

201023048A

厚生労働省科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの作成
および発症機序の解明

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

平成 23 (2011) 年 3 月

主任研究者 阿 部 理一郎

厚生労働省科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの作成
および発症機序の解明

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

平成 23 (2011) 年 3 月

主任研究者 阿部理一郎

目次

I. 総括研究報告

患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの作成および発症機序の解明……1
主任研究者 阿部理一郎（北海道大学）

II. 分担研究報告

1. 患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの皮膚症状の解析および
早期診断のための血清マーカー検索……7
主任研究者 阿部理一郎（北海道大学）

2. 患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの肝症状の解析……11
分担研究者 尾崎倫孝（北海道大学）

3. 患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの眼症状の解析……14
分担研究者 北市信義（北海道大学）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……17

IV. 研究成果の刊行物・別冊……23

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

総括研究報告書

患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの作成および発症機序の解明

主任研究者 阿部理一郎

北海道大学・医学研究科・皮膚科

准教授

研究要旨

本研究の目的は、時に致死性疾患で、重篤な後遺症を残す重症薬疹（中毒性表皮壊死症、Stevens-Johnson 症候群）のモデルマウスを作成・樹立し、さらに重症薬疹の発症機序を解明することである。重症薬疹患者末梢血を、同患者皮膚移植をした免疫不全マウスに静注し、経時的に原因薬剤を経口投与することで、重症薬疹と類似する症状（結膜の浮腫および出血、結膜・角膜上皮のアポトーシス）を惹起することに成功した。

さらに早期診断のための血清マーカーを同定し、迅速診断キットの作成に成功した。

A 研究目的

本研究の目的は、重症薬疹モデルマウスを作成・樹立し、さらに重症薬疹の発症機序を解明することである。

重症薬疹（中毒性表皮壊死症、Stevens-Johnson 症候群）は時に致死性疾患であり、加えて重篤な後遺症を残す。特に TEN はいまだ致死率が 20-30% と高率であり、SJS においては失明または重度の視力障害を残す。また肝障害も高率に合併する。重症薬疹の発症機序についてはいまだ不明なことが多いが、それは適切なモデルマウスがなく、具体的な *in vivo* における研究が行えないためである。よって、重症薬疹モデルの作成は逼迫した必要性がある。

これまでに報告されている重症薬疹モデルマウスは、たとえば表皮細胞に外来タンパクを発現させた遺伝子改変マウスにそのタンパク特異的反応リンパ球を移入するモデルなどがあった。しかし、これらは実際ヒト生体における薬疹発症機序とは多くの点で異なっていた。本研究課題で作成するモデルマウスは、治癒した重症薬疹患者から末梢血単核球を採取し、免疫不全マウス（NOG マウス）に静注し、その後連日薬疹原因薬剤を経口投与することにより重症薬疹を発症させる。このようにヒトにおける薬疹発症機序と極めて同一の反応が惹起されるので、真の意味でのモデルマウスとなる。

重症薬疹のモデルマウスとして適切であるか、皮膚症状、粘膜症状、眼症状および肝障害が類似するかを詳細に検討し、適切なモデルを確立する。さらに、それぞれの症例ごとに静注細胞数、薬剤投与量などを検討し、安定したモデルマウスを作成する。さらにこの重症薬疹モデルマウスを用いて、発症機序におけるリンパ球サブセットやサイトカインの関与について検討し、病態解明を行う。

一方、重症薬疹の臨床的問題点の一つとして、水疱・びらん、または粘膜疹出現以前では、通常の薬疹との鑑別が非常に困難であることが挙げられる。そのため適切な治療開始が遅れ、結果として重篤な後遺症を残し、致死率の上昇につながると考えられる。我々はこれまで、水疱・びらん、または粘膜疹出現前に sFasL は上昇し、その後速やかに低下する (Murata, Abe. J Allergy Clin Immunol 2008., Abe, Am J Pathol 2003) ことを報告してきた。本研究において sFasL 以外の早期診断マーカーも同定し、迅速診断テストを開発する。

研究1年目の昨年度は、重症患者末梢血細胞静注と経口原因薬剤投与した免疫不全マウスにおいて、重症薬疹、特に Stevens-Johnson 症候群(SJS)に非常に類似した症状および組織所見を得ることができ、SJS モデルマウス作成に成功した。また、重症薬疹発症早期に特異的に上昇する granulysin の迅速測定キットの作成にも成功した(Abe. Ann Intern Med 2009., Fujita, Abe, J Am Acad Dermatol in press)。

B 研究方法

1) 重症薬疹モデルマウスの作成

マウスについて：免疫不全マウス (NOG マウス) は T 細胞、B 細胞に加え NK 細胞も欠損し、特にヒト細胞に対して免疫反応を起こしにくい特徴を持つ。重症薬疹患者について：現在当病院には 10 名以上のすでに治癒した重症薬疹患者が定期通院し、その多くは原因薬剤を同定しており、例数を多く検討できる状況である。

研究計画：NOG マウス (週令 6 週) に、すでに治癒している重症薬疹患者の末梢血単核球を尾静脈から静注する ($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個)。静注当日から連日患者それぞれの原因薬剤を経口的にマウスに投与する。投与は 1 週間、2 週間、3 週間、死亡までをそれぞれ行う。投与中以下の項目を経時的に解析する。他覚所見 (皮膚症状、粘膜症状、眼症状、体重)、末梢血 FACS 解析 (血液像、T 細胞サブセットなど)、生化学検査 (肝酵素など)。さらにそれぞれの観察期間終了後、皮膚・眼・肝臓などの組織を採取し、病理組織 (HE 染色)、免疫組織染色 (TUNEL 含む) を行う。

さらに、よりヒト疾患病態に近い重症薬疹モデルマウス作成を行う。免疫不

全マウス (NOG) に、すでに治癒している重症薬疹患者の皮膚を移植し、正着後、同患者の末梢血単核球を同マウスに静注し、さらに連日原因薬剤を経口的にマウスに投与する。臨床所見、末梢血 FACS 解析、皮膚病理組織、免疫組織染色を行う。

2) 重症薬疹早期診断のための血清マーカー検索

研究1年目において、すでに我々は早期診断マーカーとなりうる granulysin を同定した。さらにイムノクロマト法を用いて、granulysin の迅速測定キットの作成に成功した。本年度においては、実際の臨床における有効性を検討するために多施設において、重症薬疹への進展が予想される薬疹患者、または通常の薬疹患者において測定を行う。

C 研究結果

1) 重症薬疹モデルマウスの作成

我々は NOG マウスに健常人末梢血単核球を静注すると約 3 週以降に末梢血中にヒト血球の増加が始まり約 6~7 週間後に GVHD により死亡することを確認した。そのため、GVHD の反応を起こす前の期間 (3 週以前) に解析を行った。

患者末梢血単核球を NOG マウスに静注し、原因薬剤投与群、非投与群とで比較検討した。非投与群および投与群の血中のヒト CD45 陽性細胞の増加は 2 週間まではともに非常にわずかであったが、マウス末梢血細胞を用いた薬剤特異的細胞の活性化検討において、投与群マウスのみ薬剤特異的細胞増殖がみられた。

臨床症状として薬剤投与 10 日目以降眼症状 (結膜下出血、眼瞼炎症) が肉眼的に確認できたが、非投与群ではみられなかった。一方皮膚においては、淡い紅斑は認めたが顕著な皮膚症状はみられなかった。病理組織所見 (HE 染色) では原因薬剤投与群の皮膚には有意な所見はみられなかったが、眼部、特に結膜に著明な浮腫が認められた。しかし投与群の皮膚において、表皮細胞のアポトーシス (TUNEL 陽性) の顕著な増加はみられなかった。加えて肝臓においては、多数のヒト細胞の浸潤に加え、多くの肝細胞のアポトーシスが見られた。重症薬疹において肝機能障害をきたす頻度は高く、ヒト疾患と一致した所見と考えた。

また同モデルマウスの結膜病変部にはヒト由来細胞の浸潤がほとんどみられなかった。一方 GVHR を生じたマウスの結膜には主に CD8 陽性である、多数のヒト細胞の浸潤がみられた。このことから本モデルにおける結膜上皮のアポトーシスは直接的なヒト細胞の interaction ではなく、おそらくは液性因子により惹起されると考えられた。実際、アポトーシス誘導因子の一つである granulysin を新生仔マウスに投与すると、結膜上皮にのみアポトーシスが生じた。

さらにヒト疾患病態に近い重症薬疹モデルマウスの作成を行った。患者皮膚

を NOG マウスに移植し生着後、患者末梢血単核球を静注し、経口的に原因薬剤を投与した。同マウスにおいて、移植部に一部淡褐色が見られた。組織学的にも同部位に表皮細胞のアポトーシスが確認できた。一方健常人の皮膚および末梢血単核球を用いたマウスでは非常にわずかのアポトーシスしかみられなかった。さらに TUNEL および caspase-3 染色でアポトーシスを確認した。加えて植皮部において、ヒト CD4 および CD8 細胞の浸潤を認めたが、浸潤の程度は比較的軽度であった。

以上から本モデルマウスは重症薬疹、特に Stevens-Johnson 症候群に非常に類似した臨床症状を呈すると思われる。

2) 重症薬疹早期診断のための血清マーカー検索

我々はこれまで sFasL 以外に TNF α 、IL-6、IFN γ 、sCD40L などを検討したが、通常薬疹との鑑別でき、かつ早期重症薬疹で上昇するものはなかった。一方、最近アポトーシス誘導蛋白の一つである granulysin は重症薬疹において病変形成に関与することが報告された。我々は重症薬疹患者血清中の granulysin 濃度を測定したところ、水疱・びらん、または粘膜疹出現の 4~2 日前に 80% の患者において有意に上昇し、その後速やかに減少傾向を示した。一方通常薬疹では 94% の患者で正常域であった。以上から sFasL と同様に重症薬疹早期診断に有用であることを見出した (Abe, Ann Intern Med 2009)。加えて granulysin の正常上限は 10ng/ml と sFasL に比べ 100 倍の濃度であり、迅速判定テストの作成が可能と考え検討を開始している。

現在 10 施設において、重症薬疹を疑わせる症例に対して実際の検査を行っているが、症例数がまだ少なく、症例の蓄積中である。

D 考察

患者皮膚を用いた重症薬疹モデルマウスの作成に成功した。今後の問題点、検討課題として、1) 実際のヒト重症薬疹病態との差異を明確にする。マウスを用いているためすべてにおいて免疫反応を含めた病態を模倣することは困難である。今後のモデルマウス活用に際しての利点を明らかにする。2) 同モデルを用いて、重症薬疹特異的現象が生じているか詳細に確認する。通常薬疹患者サンプルを用いた植皮モデルとの比較を行う。さらに本研究で検討している granulysin の発現なども検討する。

さらに本研究課題での結果から、特にマウス結膜は液性因子により誘導されるアポトーシスに対して、ほかの表皮などの細胞に比べ感受性が高いことが予想される。これは一部の SJS 患者では眼症状しか生じないこと、また皮膚にくらべ眼症状が重篤である症例も多いこと、からマウスのみならずヒトにおいても同様のことが予想される。今後結膜上皮と表皮とのアポトーシス感受性の際

について検討を行う。

一方早期診断テストに関してはイムノクロマトグラフィーを用いた granulysin 判定テストをさらに実施施設を増やし臨床検討を行う。

E 結語

本研究2年目において、重症薬疹モデルマウスの作成に成功し、さらに早期診断判定テストの作成にも成功した。今後3年目で早期診断判定テストの多施設における有用性の検討と、モデルマウスを用いた重症薬疹病態解明に取り組む。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

H 知的財産の出願・登録状況

特許：特願 2009-140830 「重症薬疹易罹患性診断用マーカー、重症薬疹易罹患性の診断方法および重症薬疹易罹患性診断用キット」

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

分担研究報告書

患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの皮膚症状の解析
および早期診断のための血清マーカー検索

主任研究者 阿部理一郎

北海道大学・医学研究科・皮膚科

准教授

研究要旨

本研究の目的は、時に致死性疾患で、重篤な後遺症を残す重症薬疹（中毒性表皮壊死症、Stevens-Johnson 症候群）のモデルマウスを作成・樹立し、さらに重症薬疹の発症機序を解明することである。重症薬疹患者末梢血を免疫不全マウスに静注し、経時的に原因薬剤を経口投与することで、重症薬疹と類似する症状（結膜の浮腫および出血、結膜・角膜上皮のアポトーシス）を惹起することに成功した。

さらに早期診断のための血清マーカーを同定し、迅速診断キットの作成に成功した。

A 目的

重症薬疹の発症機序についてはいまだ不明なことが多いが、それは適切なモデルマウスがなく、*in vivo*における研究が行えないためである。よって、重症薬疹モデルの作成を行う。一方、重症薬疹の臨床的問題点の一つとして、発症早期では通常の薬疹との鑑別が非常に困難であることがあり、早期診断マーカー検索を行う。

研究1年目の昨年度は、重症患者末梢血細胞静注と経口原因薬剤投与した免疫不全マウスにおいて、重症薬疹、特に Stevens-Johnson 症候群 (SJS) に非常に類似した症状および組織所見を得ることができ、SJS モデルマウス作成に成功した。また、重症薬疹発症早期に特異的に上昇する *granulysin* の迅速測定キットの作成にも成功した。

B 研究方法

1) よりヒト疾患病態に近い重症薬疹モデルマウス作成：免疫不全マウス (NOG) に、すでに治癒している重症薬疹患者の皮膚を移植し、正着後、同患者の末梢

血単核球を同マウスに静注し、さらに連日原因薬剤を経口的にマウスに投与する。臨床所見、末梢血 FACS 解析、皮膚病理組織、免疫組織染色を行う。

2) 重症薬疹早期診断のための迅速診断キット：前年度に作成した granulysin 測定キットの精度の向上を行う。さらに他施設において実際の臨床での有用性を検討する。

C 研究結果

1) よりヒト疾患病態に近い重症薬疹モデルマウスの作成

患者皮膚を NOG マウスに移植し生着後、患者末梢血単核球を静注し、経口的に原因薬剤を投与した。同マウスにおいて、移植部に一部淡褐色が見られた。組織学的にも同部位に表皮細胞のアポトーシスが確認できた。一方健常人の皮膚および末梢血単核球を用いたマウスでは非常にわずかのアポトーシスしかみられなかった。さらに TUNEL および caspase-3 染色でアポトーシスを確認した。加えて植皮部において、ヒト CD4 および CD8 細胞の浸潤を認めたが、浸潤の程度は比較的軽度であった。

2) 重症薬疹早期診断のための血清マーカー検索

昨年度の検討で、重症薬疹患者血清 granulysin 濃度は、水疱・びらん、または粘膜疹出現の 4~2 日前に 80%の患者において有意に上昇し、その後速やかに減少傾向を示した。一方通常薬疹では 94%の患者で正常域であった。現在 10 施設において、重症薬疹を疑わせる症例に対して実際の検査を行っているが、症例数がまだ少なく、症例の蓄積中である。

D 考察

患者皮膚を用いた重症薬疹モデルマウスの作成に成功した。今後の問題点、検討課題として、1) 実際のヒト重症薬疹病態との差異を明確にする。マウスを用いているためすべてにおいて免疫反応を含めた病態を模倣することは困難である。今後のモデルマウス活用に際しての利点を明らかにする。2) 同モデルを用いて、重症薬疹特異的現象が生じているか詳細に確認する。通常薬疹患者サンプルを用いた植皮モデルとの比較を行う。さらに本研究で検討している granulysin の発現なども検討する。

一方早期診断テストに関してはイムノクロマトグラフィーを用いた granulysin 判定テストをさらに実施施設を増やし臨床検討を行う。

E 結論

今回の研究で、よりヒト疾患に類似した重症薬疹類似の症状を呈するモデルマウス作成に成功した。一方早期診断テストに関してはイムノクロマトグラ

フィーを用いた granulysin 判定テストの試作品作成に成功した。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1. Fujita Y, Yoshioka N, Abe R, Murata J, Hoshina D, Mae H, Shimizu H. Rapid immunochromatographic test for serum granulysin is useful for the prediction of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. J Am Acad Dermatol (in press)
2. Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Sasaki M, Hoshina D, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu T, Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H*. Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. Proc Natl Acad Sci USA 107. 14345-50. 2010.
3. Abe R, Yamagishi SI, Fujita Y, Hoshina D, Sasaki M, Nakamura K, Matsui T, Shimizu T, Bucala R, Shimizu H. Topical application of anti-angiogenic peptides based on pigment epithelium-derived factor can improve psoriasis J Dermatol Sci 57.183-91. 2010.
4. Shinkuma S, Akiyama M, Inoue A, Aoki J, Natsuga K, Nomura T, Arita K, Abe R, Ito K, Nakamura H, Ujiie H, Shibaki A, Suga H, Tsunemi Y, Nishie W, Shimizu H. Prevalent LIPH founder mutations lead to loss of P2Y5 activation ability of PA-PLA1alpha in autosomal recessive hypotrichosis. Hum Mutat 31. 602-10. 2010.
5. Hamasaka A, Yoshioka N, Abe R, Kishino S, Umezawa K, Ozaki M, Todo S, Shimizu H. Topical application of dehydroxymethylepoxyquinomicin improves allergic inflammation via NF-kappaB inhibition. J Allergy Clin Immunol 126:400-3. 2010.
6. Nomura Y, Akiyama M, Nomura T, Nemoto-Hasebe I, Abe R, McLean WH, Shimizu H. Chromosome 11q13.5 variant: No association with atopic eczema in the

Japanese population.

J Dermatol Sci 59:210-2. 2010.

7. Osawa R, Konno S, Akiyama M, Nemoto-Hasebe I, Nomura T, Nomura Y, Abe R, Sandilands A, McLean WH, Hizawa N, Nishimura M, Shimizu H.

Japanese-Specific Filaggrin Gene Mutations in Japanese Patients Suffering from Atopic Eczema and Asthma.

J Invest Dermatol (in press)

8. Iitani MM, Abe R, Yanagi T, Hamasaka A, Tateishi Y, Abe Y, Ito M, Kondo T, Kubota K,

Shimizu H.

Aleukemic leukemia cutis with extensive bone involvement.

J Am Acad Dermatol 63:539-41. 2010.

H 知的財産の出願・登録状況

特許：特願 2009-140830 「重症薬疹易罹患者性診断用マーカー、重症薬疹易罹患者の診断方法および重症薬疹易罹患者性診断用キット」(発明者：阿部理一郎、他)

厚生労働科学研究費補助金

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

分担研究報告書

患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの肝症状の解析

分担研究者 尾崎倫孝

北海道大学・医学研究科・分子制御外科

教授

研究要旨

本研究の目的は、時に致死性疾患で、重篤な後遺症を残す重症薬疹（中毒性表皮壊死症、Stevens-Johnson 症候群）のモデルマウスを作成・樹立し、臨床的にしばしば合併する肝障害を解析した。本モデルマウスにおいても肝障害を伴った。

A 目的

重症薬疹において、しばしば肝機能障害をきたす。しかし重症薬疹において肝障害をきたす機序は不明であるが、一方薬剤性の劇症肝炎も存在するので、薬剤に対する免疫反応により、表皮細胞と同様に肝細胞にもアポトーシスなどが生じている可能性も示唆される。重症薬疹の発症機序についてはいまだ不明なことが多いが、それは適切なモデルマウスがなく、*in vivo*における研究が行えないためである。よって、重症薬疹モデルの作成を行い、発症した肝症状において詳細に検討する。

前年度までの検討で、患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの作成に成功し、さらに肝組織における肝細胞のアポトーシスの解析を行った。

B 研究方法

重症薬疹モデルマウス作成：免疫不全マウス（NOG）に、すでに治癒している重症薬疹患者末梢血単核球を静注し、連日原因薬剤を経口的にマウスに投与する。臨床所見、末梢血 FACS 解析、皮膚病理組織、免疫組織染色を行う。特に肝臓における病理学的検討を詳細に行う。

C 研究成果

我々は NOG マウスに健常人末梢血単核球を静注すると約 3 週以降に末梢血中にヒト血球の増加が始まり約 6~7 週間後に GVHD により死亡することを確認した。そのため、GVHD の反応を起こす前の期間（3 週以前）に解析を行った。

患者末梢血単核球を NOG マウスに静注し、原因薬剤投与群、非投与群とで比較検討した。マウス脾細胞を用いた薬剤特異的細胞の活性化検討において、投与群マウスのみ薬剤特異的細胞増殖がみられたことから、本モデルマウスにおける症状は薬剤特異的反応であると思われた。病理組織所見（HE 染色）では原因薬剤投与群の肝臓に炎症細胞浸潤および肝細胞の壊死（アポトーシス）が認められた。また浸潤細胞の大部分はヒト由来のものであった。一方非投与群でも同様の所見が見られたが薬剤投与群に比べてその程度は比較的軽度であった。また TUNEL にてもアポトーシスした肝細胞が多数認められた。

さらに、我々は皮膚移植の系のマウスモデルの作成も行っており、同モデルの肝病変の検討も行っている。

D 考察

薬剤特異的と思われる肝障害を呈するモデルマウス作成に成功した。

今後は皮膚移植の系のマウスモデルでの肝病変の検討も行う。

さらに薬剤性の劇症肝炎においては、皮膚でなく肝臓の組織特異的に反応が起こっていると予想されるので、治癒後の劇症肝炎患者サンプルを用いた検討も行う。

さらに経時的肝酵素の推移などを検討する。また重症薬疹発症機序におけるリンパ球サブセットやサイトカインの関与について、CD4+または CD8+リンパ球を除去した末梢血単核球を用いた系を検討する。さらに特定のサイトカイン作用を阻害する系なども検討する。

E 結論

本研究において、薬剤特異的と思われる肝障害を呈するモデルマウス作成に成功した。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1. Takahashi T, Matsumoto S, Matsushita M, Kamachi H, Tsuruga Y, Kasai H, Watanabe M, Ozaki M, Furukawa H, Umezawa K, Todo S.
Donor pretreatment with DHMEQ improves islet transplantation.
J Surg Res 163:e23-34. 2010.

2. Tomioka N, Morita K, Kobayashi N, Tada M, Itoh T, Saitoh S, Kondo M, Takahashi N, Kataoka A, Nakanishi K, Takahashi M, Kamiyama T, Ozaki M, Hirano T, Todo S.

Array comparative genomic hybridization analysis revealed four genomic prognostic biomarkers for primary gastric cancers.

Cancer Genet Cytogenet 201:6-14. 2010.

H 知的財産の出願・登録状況

特になし。

厚生労働省科学研究費補助金

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

分担研究報告書

患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの眼症状の解析

分担研究者 北市信義

北海道大学・医学研究科・眼科

客員准教授

研究要旨

重症薬疹において、重篤な後遺症を残すのは眼症状である。重症薬疹モデルの作成を行い、発症した眼症状においても、結膜の著明な浮腫・出血、および結膜・角膜上皮のアポトーシスがみられ、重症薬疹ときわめて類似した眼症状を呈した。

A 目的

重症薬疹において、もっとも重篤な後遺症を残すのは眼症状である。病勢悪化時に角膜潰瘍や結膜のびらん・潰瘍もきたし、その後皮膚症状など改善してもなお慢性の眼症状が続く場合は、高度な視力障害をきたすことが多い。重症薬疹の発症機序についてはいまだ不明なことが多いが、それは適切なモデルマウスがなく、*in vivo* における研究が行えないためである。よって、重症薬疹モデルの作成を行い、発症した眼症状において詳細に検討する。

前年度までの検討で、患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの作成に成功し、さらに眼部における角膜、結膜病変部の解析を行った。モデルマウスにおいて、結膜に出血が認められ、組織学的にも結膜上皮に著明なアポトーシスがみられ、重症薬疹眼症状に非常に類似した所見であった。

B 研究方法

重症薬疹モデルマウス作成：免疫不全マウス (NOG) に、すでに治癒している重症薬疹患者末梢血単核球を静注し、連日原因薬剤を経口的にマウスに投与する。臨床所見、末梢血 FACS 解析、皮膚病理組織、免疫組織染色を行う。特に眼部である角膜や結膜における病理学的検討を詳細に行った。

C 研究成果

我々は NOG マウスに健常人末梢血単核球を静注すると約 3 週以降に末梢血中にヒト血球の増加が始まり約 6~7 週間後に GVHD により死亡することを確認し

た。そのため、GVHDの反応を起こす前の期間（3週以前）に解析を行った。

患者末梢血単核球をNOGマウスに静注し、原因薬剤投与群、非投与群とで比較検討した。マウス末梢血細胞を用いた薬剤特異的細胞の活性化検討において、投与群マウスのみ薬剤特異的細胞増殖がみられたことから、本モデルマウスにおける症状は薬剤特異的反応であると思われた。臨床症状として薬剤投与10日目以降眼症状（結膜下出血、眼瞼炎症）が肉眼的に確認できたが、非投与群ではみられなかった。病理組織所見（HE染色）では原因薬剤投与群の眼部、特に結膜に著明な浮腫とリンパ球浸潤が認められた。一方非投与群ではみられなかった。しかし、予想に反し病変部にヒト細胞（CD45, CD4, CD8陽性細胞など）の浸潤はほとんど見られなかった。そのため、本モデルでの眼症状は液性因子に起因すると予想された。加えて、アポトーシス誘導因子の*in vivo*での効果を検討したところ、granulysinを新生仔マウスに投与すると、ある条件下で結膜にのみアポトーシスが誘導された。

さらに、我々は皮膚移植の系のマウスモデルの作成も行っており、同モデルの眼病変の検討も行っている。

D 考察

重症薬疹類似の眼症状を呈するモデルマウス作成に成功した。

皮膚には無症状で結膜にのみ症状が引き起こされる本モデルにおけるアポトーシス誘導の機序については、granulysinなどのアポトーシス誘導因子が、組織特異的に結膜上皮のアポトーシスを誘導すると考えられる。今後のこの詳細な機序の解明も行う。

E 結論

本研究において、重症薬疹類似の眼症状を呈するモデルマウス作成に成功した。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1. Kaneko H, Suzutani T, Aoki K, Kitaichi N, Ishida S, Ishiko H, Ohashi T, Okamoto S, Nakagawa H, Hinokuma R, Asato Y, Oniki S, Hashimoto T, Iida T, Ohno S.

Epidemiological and virological features of epidemic keratoconjunctivitis due to new human adenovirus type 54 in Japan.

Br J Ophthalmol (in press)

2. Iwata D, Kitamura M, Kitaichi N, Saito Y, Kon S, Namba K, Morimoto J, Ebihara A, Kitamei H,

Yposhida K, Ishida S, Ohno S, Uede T, Onoe K, Iwabuchi K.

Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by blockade of osteopontin with small interfering RNA.

Exp Eye Res. In press.

3. Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, Ito N, Kera J, Okada E, Yatsu K, Song YW, Lee EB, Kitaichi N, Namba K, Horie Y, Takeno M, Sugita S, Mochizuki M, Bahram S, Ishigatsubo Y, Inoko H.

Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci.

Nat Genet 42:703-6 2010.

4. Kitaichi N, Kitamura M, Namba K, Ishida S, Ohno S.

Elevation of surfactant protein D, a pulmonary disease biomarker, in the sera of uveitis patients with sarcoidosis.

Jpn J Ophthalmol 54:81-4. 2010.

H 知的財産の出願・登録状況

なし