

- exercise-induced anaphylaxis-
Allergol Int 2009 ; 58: 493-8
2. Tujino Y, Mizumoto K, Matsuzaka Y, Niihara H, Morita E.
Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel nodes in extramammary Paget's disease and squamous cell carcinoma. J Dermatol 2009; 36: 90-4.
 3. Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Matsuda T, Kouno K, Morita E, Fujisawa T.
Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. Allergol Int 2009; 58: 193-9.
 4. Mizumoto K, Morita E.
Evaluation of the physiological and operative severity score for the enumeration of mortality and morbidity (POSSUM) scoring system in elderly patients with pressure sores undergoing fasciocutaneous flap-reconstruction. J Dermatol 2009; 36: 30-4.
 5. Matsuo H, Kaneko S, Tsujino Y, Honda S, Kohno K, Takahashi H, Mihara S, Hide M, Aburatani K, Honjoh T, Morita E. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on serum allergen levels after wheat ingestion. J Dermatol Sci 2009; 53: 241-3.

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

表1 DIHS患者と対照患者のHLA血清
タイピング

	患者 (9名)	対照 (32名)	P値 [*]	一般頻度 ^{**}
A1	0	2	1.000	0.06
A2	5	16	1.000	0.293
A11	3	3	0.107	0.091
A24	3	17	0.454	0.231
A26	1	7	0.658	0.056
A30	0	1	1.000	0.026
A31	5	5	0.025	0.072
A33	0	4	0.559	0.088
B7	1	4	1.000	0.057
B13	0	2	1.000	0.047
B27	0	1	1.000	0.036
B35	0	7	0.314	0.075
B37	0	1	1.000	
B39	0	1	1.000	0.014
B44	0	1	1.000	0.075
B46	1	3	1.000	0.039
B48	0	2	1.000	0.037
B51	3	5	0.341	0.101
B52	2	7	1.000	0.028
B54	0	5	0.568	0.036
B55	1	2	0.534	0.026
B56	0	1	1.000	0.007
B58	0	2	1.000	0.061
B59	0	1	1.000	0.005
B60	1	4	1.000	
B61	3	5	0.341	
B62	2	4	0.596	
B67	1	2	0.534	0.003
B71	0	2	1.000	
B75	2	1	0.115	
DR1	1	5	1.000	

	患者 (9名)	対照 (32名)	P値 [*]	一般頻度 ^{**}
DR4	1	14	0.119	
DR7	0	1	1.000	
DR8	1	6	1.000	
DR9	2	10	0.701	
DR11	1	2	0.534	
DR12	3	3	0.107	
DR13	0	4	0.559	
DR14	2	6	1.000	
DR15	4	11	0.701	
DR16	0	2	1.000	

* Fisher の正確確率検定

** 引用元 NCBI、dbMHC

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/ihwg.cgi>

北東アジアでの頻度を示す

表 2 HLA-B locus の遺伝子タイピング

HLA-B (DNA)	患者 (21名)	患者 (32名)	P値*	一般頻度**
0702	4	1	0.637	0.065
1301	1	1	1.000	0.015
1302	1	0	1.000	0.003
1501	4	3	1.000	0.087
1507	0	1	0.396	0.007
1511	2	2	0.555	0.004
1518	2	0	0.512	0.015
2704	1	0	1.000	0.003
3501	7	1	0.126	0.076
3701	1	0	1.000	0.013
3901	0	1	0.396	0.044
3902	0	1	0.396	0.005
3904	1	0	1.000	0.001
4001	4	2	1.000	0.042
4002	3	5	0.240	0.086
4006	2	0	0.512	0.039
4403	1	0	1.000	0.087
4601	3	1	1.000	0.036
4801	2	4	0.199	0.03
5101	5	6	0.313	0.077
5201	7	4	1.000	0.107
5401	5	2	0.689	0.077
5502	2	3	0.373	0.019
5601	1	1	1.000	0.005
5801	2	0	0.512	0.004
5901	1	1	1.000	0.018
6701	2	1	1.000	0.011

表 3 HLA-B locus の遺伝子タイピング

HLA-B (DNA)	患者 (32名)	患者 (21名)	P値*	一般頻度**
07	4	1	0.637	0.057
13	2	1	1.000	0.047
15	4	5	0.735	0.087
27	1	0	1.000	0.036
35	7	1	0.126	0.075
37	1	0	1.000	0.022
39	1	2	0.555	0.041
40	9	7	0.764	0.145
44	1	0	1.000	0.075
46	3	1	1.000	0.039
48	2	4	0.199	0.037
51	5	6	0.310	0.101
52	7	4	1.000	0.028
54	5	2	0.689	0.036
55	2	3	0.373	0.026
56	1	1	1.000	0.007
58	2	0	0.512	0.061
59	1	1	1.000	0.005
67	2	1	1.000	0.003

* Fisher の正確確率検定

** 引用元

Saito S, et al. Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I I and class II loci in the Japanese population. Tissue Antigens 2000 Dec;56(6):522-9

表 4 HLA-B locus ごとの DLST(対照群)

HLA-B (DNA)	DLST 平均値		P 値*
	保有群(n)	非保有群(n)	
07	90.7(4)	125.9(27)	0.309
13	110.5(2)	123.4(29)	0.527
15	112.8(6)	125.0(25)	0.469
27	141.0(1)	122.0(30)	—
35	130.0(6)	120.8 (25)	0.653
37	183.0(1)	120.6(30)	—
39	112.0(1)	125.0(30)	—
40	130.6(9)	119.4(22)	0.390
44	140.0(1)	122.0(30)	—
46	133.0(3)	120.5(28)	0.240
48	132.0(2)	122.0(29)	0.643
51	126.2(5)	121.9(26)	0.864
52	131.0(7)	120.2(24)	0.292
54	118.5(4)	123.2(27)	0.747
55	110.5(2)	123.4(29)	0.371
56	122.0(1)	122.6(30)	—
58	102.7(2)	124.0(29)	0.522
59	162.0(1)	121.3(30)	—
67	152.0(2)	120.6(29)	0.240

*t 検定

表 5 HLA-B locus ごとの DLST(患者群)

HLA-B (DNA)	DLST 平均値		P 値*
	保有群 (n)	非保有群 (n)	
07	642.0 (1)	365.4 (17)	—
13	269.0 (1)	387.3 (17)	—
15	254.7 (3)	405.9 (15)	0.259
35	339.0 (1)	383.2 (17)	—
39	414.5 (2)	376.5 (16)	0.861
40	311.7 (7)	424.6 (11)	0.379
46	293.0 (1)	385.9 (17)	—
48	321.8 (4)	397.6 (14)	0.533
51	553.4 (5)	314.3 (13)	0.130
52	726.0 (2)	360.4 (16)	1.000
54	144.5 (2)	410.3 (16)	0.011
55	185.5 (2)	405.1 (16)	0.141
56	247.0 (1)	388.6 (17)	—
59	191.0 (1)	391.9 (17)	—
67	1336.0 (1)	324.5 (17)	—

*t 検定

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

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-

研究分担者 浅田秀夫
奈良県立医科大学皮膚科学 教授

研究要旨 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。

共同研究者
森戸 啓統
奈良県立医科大学皮膚科学

A. 研究目的

われわれはこれまでに、造血幹細胞移植後 GVHD の発症には、DIHS と同様に HHV-6 再活性化が密接にかかわっていること、さらに IL-10 産生 T 細胞の活性化を伴っていることを見いだした。そこで、本年度は regulatory T 細胞 (Treg) を中心とした免疫調節系が、GVHD や DIHS の病態形成に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。

B. 研究方法

造血幹細胞移植後に GVHD を発症し

た 6 例、DIHS 6 例、紅斑丘疹型 9 例、TEN/SJS 5 例を対象とし、生検にて採取した皮膚検体を用いて免疫染色により浸潤細胞を検討した。免疫染色には、FoxP3、CD3、CD4、CD8 に対するモノクローナル抗体を用い、各浸潤細胞の割合と皮疹出現後の日数との関係を検討した。

(倫理面への配慮)

奈良県立医科大学の倫理委員会の承認を得た上で、患者からインフォームドコンセントを得て施行している。

C. 研究結果

HHV-6 の再活性化が共通してみられる DIHS と GVHD とを比較すると、浸潤リンパ球当たりの Treg の割合が、DIHS では 2 週間以上持続的に高値を示した

のに対し(12.1±5.9%)、GVHDでは持続的に低値を示した(2.1±1.7%)。また、最重症のTEN/SJSでは、一過性の増加の後(17.5%)、数日で急激に減少した(3.4%)。一方、CD8⁺T細胞の浸潤動態については、臨床型との間に明らかな相関はみられなかった。

D. 考察

DIHSの病態形成にはHHV-6の再活性化が重要な役割を担っているものと考えられているが、再活性化機序やHHV-6の病態へのかかわりについては、今なお不明な点が多い。一方GVHDの発症においても、DIHSと同様にHHV-6再活性化が密接にかかわっていることが、明らかになってきている。さらにDIHSとGVHDではともに、末梢血中にTregが、増加していることも示唆されており、両者の間で病態の類似性が指摘されている。しかし、今回の研究結果から、皮疹部浸潤リンパ球におけるTreg割合は、DIHSでは長期間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。DIHSとGVHDにおけるTregの皮膚への浸潤動態の違いが臨床症状の違いを反映している可能性が示唆された。

E. 結論

GVHDならびに、DIHS、SJS/TEN、紅斑丘疹型薬において、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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

欧文原著

1. Yokoi S, Niizeki H, Iida H, Asada H, Miyagawa S: Adjuvant effect of lipopolysaccharide on the induction of contact hypersensitivity to haptens in mice. *J Dermatol Sci* 53: 120-128, 2009
2. Miyagawa-Hayashino A, Matsumura Y, Kawakami F, Asada H, Tanioka M, Yoshizawa A, Mikami Y, Kotani H, Nakashima Y, Miyachi Y, Manabe T: High ratio of IgG4-positive plasma cell infiltration in cutaneous plasmacytosis--is this a cutaneous manifestation of IgG4-related disease? *Hum Pathol* 40(9): 1269-1277, 2009

邦文総説

1. 浅田秀夫: GVHDにおけるHHV-6再活性化(最近のトピックス2009). *臨床皮膚科* 63, 47-52, 2009
 2. 浅田秀夫: 伝染性単核症における薬疹. *Topics in Atopy* 8, 46-47, 2009
 3. 浅田秀夫: EBウイルス感染症—虫刺症からリンパ腫まで. *からだの科学* No. 262, 46-47, 2009
 4. 浅田秀夫: GVHDとHHV-6. *J Environ Dermatol Cutaneous Allergol* 3, 399-405, 2009
- #### 2. 学会発表
1. Hirano A, Shiroyama Y, Morito H, Nakano S, Kitamura K, Fukumoto T, Asada H: A case of EBV-positive T cell lymphoma, developed from severe hypersensitivity to mosquito bites, cured by cord

- blood stem cell transplantation.
The 4th Joint Meeting of JDA and
ACD (Sapporo) 2009.07.10-12
2. Morito H, Kitamura K, Fukumoto T,
Kobayashi N, Asada H: A
pathological study on
infiltrating T cells in skin
lesions of drug eruption and
GVHD-The role of regulatory T
cells. 第34回日本研究皮膚科学
会(福岡) 2009.12.4-6
 3. 森戸啓統、小川浩平、福本隆也、
小林信彦、浅田秀夫:メキシチー
ルによるDrug-induced
hypersensitibility
syndrome (DIHS) の一例. 第39回
日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎
学会(京都) 2008.11.5-8

H. 知的財産権の出願・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

小児における中毒性表皮壊死症/Stevens-Johnson 症候群の疫学調査

研究分担者 相原雄幸
神奈川県保健福祉事務所 保健福祉部長

研究要旨 中毒性表皮壊死症 (Toxic epidermal necrolysis, TEN)、Stevens-Johnson 症候群 (Stevens-Johnson syndrome, SJS) などの重症薬疹は小児の報告例が多くはない。そこで、小児におわが国における疫学調査を実施し、その発症頻度を明らかにした。

共同研究者

相原道子 横浜市立大学皮膚科
伊藤玲子 横浜市立大学附属市民総合医療
センター小児総合医療センター

その詳細な情報を収集する。二次調査にあたっては、この橋本班で既に行っている成人症例の調査内容に一部修正を加えた内容について調査を実施する。

（倫理面への配慮）

主任研究者である愛媛大学の倫理委員会ならびに横浜市立大学市民総合医療センターの倫理委員会での承認を得たうえで、アンケート調査を実施する。

A. 研究目的

中毒性表皮壊死症 (TEN)、Stevens-Johnson 症候群 (SJS) は重症薬疹であるが、わが国における小児における調査は実施されておらず、その実態は明らかではない。そこで、小児症例について疫学調査を実施する。

C. 研究結果

1. 小児の TEN/SJS の全国調査を H21 年 2 月から 7 月にかけて実施した。一次調査で回答のなかった大学病院を中心に全国 62 施設に再度アンケート用紙を H21 年 3 月に郵送した。一次調査で、症例があったと回答をいただいた施設に対して H21 年 4 月から二次調査 (個別調査票) を実施した。さらに、必要に応じてメールなどにより確認した。

B. 研究方法

日本小児科学会の認定施設 (学会認定医が 3 名以上常勤する入院施設) 516 カ所を対象に SJS/TEN 症例 (15 歳以下で入院加療例) について郵送によるアンケート調査を実施する。アンケートは 2 段階にし、一次調査では 2006 年 1 月 1 日から 2008 年 12 月 31 日までの調査期間中に入院加療をおこなった上記疾患症例の有無と男女別人数のみを調査する。二次調査では一次調査で回答のあった個別の症例について

一次調査では再調査を含め 359 施設 (359/516 69.6%) から回答が得られ、そのうち、50 施設 (50/359 13.9%) に症例の報告 (TEN 14 例 (M/F=8/6)、

SJS 36 例 (M/F=22/14)) があつた。

川村孝編著「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル第2版」2006年の患者数算定法「(推計患者数=報告患者数/(回収機関数/対象機関数)」を参考に SJS/TEN の 2008 年の患者数を推計した。その結果、推計患者数=21/(359/516)=30.2 人/年となり、約 1,800 万人 (15 歳以下の人口) から 1.67 人/100 万人/年 となった。成人の調査結果 (3.7 人/100 万人/年) と比較して半分以下の患者数であつた。

二次調査結果で回答のあつた症例は TEN13 症例 (M/F=8/5)、年齢 6.2±4.1 歳 (平均±SD) (1~15 歳)、入院期間は 75.9±104.1 日 (10~395 日)、原因は薬剤 8 例 (61.5%) (抗癌薬 1、抗菌薬 2、抗真菌薬 1、消炎鎮痛薬 3、抗癌薬 1)、*Mycoplasma* 1 例、麻疹予防接種 1 例、不明 3 例。検査実施は DLST7 例、PT2 例、皮膚生検の実施 7 例。治療はステロイド薬 11/13 (84.6%)、ステロイドパルス 7/13 (53.8%)、 γ -glob 7/13 (53.8%)、血漿交換 1/13 (7.7%) であつた。予後は死亡 2 例 (脳腫瘍、カリニ肺炎)。

後遺症は 2 例 (爪変形、睫毛脱落、終末回腸炎)。一方、SJS は 22 症例 (M/F=17/5)、年齢 7.6±3.6 歳 (1~14 歳) 入院期間は 18.4±8.2 日、(7~38 日)、原因は薬剤 16 例 (72.7%) (抗癌薬 4、抗菌薬 8、抗ウイルス薬 1、消炎鎮痛薬 3)、*Mycoplasma* 1 例、インフルエンザ 1 例、EBV1 例、不明 3 例。検査実施は DLST12 例、PT3 例。皮膚生検は実施 7 例。治療はステロイド薬 18/22 (81.8%)、ステロイドパルス 5/22 (22.7%)、 γ -glob 4/22 (18.2%)、(血漿交換 1/22 (4.5%))。予後は全例治癒、ただし 1 例劇症肝炎 (生体肝移

植)。後遺症は全例なし。

D. 考察

今回我々は初めて全国規模の小児 TEN/SJS の疫学調査を実施した。推定患者数は成人に比較して半分以下と少なかった。薬剤が原因のものは多くはなく、TEN による死亡は原疾患によるものもあり、TEN の死亡率は予想に反して低かつた。また、SJS の予後は悪くはなかつた。今後、小児例と成人例について比較検討を実施し、小児例の特徴を明らかにする必要がある。

E. 結論

小児 TEN/SJS 調査から発病率が明らかにされた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

学会発表

1. 相原雄幸: 小児の重症薬物アレルギーの診断と治療 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム 6 薬物アレルギーの診断と治療の進歩 H21.6.
2. 大山宣孝、蒲原 毅、横田俊平、相原雄幸: 血漿交換療法が奏効した中毒性表皮壊死症 (TEN) の 1 幼児例 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会 H21.6
3. 松倉節子、相原道子、池澤優子、相原雄幸ほか: 重症薬疹 (SJS, TEN) におけるサイトカインの経時的変化-血漿交換およびステロイドパルス療法の効果の検討 第 59 回日本アレルギー学会 H21.10

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

DIHS 発症における形質細胞様樹状細胞の意義の検討

研究分担者 梶島健治

京都大学大学院医学研究科 皮膚科学 准教授

研究要旨 DIHS (drug-induced hypersensitivity syndrome) 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、その役割の解明と DIHS 発症機序を明らかにすることを本研究の目的とする。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。

研究協力者

杉田和成 産業医科大学皮膚科助教
渡辺秀晃 昭和大学皮膚科講師
藤山幹子 愛媛大学皮膚科助教

は、血中など体内に広く分布する。この pDC はウイルス感染に伴う CpG の刺激により細胞増殖を誘導するが、それ以外の状況下では replacement が容易に行われぬのが特徴の一つである。そこで、DIHS における初発皮疹部に pDC が集積することにより血中の pDC が減少し、そのために抗ウイルス活性が低下し、ウイルス再活性化が誘発される、という新しい仮説を提唱し (図 1)、そのメカニズムに迫ることを本研究の目的とする。

A. 研究目的

DIHS における HHV-6 などのウイルスの再活性化が起こる機序の詳細は以前不明である。一方、インターフェロン (IFN)- α などの I 型インターフェロンを大量に産生することにより強力な抗ウイルス活性や B 細胞活性化能を有する形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell: pDC)

B. 研究方法

DIHS 患者 (6 症例)、紅斑丘疹型薬

疹 (5 症例)、健常人 (10 症例) について末梢血を採取し単核球分画を分離後、フローサイトメーターにより pDC 分画の細胞比率を検証した。また、皮疹部の免疫染色により CD123+ CD16-pDC の皮膚への集積を検討した。

(倫理面への配慮)

末梢血のサブセット解析は、インフォームドコンセントを得たうえで、一般検査検体の残りをご提供頂いた。

C. 研究結果

1. DIHS の患者においては、健常人に比べ、著明な pDC の低下が認められた (図 2)。また、症状が回復に伴い、pDC の数も回復した。同様の傾向が他の症例でも認められた (data not shown)。

2. 紅斑丘疹型の薬疹の患者では健常人に比べ pDC 数は低い傾向にあるものの、DIHS の患者と比較すると有意に高値であった (data not shown)。

3. DIHS 患者の皮膚病変部において、CD123 陽性 CD16 陰性 pDC の浸潤が認められた。一方、健常者の皮膚では同様の所見は認められなかった (data not shown)。

D. 考察

DIHS における第一峰目の皮疹出現後に血中 pDC 数が減弱する傾向があり、第二峰目前後に低値を示した。寛解後には pDC 値は正常まで回復した。このような pDC の低値は他の薬疹では現在のところ認められていない。しかも、DIHS の皮疹部において pDC の著明な集積を認めたことより、血中の pDC が皮膚へ移行し、血中の pDC 数が減弱した可能性がある。今後さらに症例数を増やすこと、血中の IFN- α の発現を検討

すること、薬剤への pDC への影響を検討することにより、DIHS におけるウイルスの再活性化と pDC との関連を明らかにすることが肝要と思われる。

今後更なる検討により、DIHS におけるウイルス再活性化の機序を解明し、IFN- α の早期投与などを介して再活性化を防ぐことができれば患者にとって大きなメリットとなることが期待される。また、血中の IgG 値の低下や制御性 T 細胞の増加も DIHS の二峰目出現に関与していることが近年示唆されている。本件における pDC との関連も今後検討すべきと考えられる。

E. 結論

DIHS 患者において、健常人や他の薬疹患者に比べ、血中 pDC 数が低下していることを示唆する結果が得られた。また、DIHS の皮疹部に pDC の著明な浸潤像が見られた。同様の所見は健常者や他の薬疹では現在のところ認められていない。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

1. Tomura M, Honda T, (他 10 名), Kabashima K*. Activated regulatory T cells are major T cell type emigrating from sensitized skin. J Clin Invest (in press)
2. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Ogasawara K, Malissen B, Miyachi Y, Kabashima K*. 2009. Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. J

Allergy Clin Immunol (in press)

3. Moniaga CS, Egawa G (他 12 名), Kabashima K* Flaky tail mouse as a possible model of atopic dermatitis. Am J Pathol (in press)
4. Kabashima K*, Sakabe JI, Yoshiki R, Tabata Y, Kohno K, Tokura Y. 2009. Involvement of Wnt signaling in dermal fibroblasts. Am J Pathol (in press)
5. Sugita, K., Kabashima, K., Nakamura, M., and Tokura, Y. 2009. Drug-induced Papuloerythroderma: Analysis of T-cell Populations and a Literature Review. Acta Derm Venereol 89:618-622.
6. Sugita, K., Nishio, D., Kabashima, K., and Tokura, Y. 2008. Acute generalized exanthematous pustulosis caused by sennoside in a patient with multiple myeloma. J Eur Acad Dermatol Venereol 22:517-519.

2) 総説論文

1. Kambe N, Longley BJ, Miyachi Y,

Kabashima K. KIT masters mast cells in Kids, too. *J Invest Dermatol* (in press)

2. 学会発表

1. What's new in immunology of metal allergy K Kabashima (17th International Contact Dermatitis Symposium 2009)
2. K Kabashima (symposist). Actin cytoskeleton formation through mDial is essential for DC-T cell interaction and T cell motility in the lymph nodes. The 39th annual meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec 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

図 1 : DIHS における HHV-6 再活性化機序における新規仮説

DIHS発症におけるpDCの関与に関する仮説

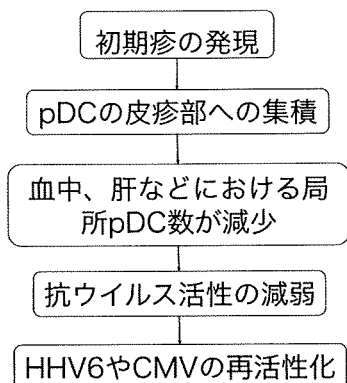
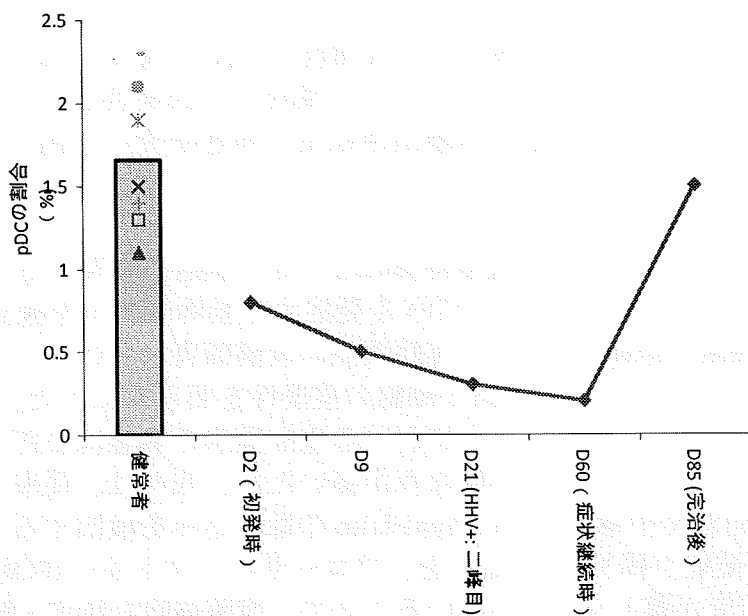


図 2 : DIHS における血中 pDC の割合の変化

DIHS 患者と健常人 (10 例) の末梢血単核球分画における pDC の頻度をフローサイトメーターにて測定した。DIHS 症例では、DIHS における初発疹後の経時的変化を示した。



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

フローサイトメトリーによるDLSTの検討

研究分担者 小豆澤 宏明

大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学専攻情報統合医学皮膚学 助教

研究要旨 Stevens-Johnson 症候群(SJS)や中毒性表皮壊死症と
いった重症薬疹では遅延型過敏反応が病態形成に重要であり、
薬剤によるリンパ球幼若化試験(DLST)がしばしば陽性となるこ
とが知られている。これらの重症薬疹の病態に T 細胞免疫が重
要であることが明らかとなってきたが、DLST で検出できる
免疫反応に T 細胞がどのような役割を果たしているのかについ
ては不明な点が多い。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
できることがわかった。

共同研究者

花房崇明 大阪大学大学院医学系研
究科 皮膚科 大学院生

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群(SJS)や中毒
性表皮壊死症(TEN)では発症が稀で
あるため、臨床での病態研究が難しく、
確実な治療法は確立されていない。
遅延型過敏反応が関与する薬疹では、
T細胞により表皮障害が引き起こされ
ると考えられているが、その活性化の
機序はわかっていない。我々は表皮に
モデル自己抗原を発現するマウスに

抗原特異的な CD8⁺T 細胞を移入するこ
とでTENを発症する動物モデルを確立
し、重症薬疹の皮膚障害における
CD8⁺T 細胞の重要性を明らかにした。
ヒトにおける重症薬疹の病態はまだ
不明な点が多いため、我々は、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。

B. 研究方法

薬疹と診断した症例の急性期の末
梢血単核球(PBMC)を用いて、従来の

DLSTを行うと同時に5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE)でPBMCを蛍光標識し、原因薬剤とともに培養した。培養後、従来のDLSTで³H-thymidineを添加するのと同じタイミングでday6に5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU)を添加し、day7に抗BrdU抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体で蛍光染色することで増殖細胞をFCMで解析した。従来のDLSTではStimulation index(SI)を検討した(図1)。

(倫理面への配慮)

中毒疹が疑われた患者を対象にこの臨床研究への参加について説明と同意を得た上で採血を行った。「中毒疹における原因疾患の早期鑑別診断法の開発」という研究課題名で大阪大学医学部附属病院 臨床研究倫理審査委員会より平成20年8月25日より平成22年7月31日までの許可(承認番号 08088)を受けた所定の説明書と同意書を用いていた。

C. 研究結果

1. 平成20年8月から平成21年12月に大阪大学附属病院皮膚科で薬疹が疑われた症例で、臨床研究への参加に同意した症例92例について、従来のDLSTを施行し、36.9%の症例で被疑薬であったいずれかの薬剤に対して陽性であった。

2. 従来のDLSTが陽性の症例において同時に行ったFCMによるDLSTで、CFSEが減弱した分裂細胞を検出でき、³H-thymidineの取り込みとある程度相関した。逆に、DLST陰性例においてはCFSEの減弱は薬剤を添加していないControlと差がなかった(図2)。

3. DLST陽性症例ではCFSEの減弱がみられた分裂細胞の中にBrdUを取り込んだ細胞が見られ、従来のDLSTで³H-thymidineの取り込みとして検出している細胞を特定し得た。

4. CFSE^{low} BrdU^{high}の分裂細胞はCD4あるいはCD8陽性のT細胞のみで従来のDLSTがT細胞の分裂を検出していることが明らかとなった。

5. CFSE^{low} BrdU^{high}の分裂細胞は多くの症例でCD4⁺T細胞が優位に分裂していたが、SJSの症例ではCD8⁺T細胞が優位に分裂していた(図3)。

D. 考察

近年の研究から、とくに重症薬疹においてCD8⁺T細胞が組織障害に関わること、またCD4⁺T細胞のうちでもCD25⁺のregulatory T cell (Treg)の機能低下が重症薬疹でみられることなどが明らかとなり、薬疹におけるT細胞免疫の重要性が注目されている。DLSTはパッチテストなどと比べ、急性期にも検査が可能で、採血のみのため侵襲性が少ない利点がある一方で、偽陽性も少なからずみられる上に、検査に7日間という期間を要することから、必ずしも有用とは言えない。従来のDLSTでは、細胞の増殖反応を、細胞分画別ではなく、増殖細胞を総和でとらえていたが、我々が樹立したCFSEとBrdUを同時に用いるFCMによるDLSTの解析では、細胞分画別の増殖を詳細に解析できることがわかった。実際にはCFSEは培養7日間の分裂の累積であり、³H-thymidineの取り込みは培養6-7日の24時間のS期に入った細胞をとらえることから、CFSEの減弱と³H-thymidineを取り込みは厳密には一致しない。そこでBrdUを組み合わせることで分裂細胞の中でも従来のDLST

でとらえている分裂細胞を厳密に特定することができ、その相関を見ることができた。

DLSTにおける薬剤反応性はCD4あるいはCD8陽性のT細胞であり、SJSのような重症薬疹でCD8⁺T細胞が優位に分裂する症例があるなど、有益な情報が得られており、今後、種々の分子を染色することで、さらに詳細な解析が可能となる。

E. 結論

薬疹がおこるメカニズムとしてT細胞の関与が臨床研究から明らかとなっているが、薬剤によってT細胞が活性化し、皮膚障害性を獲得する機序は未だ明らかではない。今回、樹立したFCMを用いたDLSTを活用することで、薬疹の病態を詳細に解析するのみならず、より信頼性が高く、迅速な検査法の開発へ発展させたいと考えている。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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費補助金(難治性疾患克服研究事業)多形滲出性紅斑に関する調査研究—多形滲出性紅斑による治療指針2009の解説—日本皮膚科学会雑誌第119巻第11号2157-2163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, 梶島健二, 小豆澤宏明, 浅田英夫, 橋本公二

2. Recurrent contact cheilitis because of glyceryl isostearate, diisostearyl maleate, oleyl alcohol, and Lithol Rubine BCA in lipsticks. Inui S, Azukizawa H, Katayama I. Contact Dermatitis. 2009 Apr;60(4):231-2
3. CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. Henri S, Poulin LF, Tamoutounour S, Ardouin L, Guilliams M, de Bovis B, Devilard E, Viret C, Azukizawa H, Kissenpfennig A, Malissen B. J Exp Med. 2009 Dec 28.

2. 学会発表

1. フローサイトメトリーを用いたDLSTの検討 花房崇明、小豆澤宏明、片山一朗 第412会日本皮膚科学会大阪地方会
2. フローサイトメトリーを用いたDLSTの検討 花房崇明、小豆澤宏明、片山一朗 第39回日本皮膚アレルギー学会・接触皮膚炎学会総会 京都
3. Ectopic expression of keratin 5 in lymphoid cell Azukizawa H, Hanafusa T, Katayama I 日本免疫学会総会 大阪
4. Ectopic expression of keratin 5 in lymphoid cell Hanafusa T, Azukizawa H, Katayama I 日本研究皮膚科学会総会 博多

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

I. 引用論文

1. Azukizawa H, Kosaka H, Sano S, Heath WR, Takahashi I, Gao XH, Sumikawa Y, Okabe M, Yoshikawa K, Itami S. Induction of T-cell-mediated skin disease specific for antigen transgenically expressed in keratinocytes. *Eur J Immunol.* 2003 Jul;33(7):1879-88.
2. Azukizawa H, Sano S, Kosaka H, Sumikawa Y, Itami S. Prevention of toxic epidermal necrolysis by regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2005 Jun;35(6):1722-30.

図 1

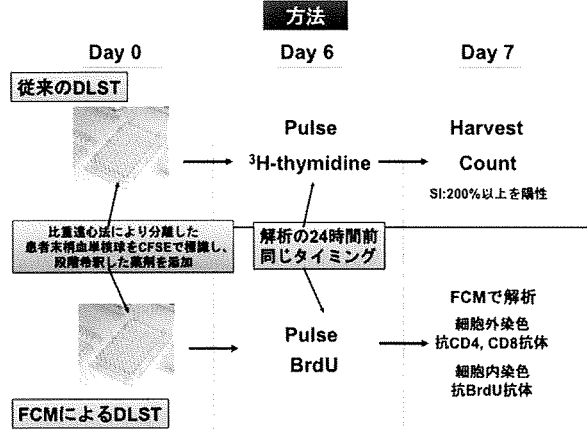


図 2

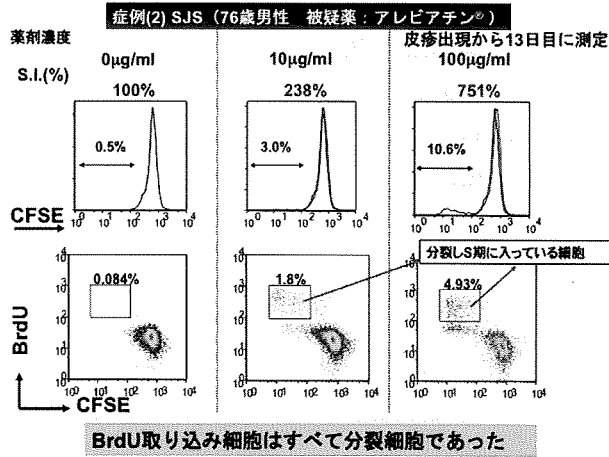
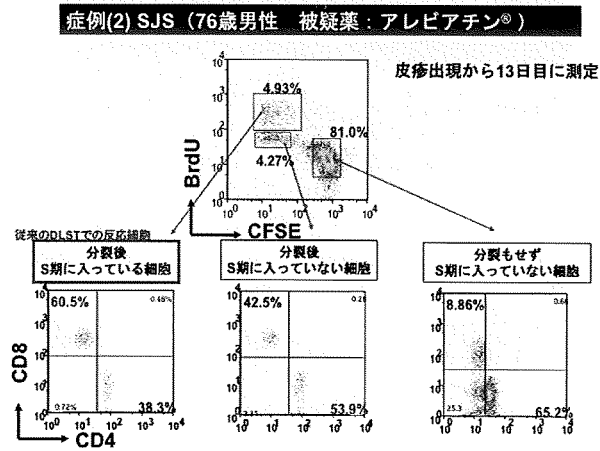


図 3



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

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

研究分担者 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

研究要旨 我々は、TENやSJSなど、広範囲皮膚壊死、潰瘍を伴う重症薬疹における皮膚再生機序に骨髄由来幹細胞が寄与している可能性を見出している。本年度の研究では、特に表皮細胞再生に寄与する骨髄内細胞集団の探索を進めるとともに、その末梢動員メカニズム解析を進めたので報告する。

共同研究者

金田安史 大阪大学 遺伝子治療学

山崎尊彦 大阪大学 遺伝子治療学

A. 研究目的

重症薬疹は全身皮膚の著明な水疱、潰瘍、壊死を伴い、時に致死に至ることもある。広範囲壊死をとまなう皮膚の再生メカニズムについては不明な点も多い。これまで我々は、骨髄内に皮膚構成細胞を供給し得る細胞集団が存在し、壊死表皮の再生に寄与し得ることを明らかにしてきた。しかし、その骨髄内起源は不明なままであり、それ故骨髄由来表皮細胞の性質に関する詳細な情報は無く、骨髄細胞を利用した皮膚再生医療の安全性、妥当性を科学的に評価することは依然困難なままである。

今回我々は、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。

B. 研究方法

既に我々が同定した、骨髄間質多能性細胞動員因子をシリコンチュー

ブに充填し、GFP トランスジェニック骨髄細胞移植マウス皮下に移植、一週間後に取り出してチューブ内に集積した骨髄細胞を培養し、皮膚構成細胞への分化能を検討した。

C. 研究結果

骨髄間質多能性幹細胞動員因子活性により、マウス体内に移植したチューブ内に集積した細胞はほぼすべてがGFP陽性細胞であり、移植骨髄由来であることが示された。これらの細胞は、培養によりケラチン5陽性ケラチノサイトや線維芽細胞、さらに神経細胞への分化能を有することが明らかとなった。

D. 考察

我々は、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。

近年骨髄由来間葉系幹細胞は中胚葉由来と外胚葉由来の2種類の起源があることが報告されている。今回の研究結果は、末梢動員した骨髄由来細胞