

200936003A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

「重症多形滲出性紅斑に関する調査研究」

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 橋 本 公 二

平成22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

「重症多形滲出性紅斑に関する調査研究」

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 橋本 公二

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I.	班員構成	1
II.	総括研究報告 重症多形滲出性紅斑に関する調査研究 橋本公二	2
III.	分担研究報告 Stevens-Johnson 症候群と中毒性表皮壊死症の表皮内に浸潤する CD16 陽性単球の役割についての検討 橋本公二	10
	薬剤性過敏症症候群回復後に生じる自己免疫現象の解析 塩原哲夫	14
	Stevens-Johnson 症候群および中毒性表皮壊死症患者における治療と 血清サイトカイン動態の検討 池澤善郎	18
	重症型薬疹のアンケート作成の試み(二次アンケート調査総論) -Stevens-Johnson 症候群(SJS)/ Toxic Epidermal Necrolysis (TEN) 登録表- 飯島正文・中村好一	24
	重症多形滲出性紅斑に伴う眼障害の病態と治療、予後に関する研究 外園千恵	29
	カルバマゼピンによる薬剤性過敏症症候群における HLA の解析 森田栄伸	33
	重症多形滲出性紅斑におけるウイルス再活性化機序の研究 -重症薬疹と GVHD における浸潤 T 細胞プロフィールについての研究- 浅田秀夫	39
	小児における中毒性表皮壊死症/Stevens-Johnson 症候群の疫学調査 相原雄幸	42
	DIHS 発症における形質細胞様樹状細胞の意義の検討 椛島健治	45
	フローサイトメトリーによる DLST の検討 小豆澤宏明	49
	重症薬疹に対する骨髄細胞を利用した再生医療開発のための基礎研究 玉井克人	54
	皮膚付属器を有する培養皮膚の作製 岸本治郎	57
	脂肪組織由来間葉系幹細胞の増殖と分化に関する研究 白方裕司	61
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	65
V.	平成 21 年度班会議プログラム	73
VI.	研究成果の刊行物・別刷	75

[I]

班員構成

班 員 構 成

研究者名		研究実施場所	職名
研究代表者	橋本 公二	愛媛大学大学院医学系研究科 感覚皮膚医学	教授
研究分担者	塩原 哲夫	杏林大学医学部 皮膚科学	教授
	飯島 正文	昭和大学医学部 皮膚科学	主任 教授
	池澤 善郎	横浜市立大学大学院医学研究科 環境免疫病態皮膚科学	教授
	外園 千恵	京都府立医科大学大学院医学研究 科・視覚機能再生外科学	講師
	森田 栄伸	島根大学医学部 皮膚科学	教授
	中村 好一	自治医科大学医学部 公衆衛生学	教授
	浅田 秀夫	奈良県立医科大学医学部 皮膚科学	教授
	相原 雄幸	神奈川県厚木保健福祉事務所	保健福祉部長
	椛島 健治	京都大学大学院医学研究科 皮膚科学	准教授
	小豆澤宏明	大阪大学大学院医学系研究科 皮膚科学	助教
	玉井 克人	大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学	准教授
	岸本 治郎	(株)資生堂新成長領域研究開発セ ンター 皮膚科学研究グループ	皮膚科学研究グル ープリーダー
	白方 裕司	愛媛大学大学院医学系研究科 再生医療研究センター	講師

[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

重症多形滲出性紅斑に関する調査研究

研究代表者 橋本公二

愛媛大学大学院医学系研究科 感覚皮膚医学 教授

研究要旨 重症多形滲出性紅斑は全身の皮膚多形紅斑、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する粘膜傷害と発熱を伴う疾患であり、表皮の壊死性変化、表皮剥離をきたし、しばしば重篤な視力障害を残す。従って、早期診断と迅速な治療が必要であり、そのための診断基準整備と治療法の確立が急務である。本研究は①重症多形滲出性紅斑の疫学調査、②診断基準の制定、③重症度の分類と治療ガイドラインの作成、④重症多形滲出性紅斑の発症に関与する遺伝子多型の解析、⑤後遺症である角膜欠損、皮膚欠損に対する皮膚・角膜再生医療の開発、を主な研究目的とした。重症多形滲出性紅斑の全国一次疫学調査を行うことにより有病率、死亡率、後遺障害などを明らかにし、詳細な調査登録票を発送した。また小児のSJS/TENの疫学調査を行い、患者数の推定、主な治療法について明らかにした。さらに重症多形滲出性紅斑に伴う眼障害の病態と治療、予後に関する調査を行った。薬剤性過敏症症候群 (DIHS)の治療指針を作成し、Stevens-Johnson 症候群 (SJS)、中毒性表皮壊死症 (TEN)の治療指針を皮膚科専門医に対して広く配信した。病態に関しては表皮内浸潤単球の性質、治療と血清サイトカインの動態、自己免疫現象、浸潤T細胞プロファイル、形質細胞様樹状細胞の面から検討を加え、薬剤によるリンパ球幼若化テストの新たな方法としてフローサイトメトリー法の有用性について明らかにした。重症多形滲出性紅斑の発症に関与する遺伝子多型の解析については患者群 59 例、対照群 75 例のサンプルを収集し、おおむね 80 例以上のサンプルの遺伝子解析を終了した。培養角膜、培養皮膚の簡易迅速作製法の開発、毛包を有する培養皮膚の開発、骨髄由来幹細胞、脂肪由来間葉系幹細胞を用いた表皮、角膜の再生法の開発に関する基礎的データを収集した。

研究分担者
塩原哲夫
杏林大学医学部
皮膚科学 教授

飯島正文
昭和大学医学部
皮膚科学 主任教授

池澤善郎
横浜市立大学大学院医学研究科
環境免疫病態皮膚科学 教授

中村好一
自治医科大学
公衆衛生学 教授

森田栄信
島根大学医学部
皮膚科学 教授

外園千恵
京都府立医科大学
眼科学 講師

玉井克人
大阪大学大学院医学系研究科
遺伝子治療学 准教授

相原雄幸
神奈川県厚木保健福祉事務所
保健福祉部長

岸本治郎
資生堂新成長領域研究開発センター
皮膚科学研究グループリーダー

椛島健二
京都大学大学院医学系研究科
皮膚科学 准教授

小豆澤宏明
大阪大学大学院医学系研究科
皮膚科学 助教

白方裕司
愛媛大学大学院医学系研究科
附属再生医療研究センター講師

A. 研究目的

重症多形滲出性紅斑は全身の皮膚多形紅斑、皮膚粘膜移行部のびらんを主症状とする皮膚粘膜傷害と発熱を伴う疾患であり、30%は死に至る重篤な疾患であり、重篤な視力障害を残す。従って、早期診断と迅速な治療が必要であり、そのための診断基準整備と治療法の確立が急務である。症例数が限られる疾患で、克つ重症の難治性疾患であるため、疫学調査が必須である。本研究は①重症多形滲出性紅斑の疫学調査、②診断基準の制定、③重症度の分類と治療ガイドラインの作成、④重症多形滲出性紅斑の発症機序、病態の解析、⑤後遺症である角膜欠損、皮膚欠損に対する皮膚・角膜再生医療の開発を主な研究目的とする。

重症多形滲出性紅斑の疫学調査を行うことにより有病率、死亡率、後遺障害などを明らかにし、発症予防、早期治療を行うことにより国民の保健、医療、福祉の向上が期待でき、ひいては治療費削減につながることを期待される。そのためには重症度をスコア化し、それを基に治療ガイドラインを制定する。重症多形滲出性紅斑の発症に関与する遺伝的背景が同定されれば薬剤の投与を控えることにより発症が予防できることが期待される。ゲノムワイドスクランと並行してHLAの検索を行う。病態に関してはほとんど明らかになっていないため、血中サイ

トカイン、免疫担当細胞、制御性T細胞、ウイルス再活性化メカニズムに焦点を当てて重点的に基礎研究を行う。重症多形滲出性紅斑の合併症としての角膜上皮欠損、皮膚欠損は患者にとってもっとも深刻な問題である。我々が提案する表皮幹細胞・骨髄幹細胞・脂肪組織由来間葉系幹細胞からの角膜再生は他に例をみない新規の治療法となるばかりでなく、再生医療の発展にも寄与する可能性を秘めており、全く新しくかつ独創的であると考えられる。また、上術の幹細胞を欠損部に遊走させる因子を用いた表皮・角膜再生は、骨髄幹細胞を分化誘導させて移植するのではなく、*in vivo*にて骨髄幹細胞を遊走させ、表皮および角膜上皮を再生させるという点で過去に報告のない独創的な研究といえる。

B. 研究方法

重症多形滲出性紅斑の疫学的検討

重症多形滲出性紅斑の疫学はほとんど明らかになっていないため、本研究班の目的の1つの大きな柱として重症多形滲出性紅斑の疫学調査をとりあげた。研究期間3年間で重症多形滲出性紅斑の疫学を明らかにする。1次調査票を平成19年度に作成し全国の主要施設へ送付し、約220施設から症例がありとの回答が得られたため、これらの施設に2次調査票を送付する。2次調査票を回収し、重症多形滲出性紅斑の有病率、後遺障害の有無などの頻度を解析する。最終年度には患者個人調査票を作成し、QOL, ADLを中心に調査を進める。さらに、ウェブサイトにて登録できるシステムについて検討する。

重症多形滲出性紅斑治療ガイドラインの制定：重症度に応じた副腎皮質ス

テロイドの内服、ステロイドパルス療法、血漿交換療法、高濃度免疫グロブリン静注療法について平成19年度にすべてのサブタイプのガイドライン案が完成したので、分担研究施設でこのガイドライン案に沿って治療を行い、問題点について協議し、治療指針を完成させる。

重症多形滲出性紅斑の発症機序・病態に関する研究：重症多形滲出性紅斑の病態を解明するために、薬剤、ウイルスと皮膚浸潤リンパ球との相互関係、サイトカインプロファイルなどについて患者由来細胞を用いて検討する。血中サイトカイン、免疫担当細胞、制御性T細胞、ウイルス再活性化メカニズムに焦点を当てて重点的に基礎研究を行う。また、病態解明のためのマウスモデルの確立、その他解析方法について開発を行う。

HLA遺伝子タイピング解析：カルバマゼピンによるSJS, TEN, DIHSの患者で、HLAの相関があるかについて検討する。地域間でのHLAの偏り、SJS, TEN, DIHSでのHLA, 薬剤毎でのHLAの相関を検討する。

遺伝子多型解析：DIHSの遺伝子多型解析を行う。SNP解析とともにゲノムワイドスキャンも行い候補遺伝子を解析する。すでに合計60症例分の試料を収集しており、解析のために必要最低数、患者・対照者からそれぞれ50症例分の試料の収集に努める。

培養角膜を用いた角膜上皮欠損の治療：すでに分担研究者の外園は培養角膜による治療法を開発し、臨床応用を行っているが、簡便かつ迅速な作製法を新たに開発する。

毛包を備えた培養皮膚の作製法の開発：毛包を備えた培養皮膚の作製法を開発するために、まず毛包の再生が可

能かについて検討する。すでに分担研究者の岸本は毛乳頭細胞と上皮細胞をミックスし、マウスへの移植実験を行い毛包の再構成が可能であることを示している。しかし、継代を繰り返して増殖させた細胞では、毛包誘導能が消失するため、培養法を見直すことにより毛包誘導能を維持した細胞を増殖させる技術を開発する。

骨髄幹細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞による表皮および角膜上皮再生の開発：重症多形滲出性紅斑に伴う皮膚欠損や角膜上皮欠損に対する全く新しい治療法として、骨髄幹細胞を患部に遊走させることにより表皮および角膜上皮再生を試みる治療法を開発する。骨髄幹細胞が表皮欠損部に遊走し、表皮を再生することが可能であることを予備実験にて知見を得ている。これをさらに発展させ、遊走させる因子、その因子を誘導する刺激や因子、さらに表皮および角膜上皮を再生させる因子について検討する。さらに脂肪組織由来間葉系幹細胞にても同様の所見が再現できるかについて検討する。

C. 研究結果

研究代表者の橋本はSJSとTENの病態形成に関与していると考えられている表皮内単球・マクロファージに注目して病態形成への関与を検討したところ、表皮内に浸潤する単球は、炎症を誘導する能力や細胞障害が強い細胞として報告されているCD16陽性単球であることを明らかとした。

研究分担者の塩原は、薬剤性過敏症症候群(DIHS)、Stevens-Johnson症候群/中毒性表皮壊死症の発症初期と回復期における自己抗体を検索し、DIHS

において回復期に高率に自己抗体が検出されることを見いだした。この所見は、DIHSにおいて特異的に検出されるヘルペスウイルスの再活性化や薬疹回復後にもたらされる制御性T細胞の機能的傷害に深く関与している可能性が推測された。

研究分担者の池澤は、2006年4月から2008年12月までの期間に横浜市立大学附属2病院で経験したSJSおよびTENの7症例について経過中の血中サイトカイン動態と治療効果の関係を検討した。7症例中ステロイド薬単独投与が3例、ステロイドパルス療法と全血漿交換療法を併用した重篤例は4症例であった。7症例はすべて後遺症を残さず治癒した。これらの患者のうち、併用療法を行なった重篤例では、発症早期、最悪期にIFN- γ 、TNF- α の炎症性サイトカインの著しい増加に加えてIL-10、IL-1raの抗炎症性サイトカインも上昇がみられ、血漿交換療法後にこれらは低下していた。発症期と最悪期のこれらの高サイトカイン状態は重症例における病勢を、治療後の低下は治療後の効果を反映していると思われた。

研究分担者の飯島と中村は、SJSとTENの本邦における発症頻度を全国の皮膚科専門医研修施設に対して1次アンケートを行い、607施設中332施設が回答(回答率54.7%)、協力が得られた施設は332施設中276施設であった。そのうち、重症薬疹の経験のある212施設を対象に二次調査票を郵送した。212施設中137施設から回答が得られた(回答率64.6%)。回答症例数から診断基準に合致した症例数はSJS症例数：2005年は49例、2006

年は69例、2007年は87例であった。同じくTEN症例数：2005年は25例、2006年は30例、2007年は46例であった。今後さらに詳細な調査を行うことにより被疑薬、後遺障害などを明らかにし、発症予防や早期治療につながると思われる。

研究分担者の外園は重症多型滲出性紅斑に伴う眼障害の病態と治療、予後に関する調査を行った。急性期SJSおよびTENの涙液および血清中サイトカインを測定したところ、急性期SJS/TENの眼表面炎症には、IL-6、IL-8、MCP-1が強く発現していた。一方、SJS/TEN発症時の症状と眼科治療、視力予後との関連を検討したところ、94例中86例が39°C以上の高熱を伴い、結膜炎、口唇の発疹、爪周炎が全例にみられた。発症1週以内にステロイドの眼局所投与が行われた群の視力は、非投与群より有意に良好であることが明かとなった。

研究分担者の森田は、カルバマゼピンによるDIHSの21例及びカルバマゼピンを3ヶ月以上内服するも薬疹を発症していない対照患者32例においてHLA血清タイピング、HLA-B locusの遺伝子タイピング、リンパ球幼弱化試験を行った。HLA血清タイピングではA31が患者群に有意に高頻度に検出された($P < 0.025$)。HLA-B locus遺伝子タイピングでは、特定のタイプとの有意な関連はみられなかった。カルバマゼピンによる重症薬疹に特異的と報告されたHLA-B*1502はみられなかった。DLST平均値は患者群で有意に高値を示したが($P < 0.001$)、特定のHLAタイプとの関連はみられなかった。

研究分担者の浅田はHHV-6の再活性化が共通してみられるGVHDとDIHSの病態形成にregulatory T細胞(Treg)を中心とした免疫調節系が、いかに関わっているのかを検討する目的で、種々のタイプの薬疹ならびにGVHDの皮疹部におけるTregの浸潤動態を免疫染色により検討した。その結果、皮膚部浸潤リンパ球におけるTreg割合は、DIHSでは皮疹出現後2週間以上高値を持続したのに対して、GVHDでは持続的に低値を示した。GVHDならびに、DIHS、SJS/TEN、紅斑丘疹型薬疹において、皮疹部へのTregの浸潤パターンに違いがあり、この違いが皮疹の臨床型や重症度に影響を及ぼしているものと考えられた。

分担研究者の相原は、SJS、TENは小児の報告例が少なく、実態が明らかではないことに注目し、小児のTEN/SJSについて全国調査を実施するための準備を開始した。さらに、TENの幼児例に対して血漿交換療法の有用性について検討した。

分担研究者の椛島はDIHS発症における形質細胞様樹状細胞の意義について検討した。DIHSの特徴の一つに、初発疹発症から約2週間後にHHV-6などのウイルスの再活性化とそれに伴う多臓器不全が挙げられる。ところがウイルス再活性化に関する機序についての詳細は不明が残る。そこで、強い抗ウイルス活性やB細胞活性化能を有する形質細胞様樹状細胞(pDC)に着目し、pDCのDIHSの臨床経過に伴う局在を解析した。DIHS患者(6例)、紅斑丘疹型薬疹(5例)と健常人(10例)の末梢血中の形質細胞様樹状細胞を

検証したところ、DIHS の患者において pDC の数が著明に低下し、さらに皮膚組織に pDC が多数浸潤していることが見出された。また、DIHS の回復と共に血中 pDC 数の回復も認められた。以上より、DIHS の初発皮疹部に形質細胞様樹状細胞が遊走し、血中 pDC 数が減少することにより、ウイルスの再活性化や血中 IgG の減少が誘導される、という可能性が示唆された。

研究分担者の小豆澤は従来

^3H -thymidine の取り込みを検出する DLST を、フローサイトメトリー (FCM) を用いることで、増殖細胞を特定・解析し、特に T 細胞免疫の役割について検討した。従来の DLST でみられた ^3H -thymidine の取り込み量に相関して、FCM でも CFSE が減弱し BrdU を取り込んだ増殖細胞を検出できた。分裂・増殖していたのは CD4 あるいは CD8 陽性の T 細胞のみであり、従来の DLST では T 細胞の分裂を検出していることが明らかとなった。とくに SJS の症例では CD8 陽性 T 細胞が優位に増殖していたことから、FCM を用いた DLST が薬疹の原因薬特定に有用であるのみならず、重症多形滲出性紅斑の病態研究へ応用できることを明らかにした。

研究分担者の玉井は、広範囲表皮壊死を伴う重症薬疹の新たな治療法として骨髄由来細胞を利用した再生医療開発を目的として研究を進めた。骨髄間質多能性細胞動員因子を利用して、骨髄由来細胞を末梢で集積させた後に回収し、培養により種々の皮膚構成細胞へと分化する能力を持つことを明らかにした。今後、骨髄間質多能性細胞動員因子を用いて回収した骨

髄由来 PDGFR・陽性細胞を利用して、重症薬疹をはじめとする難治性皮膚潰瘍の有効な再生医療法開発が期待できることを示した。

研究分担者の岸本は、これまで上皮と真皮の相互作用に着眼点をおいた、細胞移植による毛包を始めとする皮膚付属器官の再生を目指した基盤研究を進め、試験管内での毛包原基の再構成を目的に、毛包上皮系細胞と毛包間葉系細胞を混合してスフェア培養を行い、その性質を解析した。その結果、ヒト外毛根鞘細胞とヒト毛乳頭細胞から、効率良く毛包原基様の細胞塊を培養することが可能になった。今後、本研究で開発した細胞塊を培養皮膚に組み込むことで、毛包を有する培養皮膚のプロトタイプ作製が可能になると考えられる。

研究分担者の白方は角膜上皮欠損、皮膚欠損に対する再生医療法として培養角膜、三次元培養皮膚を開発してきたが、新たな再生医療法として脂肪組織由来間葉系幹細胞から培養角膜・培養皮膚を作製する方法を開発する目的のため、脂肪由来間葉系幹細胞の培養とその増殖と分化について検討した。脂肪組織から間葉系幹細胞を分離培養することが可能であり、その細胞が FGF2 により増殖が促進され、脂肪細胞、骨細胞への分化能を維持していることを明らかにした。

D. 考察

班員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、DIHS 治療指針を制定した。基本的には副腎皮質ステロイド剤の使用が必要であると考え、重症の場合

には大量のステロイド剤を使用する必要があると考える。また、その他の治療法としてヒト免疫グロブリン製剤静注療法、抗ウイルス薬の併用について言及した。今後はこの治療指針に基づいた治療を行い、症例を蓄積する必要があると考える。**SJS**、**TEN**、**DIHS**などの薬疹の臨床像の相違は、潜伏するウイルス感染の状況の違いに基づく免疫学的な反応性の差異によりもたらされている可能性があり、この病態の解明により重症薬疹の適切な治療につながる可能性があることを示唆している。**TEN**に関してモデルマウスが使用可能となった点は非常に重要な意味を持っていると思われる。このマウスを利用することにより病態解明のみならず、新規治療法の開発が飛躍的に進むことが期待できる。**DIHS**に関してはマウスモデルは存在しないが、骨髄移植後 **GVHD** の病態が **DIHS** と極似していることが明らかとなった。ウイルス再活性化やリンパ球の機能などについて並行して解析することによりさらなる知見が得られることが期待できる。

HLA 型に関する検討ではカルバマゼピンによる **DIHS** には **A31** が患者群に有意に高頻度に検出され、**HLA-B locus** 遺伝子タイピングでは対照群に **B*5201** の出現頻度が高かった。このように患者群ではなんらかの遺伝的背景の偏りがあることが示唆され、ゲノムワイドな遺伝子多型解析の必要性をあらためて感じさせる結果となった。症例数も増加してきており解析が進むことが期待される。疫学に関しては **SJS**、**TEN** の一次アンケート調査が終了し、推計患者数が明らかとなった。引き続き2次調査を開始しており、詳細な結果が得られると思われる。ま

た、小児の疫学は全くなされていないため疫学を開始するための準備が整った。来年度には開始できると予想される。また眼障害を伴う **SJS/TEN** の急性期には、全身および眼表面で炎症性サイトカイン (**IL-6**, **IL-8**, **MCP-1**) の著しい発現亢進が生じており、これらを抑制することが視力予後改善に重要であると思われる。

幹細胞研究に関しては、創傷刺激により骨髄細胞が表皮へ遊走し、線維芽細胞にもなりうることが明らかとなった。すなわち、前年度までの結果とあわせると、骨髄由来間葉系幹細胞で表皮と真皮を再生できることが示唆され、非常に興味深い知見が得られた。これらの結果を基に角膜や毛包の再生研究が飛躍的に発展することが期待される。

E. 結論

本研究により重症多形滲出性紅斑の疫学調査がスタートし、年間患者推計数が明らかとなった。**DIHS** に関しては治療指針を制定し、重症多形滲出性紅斑 (**SJS/TEN/DIHS**) の診断基準、治療指針が確立できた。重症多形滲出性紅斑におけるウイルスの再活性化、関与する遺伝子多型、血中サイトカイン、候補となりうるマーカーなど、病態が徐々に明らかとなりつつある。皮膚角膜再生については、骨髄間葉系幹細胞を用いた表皮・真皮の再生医療法の可能性を明らかにした。表皮細胞への分化誘導法の確立とそれに係わる分子機構の解明、さらには骨髄由来表皮幹細胞への安全かつ安定的遺伝子導入法の確立が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成 21 年度）

論文発表

巻末研究成果一覧表参照

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：3 件

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

[III]

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Stevens-Johnson 症候群と中毒性表皮壊死症の表皮内に浸潤する
CD16 陽性単球の役割についての検討

研究分担者 橋本公二

愛媛大学大学院医学系研究科 感覚皮膚医学 教授

研究要旨 重症多形滲出性紅斑である Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死症は、アポトーシスと壊死からなる広範な表皮の障害を特徴とする疾患であり、血清中の可溶性因子や病変部表皮に浸潤している炎症性細胞がその病態の形成に関与していると考えられている。Stevens-Johnson 症候群と中毒性表皮壊死症では、従来、表皮内に単球・マクロファージが多数浸潤していることが知られており、今回、われわれはこの細胞に注目して病態形成への関与を検討した。

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群と中毒性表皮壊死症は、多くは薬剤の投与に引き起こされる疾患で、粘膜と皮膚の広範な表皮障害を特徴とする。病変部では、表皮角化細胞のアポトーシスと壊死が認められ、その病態形成には、sFasL やグラニューライシンなどの可溶性因子や、細胞障害性 T 細胞が関与すると考えられている。しかし、表皮に浸潤する細胞障害性 T 細胞の数は、表皮の広範なアポトーシスと壊死を説明できる程多くはない。

一方、Stevens-Johnson 症候群と中毒性表皮壊死症の表皮には、多数の単球／マクロファージが浸潤していることが従来から知られている。これらの細胞は、TNF-alpha を産生し、病態形成に関与する可能性が示唆されているが、十分に検討されているとはいえない。近年、単球の中に、CD16 を発現し、炎症を強く誘導して細胞障害性を示す一群があることが明らかとな

っている。われわれは、Stevens-Johnson 症候群や中毒性表皮壊死症の表皮の障害に、これらの細胞が関与しているのではないかと考え、検討を行った。

B. 研究方法

(1) 病理組織による検討

1) Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死症、その他の薬疹の皮膚生検で採取された病理組織標本（パラフィンブロック）で、CD16 の免疫染色を行い、表皮内に浸潤する細胞数を、表皮障害の程度により比較検討する。

2) Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死症の凍結保存皮膚切片で、種々の CD マーカーを染色し、CD16 陽性細胞が単球由来であることを確認する。

(2) CD16 陽性単球の培養表皮角化細胞に対する細胞障害性の検討
成人末梢血より CD16 陽性単球を分離し、正常皮膚から採取した表皮角化細胞と共培養を行い、CD16 陽性単球の細

胞障害性を検討する。

C. 研究結果

(1) Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死症の表皮内には、表皮の細胞障害に相関して、CD16 陽性細胞数が増加していることが明らかとなった。また、CD16 陽性細胞は、CD14、HLA-DR を発現し、NK 細胞のマーカーの発現は認めず、従来報告されている CD16 陽性単球として矛盾しない結果であった。

(2) 末梢血より採取した CD16 陽性細胞は、培養表皮角化細胞に対し、低い Effector cell/Target cell 比で細胞障害性を示した。

D. 考察

重症多形滲出性紅斑としての Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死症は、表皮細胞のアポトーシスと壊死を特徴とする。細胞障害性 T 細胞が表皮の障害に重要な役割を果たすと考えられており、その機序としてパーフォリン・グランザイム系、グラニューライシンの産生などが報告されているが、表皮内に浸潤している細胞数が少ないことは、広範な表皮の障害を十分に説明できない。

表皮内に浸潤する単球は、その数が細胞障害性 T 細胞に比べて非常に多い。単球は TNF- α を豊富に産生することより、表皮障害への関与を示唆する報告がある一方で、最近では、表皮障害の結果としての浸潤と考える傾向が強くなっている。今回、われわれは、表皮内に浸潤する単球が、単球のなかでも炎症の誘導性が強く、細胞障害性も有する CD16 陽性単球であることを明らかとし、また、*in vitro* の実験では、表皮角化細胞に対する細胞障害性

も明らかとした。これらの結果は、病変部表皮内の単球が、表皮の障害そのものに関与する可能性を強く示唆するものである。

E. 結論

Stevens-Johnson 症候群と中毒性表皮壊死症の表皮内に浸潤する単球は、炎症を誘導する能力や細胞障害が強い細胞として報告されている CD16 陽性単球であることが明らかとなった。表皮に浸潤する単球が、広範な表皮障害に関与している可能性が示唆され、今後、この細胞を標的とした治療も考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表（平成 21 年度）

論文発表

1. Sotozono C, Ueta M, Koizumi N, Inatomi T, Shirakata Y, Ikezawa Z, Hashimoto K, Kinoshita S.: Diagnosis and treatment of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Ophthalmology*. 2009 116:685-90.
2. Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K.: The influence of hepatic damage on serum soluble Fas ligand levels of patients with drug rashes. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 123:971-2
3. Hara Y, Shiraishi A, Kobayashi T, Kadota Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Ohashi Y.: Alteration of TLR3 pathways by glucocorticoids may be responsible for immunosusceptibility of human corneal epithelial cells to

- viral infections. *Mol Vis.* 2009
15:937-48
4. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Okazaki H, Sayama K, Hashimoto K.: IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur J Immunol.* 2009 39:2279-88
 5. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K: Living Skin Equivalents Constructed Using Human Amnions as a Matrix. *J Dermatol Sci.* 2009 56:188-95
 6. Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Kamata N, Higashikawa K, Okazaki H, Kameda K, Nishida-Fukuda H, Mori H, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y, Tohyama M, Tokumaru S, Katayama I, Hashimoto K.: Nodal Lymphangiogenesis and Metastasis: Role of Tumor-Induced Lymphatic Vessel Activation in Extramammary Paget's Disease. *Am J Pathol.* 2009 175:2235-48
 7. 相原道子, 狩野葉子, 飯島正文, 池澤善郎, 塩原哲夫, 森田栄伸, 木下 茂, 相原雄幸, 白方裕司, 藤山幹子, 北見 周, 渡辺秀晃, 外園千恵, 桃島健治, 小豆澤宏明, 浅田秀夫, 橋本公二 : Stevens-Johnson 症候群および中毒性表皮壊死症 (TEN) の治療指針。—平成 20 年度厚生労働科学研究補助金 (難治性疾患克服研究事業) 重症多形滲出性紅斑に関する調査研究班による治療指針 2009 の解説一。日本皮膚科学会雑誌; 119: 2157-2163, 2009.
 8. 藤山幹子, 橋本公二 : 薬剤性過敏症候群と HHV-6 の再活性化について。ウイルス; 59: 23-30, 2009.
 9. 石川真奈美, 白方裕司, 村上信司, 藤山幹子, 谷本圭子, 浦部由佳里, 佐藤直樹, 宮脇さおり, 岡崎秀規, 平川聡史, 徳丸晶, 花川靖, 佐山浩二, 橋本公二 : 大量ガンマグロブリン静注療法が奏功した難治性尋常性天疱瘡の 1 例。西日本皮膚科 71:561-65, 2009
 10. 岡崎秀規, 藤山幹子, 村上信司, 石川真奈美, 佐藤直樹, 宮脇さおり, 白石 研, 橋本公二 : 薬剤性過敏症候群 (DIHS) の特徴的な顔面の所見と HHV-6 再活性化との時間的關係。日本皮膚科学会雑誌 119:2187-93, 2009
- 学会発表
1. Sayama K, Shirakata Y, Ishimatsu-Tsuji Y, Kajiya K, Hirakawa S, Sugawara K, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, and Hashimoto K.: Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle cycling. The 69th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Montreal, Canada, 5/6-9, 2009.
 2. Shirakata Y, Yang L, Sayama K, and Hashimoto K.: Simple method of constructing living skin equivalent using human amnion as dermal matrix. The 39th Annual Meeting of European Society for

Dermatological Research,
Budapest, Hungary, 9/10-12, 2009.

3. Shirakata Y and Hashimoto K.:
Development of a new skin
equivalent using de-epithelialized
amnion membrane. The 4th Joint
Meeting of Japanese
Dermatological Association and
Australasian College of
Dermatologists, Sapporo, 7/10-12,
2009.

4. Hirakawa S, and Hashimoto K.:

Lymph node lymphangiogenesis-a
new concept in cancer metastasis.
Symposium in 7th World Congress
on Melanoma and 5th Congress of
the European Association of
Dermato-Oncology (EADO),
Vienna, Austria, 5/12-16, 2009.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予
定を含む）

特許取得：なし

実用新案登録：なし

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

薬剤性過敏症症候群回復後に生じる自己免疫現象の解析

研究分担者 塩原哲夫
杏林大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 薬剤性過敏症症候群(DIHS)、Stevens-Johnson 症候群/中毒性表皮壊死症の発症初期と回復期における自己抗体を検索し、DIHS において回復期に高率に自己抗体の検出が認められた。この所見は、DIHS において特異的に検出されるヘルペスウイルスの再活性化や薬疹回復後にもたらされる制御性 T 細胞の機能的傷害に深く関与している可能性が推測された。

A. 研究目的

近年、薬剤性過敏症症候群(DIHS)が治癒した後、数ヶ月～数年を経て、劇症1型糖尿病、強皮症様皮膚病変、自己免疫性甲状腺疾患、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患が発症することが報告されている。このような自己免疫疾患の発現がDIHSの回復後に特異的に出現するのか、あるいは他のStevens-Johnson症候群(SJS)、中毒性表皮壊死症(TEN)などの重症薬疹の回復後にも認められる所見なのかについては未だ解明されていない。このため、本年度の研究ではDIHS、SJS/TENの発症初期と回復後の血清を用いて様々な自己抗体を測定し、比較検討を行った。

B. 研究方法

対象は2002年～2009年間に杏林大学医学部皮膚科に入院したDIHS症例（男性6例：女性7例、平均年齢56.3歳）とSJS/TEN症例（男性2例：女性8例、平均年齢：52.7歳）でそれぞれ

の診断基準を満たした症例である。検体の採取に関しては対象者より入院時に許可を得てから採取した。それぞれの疾患の発症から2週間以内の血清（発症初期）と回復後の血清（発症から平均400日後）を用いて、抗核抗体(ANA)、抗サイログロブリン抗体(TgAb)、抗ペルオキイダーゼ抗体(TPOAb)を通常の方法で測定した。DIHS症例では治療との関連からも検討を加え、一部の症例においてはこれらの抗体の変動を経時的測定した。

C. 研究結果

DIHS において発症時に ANA 陽性率は 25.0%であったが、回復期には 46.1%に上昇していた。また、DIHS 症例の発症時には TgAb と TPOAb はともに全例において検出されなかったが、回復期にはそれぞれ 61.5%、46.1%と高率に検出された。DIHS 症例ではいずれの自己抗体においても検出率は発症時に比べて回復期において高かった。また、自己抗体検出例と DIHS の治療との関