキスト 33342 を用いた分離法（SP 細胞）が角化細胞においても有用であることを示し、さらに SP 細胞は継代操作により減少することが明らかとなった。本年度は幹細胞の性質を明らかにするために、特異的に発現亢進もしくは減少している遺伝子について明らかにした。

B. 研究方法

凍結保存しておいた 2 代目のヒト表皮角化細胞を播種し、無血清培養法にて培養した。

培養後 5 日目の subconfluent になった条件で、トリプシン/EDTA を用いて細胞を回収し、ヘキスト 33342 を 10 ug/ml の濃度で添加し、37℃60 分間染色を行った。遠心操作後細胞を 3×10^6 /ml の濃度で再懸濁し、高速セルソーター（EPICS ALTRA, ベックマン・コールター社）を用いて SP 細胞と全分画の細胞を分離採取した。それぞれの細胞から total RNA を抽出し、PCR により増幅させた産物を micro array 解析に用いた。

C. 研究結果

ヒト表皮角化細胞における SP 細胞において遺伝子発現が亢進しているものが 100 個、逆に減少している遺伝子が約 200 個認められた。これらのうち約半数は未知の遺伝子であった。残りのものについては既知の遺伝子であったが、特徴的な遺伝子群

ではなかった。

D. 考察

表皮角化細胞の幹細胞の分離法として表面マーカーを用いた分離法が従来おこなわれていたが、この方法では少なからず細胞に対するダメージが危惧されている。また、決定的な表面マーカーは見いだされておらず、抗体による染色に時間がかかることもあり、最適の分離法とはいえない。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。前年度までの研究において、ヒト表皮角化細胞の SP 細胞が幹細胞としての性質を有していることを確認したが、継代により SP 細胞の幹細胞としての維持が困難であることが明らかとなった。SP 細胞をいかに維持していくかが今後の課題であるが、そのためには SP 細胞の性質を把握する必要がある。この目的のために、特異的に発現している遺伝子の同定を試みたところ、約 100 個の遺伝子が特異的に発現が亢進していることが明らかとなった。これらの遺伝子が本当に発現亢進しているか、また、これらの遺伝子を SP 細胞以外の細胞に強制発現した際に SP 細胞と同じ性質を有するようになるかの確認が次年度以降の課題であると思われる。

E. 結論

ヒト表皮角化細胞における SP 細胞に特異

的に発現している遺伝子を micro array 解析により同定した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成 17 年度)

論文発表

英語論文

1. Clarke, R.B., Spence, K., Anderson, E., Howell, A., Okano, H. and Potten, C.S.: A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev. Biol.* 277:443-456, 2005.
2. Suzuki S, Yamashita T, Tanaka K, Hattori H, Sawamoto K, Okano H and Suzuki N.: Activation of cytokine signaling through Leukemia Inhibitory Factor Receptor (LIFR)/gp130 attenuates ischemic brain injury in rats. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25: 685-693, 2005.
3. Sakaguchi M, Sawamoto K, Shimazaki T, Kitamura T, Shibuya A and Okano H.: A method for gene transfer, single isolation and in vitro assay for neural stem cells. *Inflammation and Regeneration* 25: 50-54, 2005.
4. Hirota Y, Takahashi K, Ueda R, Okano H.: Transmembrane protein Tincar is expressed and involved in the development

- of *Drosophila* photoreceptor cells. *Development, Genes and Evolution* 215: 90-96, 2005.
5. Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T, Chino N, Okano H, Okamoto H: Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor neuron and sensory neuron-specific expression. *Dev. Biol.* 278: 587-606, 2005.
 6. Nakamura Y, Yamamoto M, Miyado K, Okano HJ, Fukagawa R, Higaki K, Yamasaki M, Okano H: A novel marker for Purkinje cells, KIAA0864 protein. An analysis based on a monoclonal antibody HFB-16 in developing human cerebellum. *J Histochem Cytochem* 53: 423-430, 2005.
 7. Nagato M, Heike T, Kato T, Yamanaka Y, Yoshimoto M, Shimazaki T, Okano H, Nakahata T: Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using combination of the surface markers. *J. Neurosci.Res.* 80: 456-466, 2005.
 8. Hishikawa K, Marummo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Kohike H, Komori T, Hayashi M, Nakaki T, Nakauchi H, Okano H, Fujita T. Leukemia inhibitory factor induces multi-lineage differentiation of adult stem-like cells in kidney via kidney-specific cadherin 16. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 328: 288-291, 2005.
 9. Suzuki K, Fukui H, Kayahara T, Sawada M, Seno H, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T: Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* 328: 348-352, 2005.
 10. Iwanami A, Yamane J, Katoh H, Nakamura M, Momomoshima S, Ishii H, Tanioka Y, Tamaoki N, Nomura T, Toyama Y, Okano H: Establishment of Graded Spinal Cord Injury Model in a Non-human Primate: the Common Marmoset. *J. Neurosci,Res.* 80: 172-181 (2005)
 11. Iwanami, A., Kakneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Nomura, T., Toyama, Y. and Okano, H.: Transplantation of human neural stem/progenitor cells promotes functional recovery after spinal cord injury in common marmoset. *J. Neurosci.,Res.* 80: 182-190, 2005.

12. Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, Urasaki Y, Hamada J, Tanaka H, Dang NH, Okano H, Morimoto C: Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated and may remodel neurons after transient global ischemia. *Stroke* 36: 2457-2462, 2005.
13. Sakatani T, Kaneda A, Iacobuzio-Donahue CA, Carter MG, Witzel SB, Okano H, Ko, MSH, Ohlsson R, Longo DL, Feinberg AP: Loss of imprinting of *Igf 2* alter intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science* 307: 1976-1978, 2005.
14. Crespel A, Rigau V, Coubes P, Rousset MC, de Bock F, Okano H, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Lerner-Natoli M. : Increased neurogenesis in human temporal lobe epilepsy: evidence for a new neurogenesis area, the fissura hippocampi. *Neurobiology of Disease* 19: 436-450, 2005.
15. Yano M, Okano HJ, Okano H: Involvement of Hu and hnRNP K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 280: 12690-12699, 2005.
16. Islam MO, Kanemura Y, Tajria J, Mori H, Kobayashi S, Hara M, Yamasaki M, Okano H, Miyake J: Functional expression of ABCG2 transporter in human neural stem/progenitor cells. *Neurosci. Res.* 52: 75-82, 2005.
17. Akamatsu W, Fujiwara H, Mitsuhashi T, Yano M, Shibata S, Hayakawa Y, Okano HJ, Sakakibara S, Takano H, Takano T, Takahashi T, Noda T, Okano H: RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 102: 4625-4630, 2005.
18. Tamura M, Nakamura M, Ogawa Y, Toyama Y, Miura M and Okano H: Targeted expression of anti-apoptotic protein, p35, in oligodendrocytes reduces delayed demyelination and functional impairment after spinal cord injury. *Glia* 51: 312-321, 2005.
19. Yoda A, Kouike H, Okano H and Sawa H.: Components of the transcriptional Mediator complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. *Development* 132: 1885-1893, 2005.
20. Kitagawa A, Nakayama T, Takenaga M, Matsumoto K, Tokura Y, Ohta Y, Ichinohe M, Yamaguchi Y, Suzuki N, Okano H, Igarashi R: Lecithinized brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of embryonic stem cells in

- vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 328:1051-1057, 2005
21. Pignatelli A, Kobayashi K, Okano H, Belluzzi O: Functional responses of dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *J. Physiol.* **564**: 501-514., 2005.
 22. Akasaka Y, Saikawa Y, Fujita K, Kubota T, Ishii T, Okano H, Kitajima M: Expression of a candidate marker for progenitor cells, Musashi-1, in the proliferative regions of human antrum and its decreased expression in intestinal metaplasia. *Histopathology*47: 348-356, 2005
 23. Uchida K, Momiyama T, Okano H, Yuzaki M, Koizumi A, Mine Y, Kawase T: Potential functional neural repair with grafted neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin *Neurosci. Res.* 53: 276-286, 2005
 24. Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Fukami S, Itabashi Y, Hattori F, Shinazaki T, Ogawa S, Okano H and Fukuda K.: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nature Biotech.* 23: 607-611, 2005.
 25. Kambara H, Okano H, Chiocca A, Saeki Y: An oncolytic HSV1 mutant expressing ICP34.5 under control of a nestin promoter increases survival of animals, even when symptomatic from a brain tumor. *Cancer Research* 65: 2832-2839, 2005.
 26. Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, Suzuki N, Adachi K, Kawase T, Mihara M, Ohsugi Y, Abe K, Okano H.: Blockade of IL-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice. *J. Neurochem.* 94: 459-468, 2005
 27. Matsuda Y, Wakamatsu Y, Kohyama J, Okano H, Fukuda K, Yasugi S: Notch signaling functions as a binary switch for the determination of glandular and luminal fates of endodermal epithelium during chicken stomach development. *Development* 132: 2783-2793, 2005.
 28. Yoshimi K, Ren Y.-R., Seki T, Yamada M, Hayakawa H, Ooizumi H, Onodera M, Saito Y, Maruyama S, Okano H, Mizuno Y, Mochizuki H.: Possibility of neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain. *Ann Neurol* 58: 31-40, 2005
 29. Mori A, Ueda T, Shimizu H, Yoshitake A, Hachiya T, Onoguchi K, Takakura H, Yoshitake M, Taguchi S, Cho Y, Inoue S, Kabei N, Okano H, Yozu R, Sasaki T: An

- Epidural Cooling Catheter Protects the Spinal Cord Against Ischemic Injury in Pigs. *Annals of Thoracic Surgery* 80: 1829-1833, 2005.
30. Islam MO, Kanemura Y, Tajria J, Mori H, Kobayashi S, Miyake J Hara M, Yamasaki M, Okano H: Characterization of ABC transporter, ABCB1 expressed in human neural stem/progenitor cells. *FEBS Lett.* 579: 3473-3480, 2005.
 31. Sasaki E, Hanazawa K, Kurita R, Akatsuka A, Yoshizaki T, Ishii H, Tanioka Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Sugawara A, Tamaoki N, Izawa K, Nakazaki Y, Hamada H, Suemori H, Asano S, Nakatsuji N, Okano H, Tani K.: Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Stem Cells* 23:1304-1313, 2005.
 32. Nakamura M, Okano H, Toyama Y, Dai HN and Bregman BS: Transplantation of embryonic spinal cord-derived neural stem cells support growth of suprapinal projections and functional recovery after spinal cord injury in neonate rat. *J. Neurosci Res* 81: 457-468, 2005.
 33. Hishikawa K, Marumo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Ichiyanagi T, Kohike H, Komori T, Takahashi I, Takase O, Imai N, Yoshikawa M, Inowa T, Hayashi M, Nakaki T, Nakauchi H, Okano H, Fujita T: Musculin/MyoR is expressed in kidney sidepopulation cells and can regulate their function. *J. Cell Biol.* 169: 921-928, 2005.
 34. Sahara M, Sata M, Matsuzaki Y, Tanaka K, Morita T, Hirata Y, Okano H, Nagai R: Comparison of various bone marrow fractions in the ability to participate in vascular remodeling after mechanical injury. *Stem Cells* 23: 874-878., 2005.
 35. Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K., Okano H: Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J. Neurosci Res.* 81:776-788, 2005.
 36. Jomphe C, Bourque MJ, Fortin GD, St-Gelais F, Okano H, Kobayashi K, Trudeau LE. Use of TH-EGFP transgenic mice as a source of identified dopaminergic neurons for physiological studies in postnatal cell culture. *J Neurosci Methods.* 146: 1-12, 2005.
 37. Matsumoto T, Okamoto R, Yajima T, Mori T, Okamoto S, Ikeda Y, Mukai M, Yamazaki M, Oshima S, Tsuchiya K,

- Nakamura T, Kanai T, Okano H, Inazawa J, Hibi T, Watanabe M. Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine. *Gastroenterology*. 128:1851-1867, 2005.
38. Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Iwamoto Y, Nakamura M, Miyoshi H, Okano HJ, Contag CH, Toyama Y, Okano H: In vivo imaging of grafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J*. 19:1839-41, 2005.
39. Tomita Y, Wakamatsu Y, Shibuya I, Matsumura K, Kawaguchi H, Hisaka Y, Matsuzaki Y, Osumi N, Ogawa S, Okano H and Fukuda K: Cardiac neural crest cells as dormant multipotent stem cells, identified as side population cells. *J. Cell Biol*. 170: 1135-1146, 2005.
40. Kohyama J, Tokunaga A, Fujita Y, Miyoshi H, Nagai T, Miyawaki A, Nakao K, Mastuzaki Y and Okano H: Visualization of spatio-temporal activation of Notch signaling: live monitoring and significance in neural development. *Dev. Biol*. 286: 311-325, 2005.
41. Kanuka, H., Kuranaga, E., Hiratou, T., Okano, H. and Miura, M.: *Drosophila* Caspase transduce Shaggy/GSK-3 activity in neural precursor development. *EMBO J* 24: 3793-3806, 2005
42. Yamamoto S, Yoshino I, Shimazaki T, Murohashi M, Lax I, Okano H, Shibuya M, Sclegginger J, Gotoh N: Essential role of Shp2-binding sites on FRS2{alpha} for corticogenesis and for FGF2-dependent proliferation of neural progenitor cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 102: 15983-15988, 2005.
43. Suzuki T, Izumoto S, Wada K, Fujimoto Y, Maruno M, Yamasaki M, Kanemura Y, Shimazaki T, Okano H, Yoshimine T. Inhibition of glioma cell proliferation by neural stem cell factor. *J Neurooncol*. 74: 233-239, 2005.
44. Iijima T, Imai T, Kimura Y, Bernstein A, Okano HJ, Yuzaki M, Okano H. : RNA-binding protein HZf specifically binds to 3'-untranslated region of type1 *inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor* mRNA and is involved in its dendritic localization. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 102: 17190-17195, 2005.
45. Asai R, Okano H, Yasugi S: Correlation between *Musashi-1* and *c-hairy-1*

- expression and cell proliferation activity in the developing intestine and stomach of both chicken and mouse. *Dev. Growth Diff.* In Press, 2005.
46. Kanai R, Tomita H, Shinoda A, Takahashi M, Goldman SA, Okano H, Kawase T, Yazaki T: Enhanced therapeutic efficacy of G207 for the treatment of glioma through Musashi1 promoter retargeting of γ 34.5-mediated virulence. *Gene Therapy* In Press, 2005.
47. Toriya M, Tokunaga A, Sawamoto K, Nakao K, Okano H: Distinct functions of human Numb isoforms revealed by misexpression in neural precursor cells in *Drosophila* larval brain. *Dev. Neurosci.* In Press, 2005.
48. Inaji M, Y. T., Okauchi T, Maeda J, Nagai Y, Nariai T, Ohno K, Ando K, Okano H, Obayashi S, Suhara T: In vivo PET measurements with [^{11}C]PE2I to evaluate fetal mesencephalic transplantation to unilateral 6-OHDA-lesioned rats. *Cell Transplantation*. In Press, 2005.
49. Kanuka, H., Hiratou, T., Igaki, T., Kanda, H., Kuranaga, E., Sawamoto, K., Aigaki, T., Okano, H. and Miura, M.: Gain-of-function screen identifies a role of the Sec61 α transcolon in *Drosophila* postmitotic neurotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* In Press, 2005
50. Sugiyama-Nakagiri Y, Akiyama M, Shibata S, Okano H, Shimizu H: Expression of RNA-binding protein Musashi in hair follicle development and hair cycle progression. *American J. Pathology* In Press, 2005
51. Fukuhara Y, Li X-K, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, Okano H, Takahashi T, Okuyama T: Histopathological and behavioral improvement of murine Mucopolysaccharidosis type VII by intra-cerebral transplantation of neural stem cells. *Molecular Therapy*. In Press, 2005.
52. Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Aoki M, Sobue G, Itoyama Y, Okano H: Disease progression of SOD1 (G93A) ALS model rats. *J. Neurosci Res* In Press, 2005.
53. Ikegami T, Nakamura M, Yamane J, Katoh H, Okada S, Iwanami A, Kota W, Ishii K, Kato F, Fujita H, Takahashi T, Toyama Y, Okano H: Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances their migration

and axonal regeneration after rat spinal cord injury. *Eur J Neurosci* In Press, 2005

54. Kanemura Y, Mori H, Nakagawa A, Islam MO, Kodama E, Yamamoto A, Shofuda T, Kobayashi S, Miyake J, Yamazaki T, Hirano S, Yamasaki M and Okano H: In vitro screening of exogenous factors for human neural stem/progenitor cell proliferation using measurement of total ATP content in viable cells. *Cell Transplantation*. In Press, 2005.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Stevens-Johnson 症候群と drug-induced hypersensitivity syndrome 発症における免疫学的背景の比較検討

分担研究者 塩原哲夫 杏林大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 同じ薬剤でもたらされる Stevens-Johnson 症候群(SJS)と drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)の発症時における免疫学的、ウイルス学的な背景を解析した。両疾患では発症に至るまでの薬剤内服日数が相違し、発症時の CD3+, CD8+T 細胞数、免疫グロブリン値でも著明な相違が認められた。また、発症時の抗 herpes simplex virus IgG 抗体価においても有意な差が検出された。個体における薬剤に対する免疫学的な modulation の感受性の相違やウイルス再活性化状況などの相違が SJS、DIHS という異なった病態の発症に反映している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群 (SJS) と drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)は抗けいれん剤、尿酸降下薬、スルフォン剤などの類似した薬剤で発症することが知られている。両疾患は同じ薬剤に対するアレルギー反応でありながら、なぜ異なる臨床症状や異なる経過もたらすのか、という点についてはほとんど解明されていない。本研究では発症時における両疾患の免疫学的背景やウイルス学的な背景を解析し、どのような因子が SJS と DIHS の相違をもたらすのかを解明することを目的とした。

B. 研究方法

平成 13 年から平成 17 年の間に杏林大学医

学部皮膚科を受診し、当研究班で提唱した SJS 及び DIHS の診断基準案をそれぞれ満たした SJS 7 例（男性 6 例、女性 4 例）平均年齢 29 歳、同様に診断基準案をみたした典型 DIHS 7 例（男性 5 例、女性 5 例）平均年齢 33 歳について、薬剤内服期間を比較するとともに、発疹発症時の末梢血を採取し、白血球数、リンパ球数、CD3+, CD19+, CD4+, CD8+細胞数、血清免疫グロブリン量、human herpesvirus 6 (HHV-6), herpes simplex virus (HSV) IgG 抗体価などについて比較検討した。検体はいずれも患者本人の同意を得て発症時、ステロイド治療前に末梢血を採取し施行した。また、幾つかの症例においては回復期にも同様に血液を採取して検討した。

C. 研究結果

SJS、DIHS の原因薬剤は大部分の症例で抗けいれん剤であった。発疹出現までの薬剤内服期間では SJS は平均 15 日、DIHS では平均 35 日であった。末梢血の白血球数は SJS では平均 7130/mL であったのに対して DIHS では 1139/mL と有意に増加していた。リンパ球数でも SJS では 998/mL であったが、DIHS では 2291/mL と著明に増加していた。リンパ球のサブセットの比較では CD3+細胞はそれぞれ 998/mL, 1868/mL で SJS に比べて DIHS で増加していたが、CD19+細胞数には有意な差は認められなかった。また、CD4+細胞では両疾患に有意な差は検出されなかったが、CD8+細胞数では SJS では 256/mL であったのに対して DIHS では 743/mL と DIHS で有意に増加していた。

また、CD19+細胞数に両疾患で発症時に有意差はみられなかったが、血清 IgG, IgM は DIHS では著明に減少していた。

一方、抗 HHV-6IgG 抗体の発症時と回復後の比較では SJS では変動は認められなかったが、DIHS ではすべての症例で 4 倍以上の上昇が検出された。HHV-6DNA は発症時には両疾患ともに検出されなかったが、DIHS の 3 例で 2 - 3 週間目に検出された。抗 HSVIgG 抗体は SJS では発症時に上昇している例が多く認められ、回復期には減少する傾向が認められたが、この傾向は DIHS では全くみられなかった。いずれの疾患においても全経過中、白血球中に HSV DNA は検出されなかった。

D. 考察

SJS、DIHS とともに CD19+細胞が減少していたが、DIHS ではさらに免疫グロブリンも減少していた。抗けいれん剤などが一般に B 細胞の分化を妨げるといふ本来の薬理作用とは異なる免疫学的な modulation を有していることを考慮すると DIHS と SJS では薬剤に対する感受性が異なっている可能性が考えられる。さらに、ウイルス抗体価の変動では DIHS では発症から遅れて HHV-6 の IgG 抗体価が上昇したが、SJS では DIHS に比較して発症時から HSV の IgG 抗体価が上昇していることが確認され、回復期にはこの低下傾向が認められた。すなわち、薬剤内服一発症時におけるウイルスの再活性化状況が異なっている可能性が考えられた。

E. 結論

同じ薬剤でありながら個体に SJS、DIHS という異なる病態をもたらす因子として、SJS と DIHS では薬剤によりもたらされる免疫学的 modulation の感受性（免疫学的影響を回避するメカニズム）が異なっている可能性や薬剤摂取時におけるウイルス感染・ウイルス再活性化状況が相違している可能性が示唆され、これらの因子が SJS、DIHS という異なる病態の発症に反映している可能性が推測された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成 17 年度)

1. 論文発表

1. Shiohara T, Inaoka M, Kano Y: Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS): a reactivation induced by a complex interplay among herpesviruses and antiviral and antidrug immune responses. *Aller International* in press
2. Shiohara T, Kano Y: Are viral infections responsible for the development of drug-induced hypersensitivity syndrome as well as graft-versus-host diseases? *Dermatology* 210: 259-260, 2005
3. Kano Y, Inaoka M, Sakuma K, Shiohara T: Virus reactivation and intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy of drug-induced hypersensitivity syndrome. *Toxicology* 209: 165-167, 2005
4. 平原和久, 福田知雄, 狩野葉子, 塩原哲夫, 樋田哲夫: フェニトインによる Stevens-Johnson 症候群の 1 例- 当教室経験例における眼病変の検討-. *皮膚臨床* 47: 23-27, 2005
5. 塩原哲夫: 薬剤性過敏症症候群: 臨床像. *Topics in Atopy アトピーは今*. 4: 8-13, 2005.
6. 山崎 究, 勝田倫江, 狩野葉子, 塩原

哲夫: C 型慢性肝炎の IFN 療法中に出現した紅斑. *臨皮* 59:1059-1062, 2005.

7. 佐久間恵一, 福田知雄, 狩野葉子, 塩原哲夫, 伊東貴雄, 作田 学: ADH 分泌異常症候群と脳炎を合併した drug-induced hypersensitivity syndrome の 1 例. *臨皮* 59:1302-1305, 2005.

2. 学会発表

1. 平原和久, 守田亜希子, 佐久間恵一, 福田知雄, 狩野葉子, 塩原哲夫: 全血中の EB ウイルスの変動を観察した drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS). 日本皮膚科学会第 295 回長崎地方会, 長崎, 平成 17 年 2 月 12 日.
2. 佐久間恵一, 福田知雄, 早川和人, 塩原哲夫: 帯状疱疹との関連が示唆された浸潤性紅斑の 1 例. 第 68 回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 東京, 平成 17 年 2 月 20 日.
3. 佐久間恵一, 平原和久, 福田知雄, 狩野葉子, 塩原哲夫: Sequential なヘルペスウイルス再活性化の一環として帯状疱疹を認めた DIHS. 第 104 回日本皮膚科学会総会, 横浜, 平成 17 年 4 月 23 日.

4. 浅野祐介, 平原和久, 早川和人, 塩原哲夫: 薬剤およびウイルス感染の関与が考えられた linear IgA disease の 1 例. 日本皮膚科学会第 799 回東京地方会(城西地区), 東京, 平成 17 年 5 月 21 日.
5. 平原和久, 佐久間恵一, 福田知雄, 塩原哲夫: 全血漿交換 (PE) にて軽快後, 敗血症性ショックを合併した TEN の 1 例. 日本皮膚科学会第 800 回合同臨床東京地方会, 東京, 平成 17 年 6 月 25 日.
6. 満山陽子, 守田亜希子, 平原和久, 早川和人, 狩野葉子, 塩原哲夫: Stevens-Johnson 症候群における DLST の測定時期の検討. 第 35 回日本皮膚アレルギー学会・JSCD 総会, 横浜, 平成 17 年 7 月 16 日.
7. 満山陽子, 浅野祐介, 早川和人, 塩原哲夫: 初診時 Stevens-Johnson 症候群が疑われたが無治療で軽快した 1 例. 日本皮膚科学会第 803 回東京地方会(城西地区), 東京, 平成 17 年 11 月 19 日.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Stevens-Johnson 症候群（SJS）と Toxic Epidermal Necrolysis（TEN）の治療
—ステロイドパルス療法と少量免疫グロブリン静注療法の併用療法—

分担研究者 飯島正文 昭和大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 SJS, TEN の治療指針に関する最近の世界的コンセプトは、第一に早期診断と疑わしい原因薬剤の中止、第二にステロイド全身投与が基本である。また、その他に併用すべき治療法として血漿交換療法、シクロスポリン療法、免疫グロブリン（大量）静注療法などが挙げられる。そこで昭和大学病院附属東病院皮膚科に過去 3 年間, SJS として入院した症例と経過中に TEN に移行した症例も含めて、ステロイドパルス療法（メチルプレドニゾロン 1,000 mg / 日：パルス療法）と少量免疫グロブリン静注療法（5 g / 日：少量 IVIG 療法）の併用療法を行った症例について文献的考察もふまえて解析を行った。その結果、高熱はすみやかに解熱するが、皮疹の進行を抑える臨床的効果は認められなかった。IVIG の用量は、5 g / 日では不十分で、少なくとも 10g / 日、重症例では 20g / 日以上が必要と考えられた。

研究協力者

渡辺秀晃（昭和大学医学部皮膚科）

北見 周（昭和大学医学部皮膚科）

A. 研究目的

SJS, TEN の治療指針に関する最近の世界的コンセプトは、第一に早期診断と疑わしい原因薬剤の中止、第二にステロイド全身投与が基本である。また、その他に併用すべき治療法として血漿交換療法、シクロスポリン療法、免疫グロブリン（大量）静注療

法などが挙げられる。1998 年のスイス Geneva 大グループの TEN に対する画期的で注目すべき治療法として、免疫グロブリン大量静注（Intravenous Immunoglobulin : IVIG）療法が報告され、以来その有効性が認められつつある。一方、現在の保険診療における免疫グロブリン製剤は、低・無ガ

ンマグロブリン血症，重症感染症における抗生物質との併用の他，特発性血小板減少性紫斑病，川崎病の急性期，慢性炎症性脱髄性多発根神経炎などが適応疾患で，200～400 mg / kg を5日間程度用いることが認められているのみである．そこで我々は，重症薬疹に対し，重症感染症における抗生物質との併用療法として保険で容認されている用法・用量に準じ，5 g / 日を3日間の免疫グロブリン静注療法（少量 IVIG）とメチルプレドニゾン 1,000 mg / 日を3日間のステロイドパルス療法（パルス療法）との併用療法を試みた．

B. 研究方法

保険適用外医療であるため，昭和大学の「医学部医の倫理委員会」で審査を受け，承認を得た「重症型薬疹（特に toxic epidermal necrolysis; TEN, Stevens-Johnson syndrome; SJS, drug-induced hypersensitivity syndrome; DIHS）に対する高用量ヒト免疫グロブリン静注（intravenous immunoglobulin; IVIG）療法」（説明書・同意書）を，過去3年間，昭和大学病院附属東病院皮膚科に SJS として入院した症例と経過中に TEN に移行した症例も含めて4症例を，臨床症状を中心に検討した．

C. 研究結果

1. 患者背景

年齢は16歳，22歳，39歳，53歳で平均32.5歳，男女比は1：4，原因薬剤および経過か

ら最も原因と思われる薬剤は，サラゾピリン^R（潰瘍性大腸炎），テグレート^R（帯状疱疹後神経痛），PL 顆粒^R（感冒症状），ブルフェン^R，ソロン^R（感冒症状）であった．パッチテストまたは薬剤リンパ球刺激試験（drug-lymphocyte stimulation test : D-LST）で陽性を認めた原因薬剤は，テグレート^R，PL 顆粒^Rであった．原因薬剤および経過から最も原因と思われる薬剤の内服から症状出現までの期間は，14日（サラゾピリン^R），1ヵ月（テグレート^R），3日（PL 顆粒^R），2日（ブルフェン^R，ソロン^R），症状出現から治療開始までの期間は3日から4日であった．

2. 治療

パルス療法と少量 IVIG 療法の併用療法を2日から3日施行しその後プレドニンを漸減していった．また眼症状の高度な症例においては，連日の眼科的局所療法を行った（デブリドマン・洗浄，ステロイド・抗生物質点眼）．

3. 臨床的検討

パルス療法と少量 IVIG 療法施行後，ステロイドは漸減しながら継続治療していることから早期治療効果の判定として，治療開始日と第5病日±2日目の以下の項目を，比較検討した．

<発熱>

症例1：40.2℃から36.5℃，症例2：40.0℃から36.6℃，症例3：39.7℃から36.5℃，症例4：38.0℃から36.9℃と4例ともすみやかな解熱を認めた．

＜皮疹の程度＞

皮疹の面積は9の法則(Wallace)を用いて算定した。症例1：皮疹面積54%，剥離面積9%（びらん・水疱・粘膜病変を含む）から皮疹面積62%，剥離面積27%と、皮疹面積の拡大と剥離面積の拡大を認めた。眼球結膜は軽度の充血のみで後遺症なく軽快したが、口唇粘膜のびらは進行した。症例2：皮疹面積30%，剥離面積5%から皮疹面積32%，剥離面積6%ともにわずかの拡大を認めた。眼球結膜充血と眼脂を認めたが充血・眼脂とも軽快した。口唇粘膜のびらは進行した。症例3：皮疹面積4%，剥離面積2%から皮疹面積4%，剥離面積4%とあまり拡大しなかった。眼球結膜の充血は軽快したが、開口困難であった口唇粘膜のびらは進行した。症例4：皮疹面積17%，剥離面積6%から皮疹面積20%，剥離面積12%とともに拡大した。開眼不能で、結膜の充血、睫毛の脱落、偽膜性結膜炎と角膜びららを認めた。連日の眼科的局所療法を行ったが症状は遷延した。口唇粘膜のびらは進行した。

＜検査異常＞炎症症状と肝機能について検討した。症例1：CRP(mg/dl)は7.3から4.2, ALT(IU/l)154から58, AST(IU/l)214から129とそれぞれ軽快した。症例2：CRP(mg/dl)21.7から7.7, ALT(IU/l)92から55, AST(IU/l)64から46とそれぞれ軽快した。症例3：CRP(mg/dl)12.3から3.0と軽快し, ALT, ASTは正常範囲内であった。症例4：CRP(mg/dl)27.1から10.9, と軽快

したが, ALT(IU/l)39から46, AST(IU/l)59から106とそれぞれ上昇した。

D. 考察

重症型薬疹の多くは急激な病勢の進行により時に致死性の経過を辿ることも稀ではない。またSJS, TENにおいては、迅速かつ適切な治療が行われない場合、下気道の拘束性呼吸機能障害、角膜障害を来す。特に後者では、角膜混濁をもたらす程度の差はあるが失明をきたすことや、睫毛欠損や眼球乾燥症状を後遺症として残す。原因薬剤の中止とステロイド療法によるこれまでの通常の治療だけでは対応に苦慮する症例が最近増える傾向を示す中で、その治療法の確立が今日差し迫った課題となっている。

重症型薬疹に対して、ステロイドパルス療法を実施する症例が多いが、この治療で進行を抑えられない場合や感染症を併発している場合には、IVIg(5-20g/日, 稀に30-40g/日)の併用もしくは単独療法の優れた治療効果が報告されている。スイスGeneva大のViardら(Viard et al. Science; 1998; 282:490-493)はTENに対して高用量IVIgが10例中全例で有効, Stellaら(Stella et al. Dermatology; 2001; 203:45-49)はメチルプレドニゾン1g/日のパルス療法に高用量IVIgを併用し9例中8例が有効, Sanwoら(Sanwo et al; J Allergy Clin Immunol; 1996;98:1112-1115)はAIDS患者に生じたSJSに対して高用量IVIgが2例中2例とも有効であったと報告している。最近ではPrinsら(Prins C te al. Arch Dermatol;

2003; 139:26-32)がその有効性と安全性について報告している。3g/kg/日の高用量 IVIG は画期的な治療法と考えられる。

E. 結論

昭和大学病院附属東病院皮膚科に過去3年間、SJSとして入院した症例と、経過中にTENに移行した症例も含めて4症例に対し、重症感染症における抗生物質との併用療法として保険で容認されている用法・用量に準じ、5g/日を3日間の免疫グロブリン静注療法(少量IVIG)と1,000mg/日、3日間メチルプレドニゾンによるステロイドパルス療法(パルス療法)との併用療法を試みた。臨床的に高熱はすみやかに解熱するが、皮疹面積および、剥離面積の拡大を認めた。口唇粘膜症状では腫脹は軽減するものの、全例に粘膜びらんの拡大を認めた。眼症状においては軽症例では結膜充血、眼脂の減少などを認めたが、開眼不能で、結膜の充血、睫毛の脱落、偽膜性結膜炎と角膜びらんを認めた重症例では、眼科的局所療法が奏功した。以上より5g/日のIVIG、3日間の免疫グロブリン静注療法(少量IVIG)では皮疹の進行を抑える臨床的効果は認められなかった。このことからIVIG5g/日では不十分で、少なくとも10g/日、重症例では20g/日以上が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表(平成17年度)

1. 論文発表

1. 渡辺秀晃, 飯島正文:多形滲出性紅斑:臨床診断に苦渋する100の外來皮膚疾患(宮地良樹編). P86-87, 東京:メディカルレビュー社 2005
2. 飯島正文:薬疹:日本皮膚科白書 第103回日本皮膚科学会総会記念 改訂版. P64-70, 東京:日本皮膚科学会. 2005
3. 飯島正文:重症型薬疹 疑い例は即刻皮膚科専門医へ:診療アップデート. P90-92, 東京:日経BP社. 2005
4. 飯島正文:Stevens-Johnson 症候群(SJS)/中毒性表皮壊死症(Toxic epidermal necrolysis, TEN)の診断と治療. 日集中医誌 12:183-186. 2005
5. 末木博彦, 飯島正文:重症薬疹におけるステロイドのエビデンス. 皮膚アレルギーフロンティア 9(3):180-182. 2005
6. 三上正史, 杉山美紀子, 西尾和倫, 末木博彦, 飯島正文:中毒性表皮壊死症を疑ったtoxic shock syndromeの1例. 臨床皮膚科 59(4):378-381. 2005

7. 北見 周, 末木博彦, 飯島正文 : よくみる副作用とその対処⑥ 皮膚疾患 皮膚粘膜眼症候群, 中毒性表皮壊死症など. JIM 16 (1) : 42-45. 2006
8. 渡辺秀晃, 末木博彦, 飯島正文 : 皮膚科診療プラクティス : 薬疹のバイブル : Stevens-Johnson 症候群 (SJS) (瀧川雅浩・宮地良樹編). 印刷中, 東京 : 文光堂 2006
3. 濱田和俊, 北見 周, 中田土起丈, 末木博彦 飯島正文 : SJS 進展型 TEN の 1 例と、診断に苦慮した SJS の 2 例. 第 35 回日本皮膚アレルギー 学会総会 (横浜, 2004.7)
4. 渡辺 秀晃, 北見 周, 濱田和俊, 末木博彦, 飯島正文, 藤山幹子, : 臨床経過は典型だが明らかな原因薬剤がない Hypersensitivity syndrome の 1 例. 第 35 回日本皮膚アレルギー 学会総会 (横浜, 2004.7)

2. 学会発表

1. 末木博彦, 飯島正文, : 教育講演 薬疹 重症薬疹の診断. 第 103 回日本皮膚科学会総会(横浜 2005.4)
2. 長村蔵人, 濱田和俊, 北見 周, 末木博彦, 飯島正文, 菊池琢也, 小出良平 : 重篤な眼病変を伴ったが, 眼科的局所療法により失明を免れた SJS/TEN の 1 例. 第 800 回日本皮膚科学会東京地方会(東京 2005.6)

G. 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