

厚生労働科学研究費補助金「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
分担研究報告書

薬疹の臨床型の違いによる血清サイトカインプロファイルの比較検討

分担研究者 相原 道子 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

研究要旨

横浜市立大学附属2病院で経験した薬疹患者の血清サイトカインプロファイルを比較検討した。Stevens-Johnson 症候群 (SJS)、中毒性表皮壊死症 (TEN)、薬剤性過敏症症候群 (DIHS) といった重症薬疹だけでなく播種状紅斑丘疹型 (MP) や多形紅斑型 (EM) においても様々なサイトカインの高値を認めたことから、薬疹の病態にはサイトカインが深く関与していること、および重症薬疹の発症にはサイトカインだけでなく他の因子が必要であることが示された。DIHS では他疾患群と比較して全般的にサイトカインが高値であり、なかでも IL-5、IL-9、IL-13、Eotaxin などの Th2 関連のサイトカイン/ケモカインが上昇しており、好酸球増多を来す臨床像と矛盾しない結果となった。HMGB1 (High Mobility Group Box1) は活性化された樹状細胞、マクロファージあるいは壊死細胞から細胞外に放出されるタンパク質で、近年、血清 HMGB1 が SJS/TEN の早期診断マーカーになり得ることが示唆されている。しかし本研究においては SJS/TEN で有意な上昇を認めたものの DIHS 群においてより高値であり、HMGB1 が DIHS の発症に関与していることなどが示唆された。

研究協力者

藤田浩之 (横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学助教)

松倉節子 (横浜市立大学附属市民総合医療センター講師)

高橋幸利 (国立静岡てんかん・神経医療センター統括診療部長、臨床研究部長、小児科)

A. 研究目的

薬疹には様々なタイプがあり、同一の薬剤であっても引き起こされる薬疹の型や重症度は多様である。播種状紅斑丘疹型 (MP) や多形紅斑型 (EM) は、被疑薬の中止により自然軽快することも少なくない。Stevens-Johnson 症候群 (SJS) および中毒性表皮壊死症 (TEN) は表皮細胞のアポトーシスにより広範なびらん、表皮剥離を生じ、発熱、粘膜疹、多臓器障害を併発する最重症型薬疹である。薬剤性過敏症症候群 (DIHS) は抗けいれん薬

やアロプリノールなど特定の薬剤を長期に内服することにより引き起こされ、薬剤中止後も症状は遷延化し、経過中ヒトヘルペスウイルスの再活性化を伴う重症薬疹である。特に HHV-6 の再活性化が病態形成に関与するとされており、発熱とリンパ節腫脹、白血球異常 (白血球増多、異型リンパ球増加、好酸球増多) を伴い、多くは肝障害を伴う疾患である。症状が遷延し、肝障害などの臓器障害が劇症化する場合には致命的となることもある。欧州では類似の病態が drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) として扱われている。

当科ではこれまで上記の薬疹型による病態の違いを免疫学的側面から検討するために、血清サイトカインプロファイルを比較検討してきたが、さらに新規症例や検討項目を追加してより詳細な検討を行なった。

B. 研究方法

横浜市立大学附属病院および横浜市立大学附属市民総合医療センター皮膚科で経験した薬疹患者の発症時もしくは再増悪時（0：onset）および軽快時（R：recovery）の血清を-80℃で保存して、Bio-Plex サイトカインアッセイキットおよび ELISA キットを用いて血清中サイトカイン/ケモカイン濃度を測定した。対象として健常人の血清も同様に測定した。

各群の内訳は以下のとおりである。健常（HC）群 14 例（男 8：女 6、平均年齢 53.1±15.3 歳）、MP/EM 群 11 例（MP6:EM5、男 6：女 5、平均年齢 65.2±8.9 歳）、SJS/TEN 群 17 例（SJS13：TEN4、男 7：女 10、平均年齢 56.4±19.0 歳）、DIHS/DRESS 群 17 例（典型 13：非典型 4、男 10：女 7、平均年齢 53.5±14.0 歳）。

健常群と各疾患群発症時の比較を Mann-Whitney test、各疾患群の発症時と軽快時の比較を Wilcoxon matched pairs test で行い、 $P<0.05$ を*、 $P<0.01$ を**として表記し、有意差ありとした。

（倫理面への配慮）

検体の採取に関しては、「重症薬疹におけるサイトカインの臨床研究」という研究課題名で当 2 病院において、臨床研究倫理審査委員会、臨床研究倫理委員会より許可を得た（申請番号 07-081）。

C. 研究結果

1) 各疾患群発症時のサイトカインの変動

MP/EM 群の発症時には IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-12、Eotaxin、GM-CSF、IP-10、VEGF が有意に上昇していた。

SJS/TEN 群の発症時には IL-6、IL-12、IP-10、HMGB1 が有意に上昇していた。

DIHS/DRESS 群の発症時には IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、Eotaxin、GM-CSF、IFN- γ 、IP-10、VEGF、HMGB1 が有意に上昇していた。

2) 各疾患群治療前後のサイトカインの変動

MP/EM 群では治療により IL-1 β 、IL-4、

IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、Eotaxin、GM-CSF、IFN- γ 、HMGB1 が有意に低下した。

SJS/TEN 群では治療により IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-13、GM-CSF、IP-10、VEGF が有意に低下した。

DIHS/DRESS 群では治療により IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、GM-CSF、IFN- γ 、IP-10、TNF α 、VEGF、HMGB1 が有意に低下した。

D 考察

全体的な傾向として薬疹発症時には各種サイトカインが上昇しており、軽快に伴い健常レベルまで低下していた。しかしながら疾患群で比較すると、最重症型の SJS/TEN 群において必ずしも EM/MP 群よりも炎症性サイトカイン濃度が高いわけではなく、薬疹の重症度とサイトカインレベルは相関しなかった。このことより、薬疹の病態には高サイトカイン血症が関与しているのは明らかであるが、サイトカイン濃度だけで重症化するわけではなく、SJS/TEN の発症には他の因子の関与が示唆され、既に報告されている結果を裏付けるものとなった。

DIHS/DRESS 群では他疾患群と比較して全般的にサイトカインが高値であった。中でも IL-5、IL-9、IL-13、Eotaxin などの Th2 関連のサイトカイン/ケモカインが上昇しており、好酸球増多を来す臨床像と矛盾しない結果となった。DIHS/DRESS においては Th2 ケモカインである TARC が上昇することも報告されており、薬剤による Th2 型細胞の異常活性化が本態と考えられた。さらに発症時には IL-10 の高値も認められ、既に報告されているように制御性 T 細胞の関与を示唆する結果となった。また IL-6、IL-12、IL-15、IFN- γ 、IP-10 などの炎症性サイトカイン/ケモカインも高値であった。これらの結果を考慮すると、DIHS/DRESS においては制御性 T 細胞由来と考えられる IL-10 と Th2 を主体とした炎症性反応のバランスで病態は形成されており、自然軽快する症例では IL-10 が優位になることが考えられ、その一方で大部分の症例においてステロ

イドの全身投与が必要となるのは、これらの免疫細胞の異常賦活化および高サイトカイン血症を抑制するためと考えられた。さらに GM-CSF や VEGF の高値も DIHS/DRESS の病態の複雑化に関与している可能性がある。

HMGB1 (High Mobility Group Box1) は PAMPs や DAMPs の刺激によって樹状細胞から産生される蛋白質で、転写因子の機能発現に重要な核内 DNA 結合蛋白であると同時に、活性化された樹状細胞、マクロファージあるいは壊死細胞から細胞外に放出され、周辺細胞が発現している RAGE あるいは TLR2 や TLR4 のリガンドとしても作用する。近年、血清 HMGB1 が SJS/TEN の早期診断マーカーになり得ることが示唆されているが、本研究においては SJS/TEN 群のみでなく DIHS/DRESS 群においてより高値であった。これらの疾患においてどのように病態に関与しているかは今後の検討課題である。

E 結論

薬疹型によるサイトカインプロファイルと比較検討した。薬疹の病態にはサイトカインが深く関与していること、重症薬疹の発症にはサイトカインだけでなく他の因子が必要であること、DIHS/DRESS では特殊なサイトカインプロファイルを呈すること、重症薬疹では HMGB1 が関与していることなどが示唆された。

今後はサイトカインの由来細胞や病態への関与を明らかにすることで、病態解明や新規治療法の開発に繋げる必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (平成 24 年度)

1. 論文発表

1) Aihara Y, Oyama Y, Ichikawa K, Takeshita S, Takahashi Y, Kabara T, Aihara M : Toxic epidermal necrolysis in a 4-year-old boy successfully treated with plasma exchange in combination with

methylprednisolone and i.v.immunoglobulin. Journal of Dermatology: 1-2, 2012.

2) Fujita H, Watanabe T, Okada R, Nozaki Y, Ayabe M, Imagawa T, Yokota S, Aihara M : Multiple fixed drug eruption caused by cyclophosphamide and its metabolite. European Journal of Dermatology: in press, 2013.

3) Tohkin M, Kaniwa N, Saito Y, Sugiyama E, Kurose K, Nishikawa J, Hasegawa R, Aihara M, Matsunaga K, Abe M, Furuya H, Takahashi Y, Ikeda H, Muramatsu M, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Ikezawa Z, the Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium : A whole-genome association study of major determinants for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. The Pharmacogenomics Journal: 60-69, 2013.

4) 國見裕子, 三津山信治, 相原道子, 池澤善郎, 佐々木哲雄 : HHV-6 抗体価の上昇をみたイソソルビドゼリーによる薬疹の 1 例. 皮膚臨床, 54:43-47, 2012.

5) 渡邊裕子, 佐野沙織, 村田奈緒子, 長島真由美, 白田阿美子, 前田修子, 山根裕美子, 池澤善郎, 相原道子 : 過去 6 年間における薬疹患者の統計的観察—横浜市立大学附属病院受診例について—. 日皮会誌, 122:2495-2504, 2012.

6) 稲川紀章, 高村直子, 宮川まみ, 長谷川美紀, 相原道子, 一山伸一 : 敗血症性ショック中に発症した中毒性表皮壊死症の 1 例. 皮膚科の臨床, 54:433-436, 2012,3.

7) 松山阿美子, 守屋真希, 佐野沙織, 高橋一夫, 山本昌樹, 佐々木昌博, 高橋幸利, 池澤善郎, 相原道子 : 慢性腎不全と結核罹患患者に生じた中毒性表皮壊死症の 1 例. 臨床皮膚科,

66:491-496, 2012.

8)相原道子：高齢者の薬疹—高血圧治療薬による乾癬型薬疹. 日本医事新報, 4581:65-68, 2012,2.

9)相原道子：重症薬疹の発症危険因子としての遺伝的背景. 皮膚臨床, 54(6):831-836, 2012.

10)相原道子：重症薬疹の発症における遺伝的背景. 横浜医学, 63:113-118, 2012.

11)相原道子：重症薬疹の診断基準—重症薬疹の鑑別のポイント—アレルギー, 61:1061-1066, 2012.

12)相原道子：医薬品副作用被害救済制度について；皮膚科医が知っておくべきこと. 皮膚科の臨床, 54:1664-1667, 2012.

13)相原道子：重症薬疹の最近の動向. 日本臨床皮膚科学会雑誌, 29:782-785, 2012,11.

14)松倉節子, 相原道子：重症薬疹(SJS/TEN)に対するアフェレシス療法の臨床的効果とサイトカインの変動. 日本皮膚科学会雑誌, 122:3541-3544, 2012,12.

15)池澤優子, 相原道子：薬疹の治療. MB Derma, 198:45-50, 2012, 11.

16)山根裕美子, 相原道子：5 忘れてはならない独特の薬疹—ペグインターフェロン・リバビリン併用療法による薬疹. 皮膚科の臨床, 54:1575-1578, 2012.

17)渡邊裕子, 相原道子：マイコプラズマ感染症によるSJS/TENの特徴. MB Derma, 198:51-57, 2012, 11.

18)小森(山口)絢子, 相原道子：6 重症薬疹. Modern Physician, 33:173-178, 2013, 2.

2. 学会発表

1)Aihara M, Watanabe Y, Matsukura S, Kambara T : A case of toxic epidermal necrolysis and DRESS/DIHS overlap due

to allopurinol. Drug Hypersensitivity Meeting 5, Munich, 2012,4,13.

2)Fujita H, Matsukura S, Kambara T, Ikezawa Z, Aihara M : Fluctuation of serum cytokine levels in subjects with severe adverse drug reactions. Drug Hypersensitivity Meeting 5, Munich, 2012, 4.

3)Fujita H, MD, Matsukura S, Komitsu N, Watanabe T, Watanabe Y, Kambara T, Ikezawa Z, Aihara M : Comparison of serum cytokine profile in cutaneous adverse drug reactions. The 31st Congress of European Allergy and Clinical Immunology, Geneva, 2012, 6.

4)Watanabe Y, Sano D, Okada R, Murata N, Nagashima M, Hakuta A, Yamane Y, Ikezawa Z, Aihara M : Clinical Analysis of Cutaneous Adverse Drug Reactions in Yokohama City University Hospital. The 5th Drug Hypersensitivity Meeting, Munich, 2012, 4.

5)相原道子：特別講演、薬疹—診断と治療の最近の進歩—。日本皮膚科学会愛媛地方会第55回学術大会, 松山, 2012,3,11.

6)相原道子：シンポジウム2 光線過敏症—新たな展開—薬剤性光線過敏症. 光皮膚科学研究会設立大会, 東京, 2012,3,25.

7)相原道子：シンポジウム4 薬疹・中毒疹最近の話題, 重症薬疹の最近の動向. 第28回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会, 博多, 2012,4,22.

8)相原道子：シンポジウム19 重症薬疹の診断と治療—SJS/TENの治療法—. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会, 大阪, 2012,5,13.

9)相原道子：シンポジウムI 薬剤アレルギー—その実態と対策—最近の薬疹とその対策. 第43回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会, 東京, 2012,6,15.

10)相原道子：シンポジウム6 薬疹本

音トーク. 第 42 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 軽井沢, 2012,7,15.

11) 杉山永見子, 鹿庭なほ子, 池田浩子, 相原道子, 松永佳世子, 黒瀬光一, 前川京子, 頭金正博, 古谷博和, 村松正明, 木下 茂, 矢上晶子, 安倍正通, 外園千恵, 上田真由美, 池澤善郎, 斎藤嘉朗, 高橋幸利: 日本人におけるラモトリギン誘因性重症薬疹発症と HLA タイプとの相関解析. 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 2012,3.

12) 松倉節子, 相原道子: 重症薬疹 (SJS/TEN) に対するアフェレシス療法の臨床的. 第 111 回日本皮膚科学会総会, 京都, 2012,6,1.

13) 松倉節子, 相原道子, 杉山永見子, 高橋幸利, 古谷博和, 木下 茂, 鎌谷直之, 斎藤嘉郎, 松永佳世子, 鹿庭なほ子: 日本人におけるスティーブンス・ジョンソン症候群・中毒性表皮壊死症と相関する HLA タイプの探索. 第 111 回日本皮膚科学会総会, 京都, 2012,6,2.

14) 渡邊裕子, 松倉節子, 大野真梨恵, 久田恭子, 磯田祐士, 守田亜希子, 福永有希, 相原道子, 蒲原 毅: HHV-6 抗体価上昇をみた中毒性表皮壊死症 (TEN) の 1 例. 日本皮膚科学会第 841 回東京地方会, 横浜, 2012,1,21.

15) 渡邊裕子, 松倉節子, 大野真梨恵, 久田恭子, 磯田祐士, 守田亜希子, 蒲原 毅, 池澤善郎, 相原道子: ミニシンポジウム 14 薬物アレルギー, 過去 8 年間に横浜市立大学附属市民総合医療センター皮膚科を受診した薬疹患者の統計的観察. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 大阪, 2012,5,13.

16) 渡邊裕子, 前田修子, 山根裕美子, 佐野沙織, 生長奈緒子, 長島真由美, 白田阿美子, 池澤善郎, 相原道子: 過

去 6 年間の横浜市大における薬疹患者の統計的観察. 第 111 回日本皮膚科学会総会, 京都, 2012,6,2.

17) 長島真由美, 山口由衣, 稲川紀章, 池澤善郎, 相原道子: コハク酸メチルプレドニゾロンによる紅皮症型薬疹の 1 例. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 大阪, 2012,5,12.

18) 松浦みどり, 山口由衣, 野崎由生, 岡田里佳, 伊藤佳世子, 金岡美和, 郷田素彦, 益田宗孝, 相原道子: 90% 以上の表皮壊死を伴い救命し得た中毒性表皮壊死症の 1 例. 日本皮膚科学会第 846 回東京地方会, 伊勢原, 2012,12,15.

19) 野崎由生, 石田修一, 大川智子, 藤田浩之, 相原道子: 抗けいれん薬による中毒性表皮壊死症の 1 例. 日本皮膚科学会第 845 回東京地方会, 川崎, 2012,11,17.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

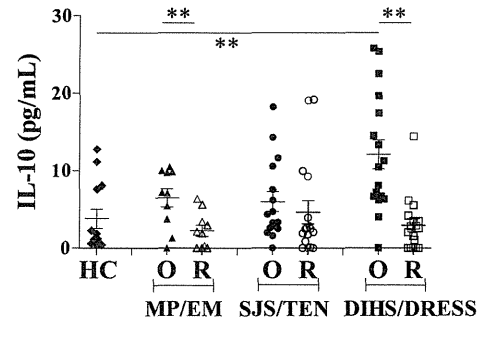
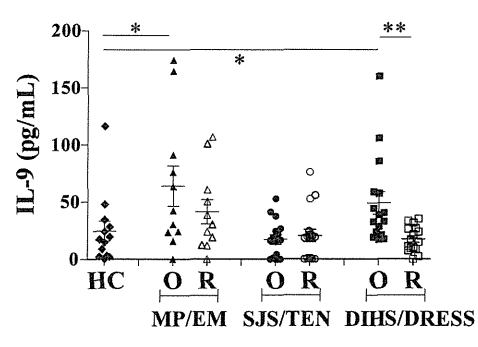
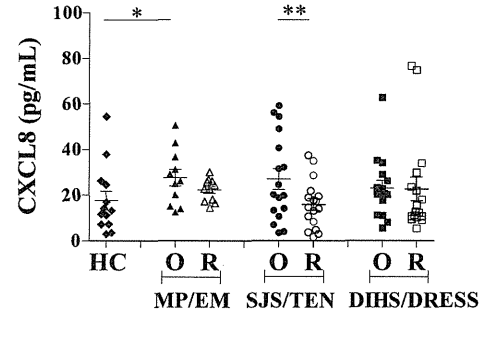
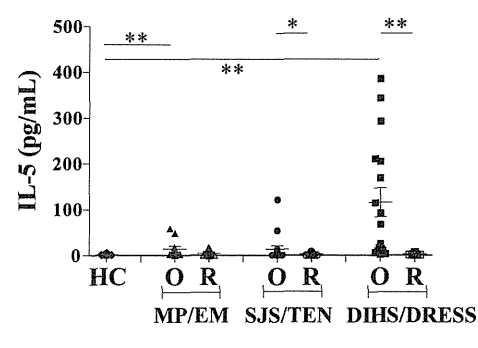
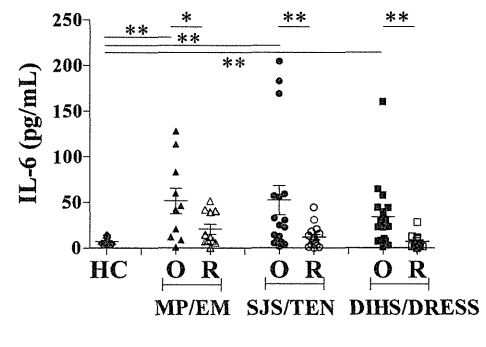
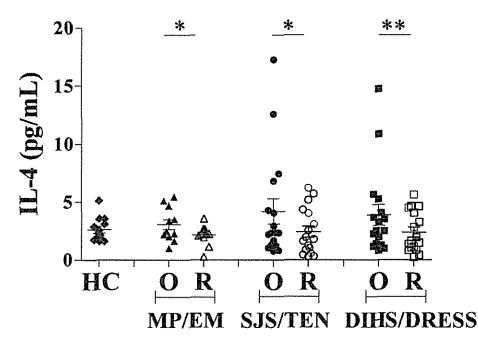
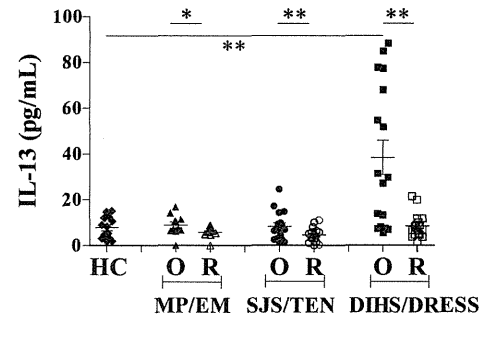
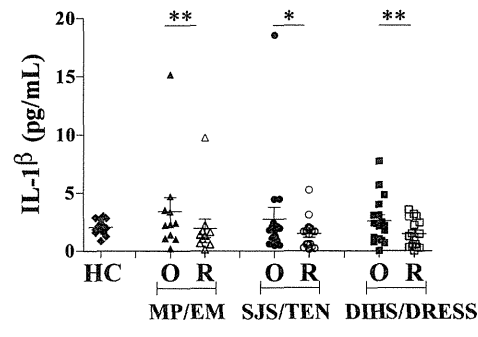
なし

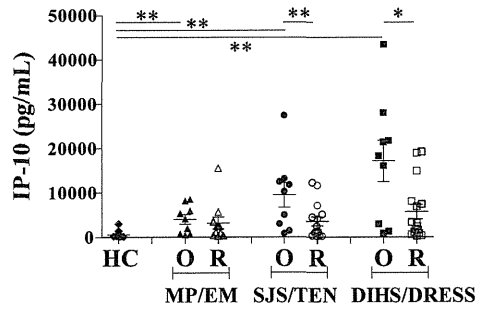
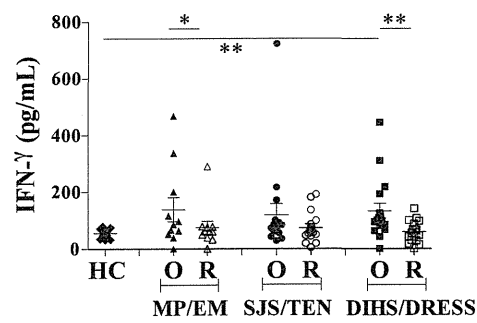
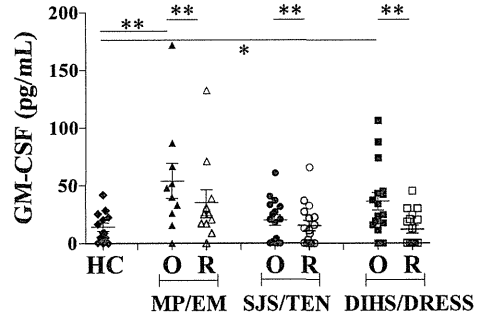
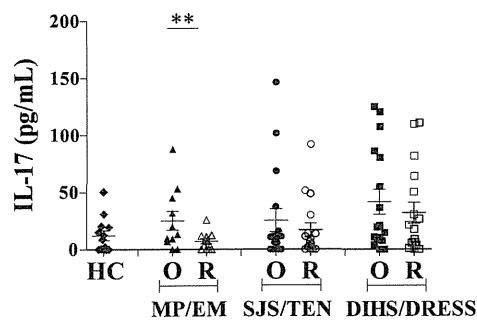
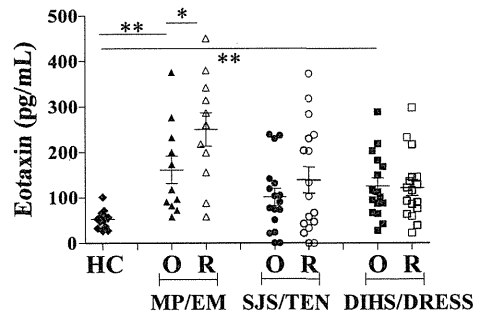
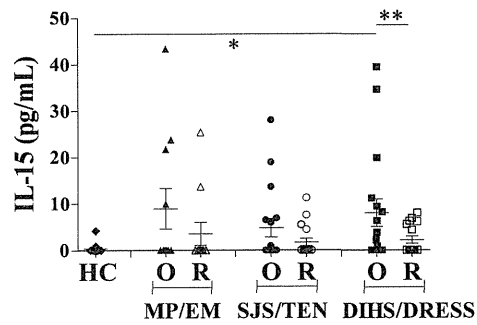
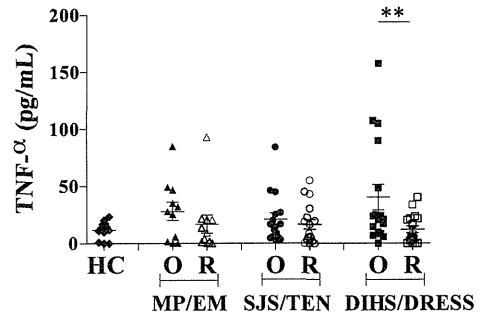
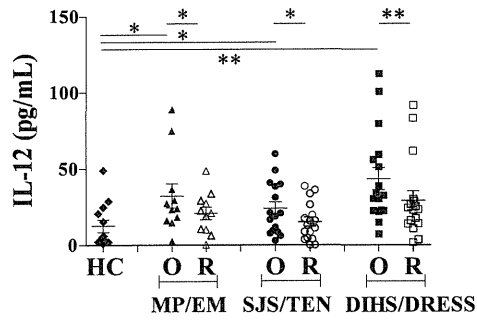
2. 実用新案登録

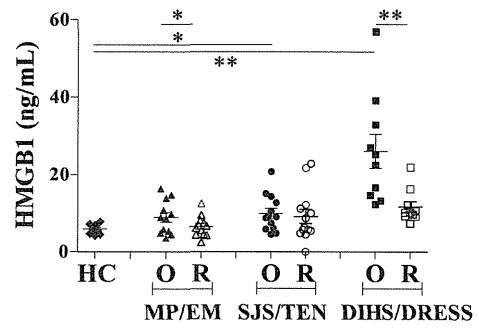
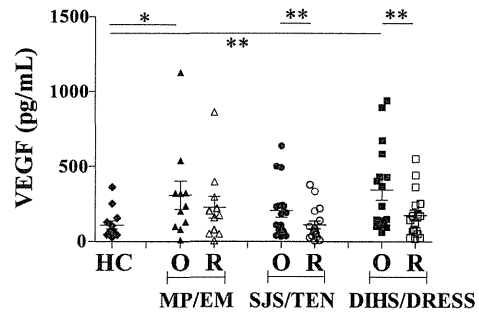
なし

3. その他

なし







厚生労働科学研究費補助金「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
分担研究報告書

本邦 2008 年～2012 年 DIHS 報告症例における予後因子調査
分担研究者 森田栄伸 島根大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 薬剤性過敏症候群 (DIHS) は、被疑薬中止のみで自然軽快する症例からステロイドパルス、グロブリン製剤投与にもかかわらず不幸にも死亡の転機をたどる症例まであり、その重症度は個々の症例により大きく異なる。このため治療指針が定まっていない。今回、DIHS の予後に関与する要因を明らかにする目的で、医中誌検索で入手し得た 2008～2012 年の報告例 81 症例からデータ抽出して、死亡症例と生存例とで予後因子解析を行った。数値データは t 検定を行い、数値化できないデータ (カテゴリーデータ) は Fischer の正確確率検定を行った。死亡症例にて有意に多かった項目は①年齢 (≥60 歳) ②Crea>2.0③ステロイドパルス施行の有④DIHS 治療中の肺炎または播種状血管内凝固症候群 (DIC) 合併の有⑤原因薬剤がアロプリノールである⑥DIHS 治療中の合併症の数であった。DIHS の治療指針作成に際してはこれらの要因を加味する必要があると考えた。

共同研究者

新原寛之 (島根大学医学部皮膚科)

金子 栄 (島根大学医学部皮膚科)

A. 研究目的

薬剤性過敏症候群 (DIHS) は、被疑薬中止のみで自然軽快する症例からステロイドパルス、グロブリン製剤投与にもかかわらず不幸にも死亡の転機をたどる症例まであり、その重症度は個々の症例により大きく異なる。このため治療方針が定まっていない。DIHS の重症度スコアリングが可能となれば、重症度に応じた治療法の選択が可能となる。今回、DIHS 治療指針作成の予備調査として国内の DIHS 報告例を収集し、死亡症例と生存例とで臨床項目の解析を行った。

B. 研究方法

対象は医学中央雑誌検索で 2008～2012 年に報告された症例 81 例を対象とした。死亡例が 9 例、生存例が 72 例、男性 39 例、女性 42 例、平均年齢 49.85 歳±20.83 歳であった。死亡例と生存例について、被疑薬、年齢、体温、採血データ (最大値)、服薬期間、ステロイド投薬量、各種ウイル

ス抗体価などについて分析した。バイタルサインについては記載されていない症例が全体の 9 割以上であり、本邦報告例では検討ができなかったため、海外での分析例を次の文献 Wei CH et al. Eur J Dermatol. 2011; 21: 930-937.から引用した。数値データは t 検定を行い、カテゴリーデータは Fischer の正確確率検定を行った。数値での比較が可能とするため、表現があいまいなものも可能な限り数値化して統計処理を行った。例えば薬剤開始日を上旬という表現が使用されている場合は中間の数値である 5 日を使用して統計処理した。薬剤投与量も投与のグラフから最低限投与が確実に行われている量を算出して計算した。発熱に関して 38 度台と表現してあるものは 38.5 度に数値化して検討した。本邦症例の検討では $P < 0.05$ で有意差ありとした。

C. 研究結果

分析の結果、死亡例に有意に高値であった項目を以下に示す。

- ・年齢 (≥60 歳)
- ・血清 Creatinin 値 (Crea) (最大値) > 2.0

・DIHS 治療中の合併症の数
カテゴリーデータで死亡例において有意に多かった項目を以下に示す。

- ・原因薬剤がアロプリノール
- ・ステロイドパルス施行
- ・DIHS 治療中の肺炎または播種状血管内凝固症候群 (DIC) 合併

であった。ステロイドパルス施行の有無については、重症化要因とするより、重症であったための結果であった可能性が考えられた。

海外からの報告では

- ・脈拍 > 90/min (病初期)
- ・白血球数 > 12,000 (病初期)
- ・呼吸数 > 20/min (病初期)
- ・凝固能延長 (INR > 1.3) (病勢期)
- ・消化管出血 (病勢期)

が死亡例における有意項目であった。本邦と海外との報告をまとめて病初期と病勢期で危険因子を抽出した。

病初期

- ① 年齢 (≥ 60 歳) (P < 0.002)
- ② 原因薬剤がアロプリノール (P < 0.001)
- ③ 脈拍 > 90/min (P < 0.0004)
- ④ 白血球数 > 12,000 (P < 0.004)
- ⑤ 呼吸数 > 20/min (P < 0.001)

病勢期

- ① 脈拍 > 90/min
- ② 白血球数 > 12,000
- ③ 呼吸数 > 20/min
- ④ 凝固能延長 (INR > 1.3) (P < 1.0×10^{-6})
- ⑤ 消化管出血 (P < 1.0×10^{-6})
- ⑥ Crea > 2.0 (P < 0.011)
- ⑦ DIHS 治療中の肺炎または播種状血管内凝固症候群 (DIC) 合併の有 (P < 0.0001)
- ⑧ DIHS 治療中における合併症の数 (≥ 3) (P < 1.0×10^{-6})

D. 考察

DIHS の予後規定要因として、本邦症例の検討から年齢 (≥ 60 歳)、薬疹治療中合併症数、特定

の被偽薬剤 (アロプリノール)、腎障害 (Crea > 2.0)、海外報告からバイタルサインの異常、凝固能異常、消化管出血が抽出できた。本邦 DIHS 死亡報告ではアロプリノールが被疑薬剤である場合が高頻度であった。このことは、薬疹発症後の薬剤の中止までの期間が関与している可能性があるが、今回の検討では明らかにできなかった。腎機能の低下も死亡例に有意に高頻度にみられ、危険因子と考えた。これはこれまでの報告に一致するものであった。肝酵素の値に有意差はみられなかった。Wei らの報告からは白血球数とバイタルサインの異常が予後因子に関連していたが、これらの項目は近年様々な炎症性疾患で重症化する要因となる全身性炎症反応症候群 (SIRS) の診断基準に一致していた。つまり、重症化した DIHS の病態は SIRS の状態である可能性が考えられた。SIRS における高サイトカイン血症は TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 などが上昇していることが確認されているが、これらが好中球の活性化、凝固能活性化をまねき肺炎、DIC といった致死的状态を生じる可能性が示唆されている。さらに、免疫抑制加療による免疫抑制状態にて感染を合併すること、特に日和見感染による肺炎が加わって呼吸機能不全を生じさせるとされる。今回の検討にて、死亡症例 9 例中の 2 例は既往症の大動脈解離、肺癌が死亡原因であったが、他 7 例全てが肺炎または多臓器不全が死亡原因であった。DIC も生じた微小血栓による臓器障害から多臓器不全に至るため、SIRS との関連が考えられる。SJS/TEN などの重症薬疹の重症化指標として allarmin の一つである HMGB1 が重要視されているが、それは同時に敗血症の重症化マーカーとしても考慮されており、HMGB1 を血漿交換療法にて特異的に除去する方法も検討されつつある。DIHS の重症度指標作成に際しては、今回の検討で明らかにされた因子を盛り込むことが望まれる。

E. 結論

・本邦症例報告から DIHS の予後因子について調査した。

- ・本邦症例調査と海外文献から病初期、病勢期とで予後因子が抽出できた。
- ・予後因子をもとに DIHS の重症度指標の作成が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Mizumoto K, Sumikawa Y, Niihara H, Morita E. Case of carbamazepine -induced hypersensitivity syndrome associated with human leukocyte antigen-A*3101. *J Dermatol.* 39: 791-792, 2012.
2. Niihara H, Kakamu T, Fujita Y, Kaneko S, Morita E. HLA-A31 strongly associates with carbamazepine -induced adverse drug reactions but not with carbamazepine-induced lymphocyte proliferation in a Japanese population. *J Dermatol.* 39: 594-601, 2012.
3. Chinuki Y, Kaneko S, Dekio I, Takahashi H, Tokuda R, Nagao M, Fujisawa T, Morita E. CD203c expression-based basophil activation test for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 129: 1404-6, 2012.
4. Chinuki Y, Morita E. Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Protein in Soap. *Allergol Int.* 61: 529-37, 2012.
5. 森田栄伸：アスピリン不耐症，食物依存性運動誘発アナフィラキシー(FDEIA)はなぜ起こる．皮膚科サブスペシャリティーシリーズ 1冊でわかる皮膚アレルギー．塩原哲夫，宮地良樹，清水 宏 編．文光堂．pp178-180, 2012
6. 森田栄伸，千貫祐子，野上京子：蕁麻疹・血管性浮腫型薬疹．*MB Derma* 198: 65-69, 2012

学会発表

1. 新原寛之：3 剤併用による皮膚症状への治療戦略について．テラビック錠 新発売記念学術講演会．出雲市，2012 年 2 月
2. 遠山京子，千貫祐子，澄川靖之，今岡かおる，山本 慧，森田栄伸，福代新治，高橋賢史：塩酸エペリゾン（トルミナール®）によるアナフィラキシー型薬疹の 1 例．第 123 山陰・第 19 回島根合同開催地方会．出雲市，2012 年 3 月
3. 今岡かおる，金子 栄，森田栄伸，丸山理留敬：関節リウマチ、シェーグレン症候群でアダリムマブ投与中に生じた DLE 様薬疹の 1 例．第 123 山陰・第 19 回島根合同開催地方会．出雲市，2012 年 3 月
4. 新原寛之，森田栄伸：PCR 法にてリケッチアを鑑別したラモトリギンによる重症薬疹の 1 例．第 4 回日本リケッチア症臨床研究会・第 18 回リケッチア研究会合同研究発表会．大阪市，2012 年 2 月
5. 村田 将，澄川靖之，高橋 仁，松木真吾，太田征孝，新原寛之，古賀浩嗣，橋本 隆，森田栄伸：Stevens-Johnson 症候群様症状を呈した抗ラミニン 332 型天疱瘡の 1 例．第 76 回日本皮膚科学会東部支部学術大会．札幌市，2012 年 9 月
6. 飛田礼子，野上京子，千貫祐子，森田栄伸：中間代謝産物を用いたパッチテストで陽性を示したカルボシステインによる固定薬疹の 1 例．第 46 回日本皮膚科学会西部支部学術大会．広島市，2012 年 10 月

厚生労働科学研究費補助金「難治性疾患等克服研究事業
(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におけるケモカインの血中動態の研究
—早期診断ならびに疾患活動性マーカーとしての意義—
分担研究者 浅田秀夫 奈良県立医科大学皮膚科 教授

研究要旨 薬剤性過敏症症候群 (DIHS) は、発熱、臓器障害、ヒトヘルペスウイルス再活性化を伴う重症薬疹の一つである。われわれは、DIHS において紅皮症、好酸球増多、制御性 T 細胞増多がしばしばみられることに着目し、TARC が病態形成に関わっている可能性を考え、その検証を試みた。その結果、スティーブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症、紅斑丘疹型薬疹と比べ、DIHS では急性期の血清 TARC 値が著明な高値を示し、血清 TARC 値が DIHS の有力な診断マーカーとなり得る可能性が示唆された。さらに血清 TARC 値の動きは、DIHS における皮疹、好酸球数、可溶性 IL-2 受容体、IL-5 とも比較的良く相関することが判明し、疾患活動性の指標の一つとなり得るものと考えられた。また、TARC は DIHS 皮疹部 CD11c 陽性真皮樹状細胞から産生されることが明らかとなった。

共同研究者

小川浩平 (奈良県立医科大学皮膚科)
長谷川文子 (奈良県立医科大学皮膚科)
岸本年史 (奈良県立医科大学精神科)

A. 研究目的

薬剤性過敏症症候群 (DIHS) は、発熱や臓器障害などを伴う重症薬疹の一つであり、ヒトヘルペスウイルス (特に HHV-6) の再活性化を伴って経過が遷延することが特徴である。しかし、その病態については、今なお不明な点が多い。一方、TARC は Th2 型免疫反応の誘導や制御性 T 細胞 (Treg) 増多を引き起こすケモカインのひとつとして知られ、アトピー性皮膚炎の病勢マーカーとして広く用いられている。また、TARC は紅皮症状態でしばしば上昇することも知られている。われわれは DIHS においてしばしば、紅皮症、好酸球増多、Treg 増多がみられることに着目し、病態形成に TARC が関わっている可能性を推測し、その検証を試みた。

B. 研究方法

① DIHS 8 症例、スティーブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症 (SJS/TEN) 7 症例、紅斑丘疹型薬疹 (MPE) 14 症例の 3 群について、急性期の患者血清中の TARC 値を、ELISA 法にて測定し、3 群間で比較検討した。

② DIHS において、血清 TARC 値の推移と臨床症状や臨床検査データとの相関を経時的に調べた。

③ DIHS および MPE の皮疹部から生検を行い、皮膚における TARC の発現を免疫組織化学的に検討した。

④ 臨床的に DIHS を疑った患者について、 β ヘルペスウイルス (HHV-6, -7, CMV) 再活性化群 (n=20) と非再活性化群 (n=8) に分けて、急性期の TARC 値を比較した。

(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

① DIHS, SJS/TEN, MPE の急性期における血清 TARC 値の比較: 急性期の血清 TARC 値は、DIHS 患者群において平均 31, 259 pg/ml と著しく上昇しており、SJS/TEN 患者群 (2, 198 pg/ml) および MPE 患者群 (2, 531 pg/ml) と比較して有意に高値を示した。

② DIHS における血清 TARC 値の動態: DIHS 患者では、血清 TARC 値が皮疹の活動性と良く相関することが明らかとなった。また、血清可溶性 IL-2 受容体値 ($r = 0.91$, $P < 3 \times 10^{-19}$)、血清 IL-5 値、末梢血好酸球数 ($r = 0.73$, $P < 5 \times 10^{-10}$) の推移とも比較的良

く関連していた。

③ TARC 発現の免疫組織化学的検討：DIHS 皮疹部に浸潤している CD11c 陽性の真皮樹状細胞に TARC の著明な発現を認めた。

④ β ヘルペスウイルス再活性化群と非再活性化群における血清 TARC 値の比較：

β ヘルペスウイルス再活性化群では平均 20,418 pg/ml、非再活性化群では平均 3,947 pg/ml と、血清 TARC 値は再活性化群で有意に高値を示した。

D. 考察

DIHS の診断には、HHV-6 の検出が決め手となることが多いが、HHV-6 の再活性化は通常発症から 2-3 週間経過してからみられることが多く、急性期にはしばしば診断に苦慮する。今回の研究結果では DIHS 急性期に血清 TARC の平均値が 31,259 pg/ml と著しく上昇しており、SJS/TEN や MPE との鑑別に役立つことが示された。血清 TARC 値は、アトピー性皮膚炎の疾患活動性マーカーとして広く用いられているが、その重症例においても 10,000 pg/ml を超えることはまれであることから、薬疹以外の皮膚疾患と DIHS との鑑別にも TARC が有用である可能性が示唆された。さらに、血清 TARC 値は DIHS の活動性の指標の一つとしても役立つことが示され、治療効果の判定や治療方針の決定に役立つマーカーとしても利用できる可能性が示された。また、DIHS 患者の皮疹部では、TARC が主に CD11c 陽性の真皮樹状細胞から産生されることも明らかとなった。

DIHS における β ヘルペスウイルスの再活性化機序については、未だほとんどわかっていない。今回の研究結果では、臨床的に DIHS を疑った患者のうち β ヘルペスウイルスの再活性化を伴った群では再活性化がみられなかった群と比較して血清 TARC 値が有意に高値を示していた。現時点では推測の域を出ないが、血清 TARC 値の上昇、あるいはそれに続く免疫変調が β ヘルペスウイルス再活性化の引き金として重要な役割を果たしているのかもしれない。TARC と

β ヘルペスウイルス再活性化との関わりについて、今後さらに検討を進める予定である。

E. 結論

血清 TARC 値が DIHS の早期診断ならびに疾患活動性の有力なマーカーとなることが明らかになった。また、血清 TARC の上昇は DIHS における β ヘルペスウイルスの再活性化に何らかの役割を果たしている可能性も示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

<論文発表>

1. Morito H, Kitamura K, Fukumoto T, Kobayashi N, Kuwahara M, Asada H: Drug eruption with eosinophilia and systemic syndrome associated with reactivation of human herpesvirus 7, not human herpesvirus 6. *J Dermatol* 39(7): 669-70:2012
2. Ogawa K, Morito H, Kobayashi N, Fukumoto T, Asada H: Case of drug-induced hypersensitivity syndrome involving multiple-drug hypersensitivity. *J Dermatol* 39(11): 945-6: 2012
3. Hirobe S, Matsuo K, Quan YS, Kamiyama F, Morito H, Asada H, Takaya Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S: Clinical study of transcutaneous vaccination using a hydrogel patch for tetanus and diphtheria. *Vaccine* 30(10): 1847-54, 2012
4. Takao Y, Miyazaki Y, Onishi F, Kumihashi H, Gomi Y, Ishikawa T, Okuno Y, Mori Y, Asada H, Yamanishi K, Iso H, for the SHEZ Study group: Prospective cohort study of herpes zoster in Shozu County: The Shozu Herpes Zoster (SHEZ) Study. *J of Epidemiology* 22(2): 167-74:2012

5. Tang H, Moriishi E, Okamoto S, Okuno Y, Iso H, Asada H, Yamanishi K, Mori Y: A community-based survey of varicella-zoster virus-specific immune responses in the elderly. *J Clin Virol* 55(1): 46-50, 2012
 6. Hasegawa A, Kobayashi N, Fukumoto T, Asada H: A case of eosinophilic pustular folliculitis with response to infliximab. *J Am Acad Dermatol* 67: e136-e137, 2012
 7. Hagiya M, Inoue T, Furuno T, Iino T, Itami S, Nakanishi M, Asada H, Hosokawa Y, Ito A: Increased expression of cell adhesion molecule 1 by mast cells as a cause of enhanced nerve-mast cell interaction in a hapten-induced mouse model of atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 2012 [Epub ahead of print]
 8. Ogawa K, Morito H, Hasegawa A, Daikoku N, Miyagawa F, Okazaki A, Fukumoto T, Kobayashi N, Kasai T, Watanabe H, Sueki H, Iijima M, Tohyama M, Hashimoto K, Asada H: Identification of thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) as a potential marker for early indication of disease and prediction of disease activity in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/ drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). *J Dermatol Sci* 69(1): 38-43, 2013
 9. Asada H, Nagayama K, Okazaki A, Mori Y, Okuno Y, Takao Y, Miyazaki Y, Onishi F, Okeda M, Yano S, Kumihashi H, Gomi Y, Maeda K, Ishikawa T, Iso H, Yamanishi K: An inverse correlation of VZV skin-test reaction, but not antibody, with severity of herpes zoster skin symptoms and zoster-associated pain. *J Dermatol Sci* 69(3): 243-9, 2013
 10. Ommori R, O uji N, Mizuno F, Kita E, Ikada Y, Asada H: Selective induction of antimicrobial peptides from keratinocytes by staphylococcal bacteria. *Microbial Pathogenesis* 56:35-9, 2013
 11. Okuno Y, Takao Y, Miyazaki Y, Ohnishi F, Okeda M, Yano S, Kumihashi H, Gomi Y, Maeda K, Ishikawa T, Mori Y, Asada H, Iso H, Yamanishi K: Assessment of skin test with varicella-zoster virus antigen for predicting the risk of herpes zoster. *Epidemiol Infect* 141(4):706-13, 2013
- <学会発表>
1. 氷室佑季子、飯岡弘至、大黒奈津子、長谷川文子、宮川 史、福本隆也、小林信彦、浅田秀夫：カロナール（アセトアミノフェン）によると考えられたTENの1例. 第433回 日本皮膚科学会大阪地方会(大阪)2012.9.15
 2. Ogawa K, Hasegawa A, Daikoku N, Miyagawa F, Okazaki A, Fukumoto T, Kobayashi N, Kasai T, Asada H: Identification of thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS): Identification of TARC as potential marker for early indication of the disease and prediction of the disease activity. 5th Drug Hypersensitivity Meeting (Munich, Germany) 2012.4.11-14
 3. Asada H: Drug-induced hypersensitivity syndrome involving multiple-drug hypersensitivity. 5th Drug Hypersensitivity Meeting (Munich, Germany)2012.4.11-14
 4. 浅田秀夫：皮膚アレルギー疾患とヘルペスウイルス感染症との関わり. 第28回 日本臨床皮膚科学会近畿ブロック総会・学術大会（奈良）2012.11.18
 5. 伊東由美子、余語章子、福本隆也、小林信彦、浅田秀夫、矢追博章：アデノウイルス咽頭炎後に発症したStevens-Johnson症候群の小児例. 第112回 日本皮膚科学会（京都）2012.6.1
 6. 浅田秀夫：薬疹の予防-重症薬疹、分子標的薬による薬疹を中心に-. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会(大阪)2012.11.29
 7. 小川浩平、森戸啓統、長谷川文子、宮

川史、岡崎愛子、福本隆也、小林信彦、渡辺秀晃、末木博彦、飯島正文、藤山幹子、橋本公二、浅田秀夫：薬剤性過敏症症候群 (DIHS)における血清 TARC 値の臨床的意義.
第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会
(大阪)2012. 11. 29

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「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」

分担研究報告書

重症薬疹モデルマウスの作成と病態機序の解析

研究分担者 谷崎英昭 京都大学医学研究科 皮膚科学 非常勤講師

研究協力者 椛島健治 京都大学医学研究科 皮膚科学 准教授

研究協力者 中島沙恵子 京都大学医学研究科 皮膚科学 研究員

研究要旨 SJS/TEN といった重症薬疹は、いまだに高率な死亡率を有する重篤な疾患であるにもかかわらず、その進行の急速さや患者数の少なさから病態発症機序に関する十分な検討を患者サンプルを用いて行うことは困難である。これら疾患の動物モデルの開発と解析は SJS/TEN の病態発症機序解析に非常に重要である。今回我々は、Involucrin プロモーター下にモデル自己抗原を発現する遺伝子改変マウス (Inv-mOVA マウス) を作成した。このマウスでは、自己抗原特異的な T 細胞受容体のみを発現する CD8⁺T 細胞を移入することにより SJS/TEN 様の皮膚炎症状を発症することが確認出来た。さらに、血清中のマーカーなど、重症薬疹モデルマウスとしての有用性を検討した。

A. 研究目的

重症薬疹である Stevens-Johnson 症候群 (SJS) や中毒性表皮壊死症 (TEN) はいまだに高率な死亡率を有する重篤な疾患であるにもかかわらず、その進行の急速さや患者数の少なさから病態発症機序に関する検討を患者サンプルを用いて行うことは困難である。これら疾患の動物モデルの開発と解析は病態機序の解析に非常に重要である。

既存の動物モデルとしては、K5 プロモーター下に自己抗原を発現する遺伝子改変マウス (K5-mOVA マウス) の報告があるが、このマウスに SJS/TEN 様の皮膚炎を発症させるためには制御性 T 細胞 (Treg) または胸腺の除去が必須であるため、Treg が病態形成の一端を担っていると考えられている SJS/TEN の疾患モデルマウスとしては不十分であると考えらる。

そこで我々は、Involucrin プロモーター下にモデル自己抗原を発現する遺伝子改変マウス (Inv-mOVA マウス) を作成し、SJS/TEN 動物モデルとしての有用性を検討した。

B. 研究方法

表皮ケラチノサイトにモデル自己抗原を発現する遺伝子改変マウス (Involucrin プロモーター下にニワトリの卵白アルブミン <Ovalbumin (OVA)> を膜結合蛋白として発現する Inv-mOVA マウス) と CD8⁺T 細胞が OVA

に特異的な T 細胞受容体を持つ遺伝子改変マウス (OT-I マウス) の 2 種類のマウスを用いた。

Inv-mOVA マウスに、OT-I マウスの脾臓・リンパ節から採取した CD8⁺T 細胞を経静脈的に移入し、皮膚への細胞浸潤や浮腫を耳介厚の変化により評価した。また、発症前・発症早期・発症後・治癒後の皮膚・血清のサンプリングを行った。皮膚サンプルは Hematoxylin & Eosin (HE) 染色で表皮浮腫や表皮細胞の好酸性壊死および細胞浸潤の程度の評価を行い、TUNEL 染色により表皮細胞の壊死の評価を行った。血清サンプルは、これまで SJS/TEN でバイオマーカーとして報告されている、可溶性 Fas ligand (sFasL) や high mobility group box protein 1 (HMGB1) に関して enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて検討を行った。

(倫理面への配慮)

研究内容は、「研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に従い、京都大学組み換え DNA 実験安全管理委員会の審議をへて承認を受けており、法令を遵守して行う。また動物実験については、京都大学の動物実験委員会の審議を経て承認を受けており、施設が定める規則に

従い、最大限に動物愛護に配慮した方法で行われる。

なお、本研究は遺伝子治療研究や臨床研究は含まない。

C. 研究結果

Inv-mOVA マウスに OT-I マウス由来の CD8⁺T 細胞を経静脈的に移入すると、移入後 7 日目より眼瞼皮膚の落屑や体幹皮膚の潮紅が出現した。これらの皮膚症状は移入後 14 日目前後まで増悪を続けた。ケブネル現象陽性所見も認められた。皮膚炎症状と合致して、耳介腫脹は移入後 14 日目をピークに推移し、移入後 28 日目には皮膚炎症状・耳介腫脹ともに改善を示した。経過中、一部のマウスでは衰弱・死亡するものもあったが、生存したマウスでは軽度の体重減少と衰弱は認めるものの、移入後 21 日以降は症状の改善とともに衰弱・体重減少ともに回復を認めた。C57BL/6 マウス由来の CD8⁺T 細胞を移入した Inv-mOVA マウスでは皮膚炎を発症しなかった。

発症前・移入後 5 日目・移入後 7 日目・移入後 14 日目・移入後 21 日目に血清を採取し、これまで SJS/TEN で血清レベルの上昇を認めると報告されているマーカーについて ELISA 法にて検討を行った。sFasL は、ヒトとの報告と同様、皮疹出現前の 5 日目をピークに血清レベルで上昇を認め、皮疹出現日の 7 日目以降は正常値を示した。また、以前我々が SJS/TEN の新たなバイオマーカーとして報告した HMGB1 は、皮疹出現前の 5 日目をピークに血清レベルでの上昇を認め、21 日目まで正常レベルと比較して上昇を認めた (図 1)。

耳介組織を発症前・5 日目・7 日目・14 日目・21 日目に採取し、HE 染色および TUNEL 染色を施行した。また一部はフローサイトメーターにて浸潤細胞の表面マーカーを解析した。HE 染色では、皮疹発症の 7 日目より表皮ケラチノサイトの好酸性壊死を散見し、14 日目には SJS/TEN と同様の表皮の全層性壊死が認められた。TUNEL 染色では、皮疹出現前の 5 日目より TUNEL 陽性細胞を表皮内に認め、7 日目・14 日目とその数は増加を認めた (図 2)。フローサイトメータ

ーによる浸潤細胞の表面マーカー解析では、CD8⁺T 細胞の浸潤を認めた。

D. 考察

今回我々は、Involucrin プロモーター下に蛋白抗原を発現する Inv-mOVA マウスを作成し、抗原特異的 T 細胞受容体のみを発現する CD8⁺T 細胞の移入により SJS/TEN 様の皮膚症状を再現した。

既存の K5-mOVA マウスでは、K5 が胸腺にも発現を認めることから、SJS/TEN 様の皮膚炎を発症させるためには Treg の除去もしくは胸腺の切除が必須であった。これに比して Involucrin は、胸腺には発現をほとんど認めず、表皮ケラチノサイトに特異的に発現しているため、抗原特異的な CD8⁺T 細胞の移入により SJS/TEN 様の皮膚炎を自然発症させることが可能となった。さらには発症機序の解析を、薬疹の病態形成の一端を担っていると考えられている Treg 存在下に行うことができる点でも既存のモデルよりも病態メカニズムに迫ることが可能となったと考えられる。

E. 結論

CD8⁺T 細胞の移入により SJS/TEN 様の皮膚炎を自然発症する遺伝子改変マウスの作成に成功した。このマウスの皮膚炎症状は、臨床的・組織学的に SJS/TEN に酷似しており、また血清中のバイオマーカーの推移も SJS/TEN に酷似したものであった。

今後さらなる解析を行うことにより、重症薬疹発症機序の解明の一助となることが期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. 梶島健治:アレルギー疾患最前線. 審良 静男、熊ノ郷淳、竹田潔編. 免疫学 update 146-151, 2012, 南山堂
 2. 梶島健治: アレルギー. 熊ノ郷淳. 免疫学コア講義 219-224, 2012, 南山堂
 3. 梶島健治: 薬剤と光線過敏症. 多様化する光線過敏症. Monthly Book Derma.

191: 32-36, 2012

4. 中島沙恵子：重症型薬疹の早期診断における high mobility group box protein 1 (HMGB1) の有用性. 渡辺秀晃編. Monthly Book Derma. 198: 25-27, 2012
5. Nonomura Y, Kabashima K.: Clostridium difficile Colitis and Neutropenic Fever Associated with Docetaxel Chemotherapy in a Patient with Advanced Extramammary Paget's Disease. Case Rep Dermatol. 177-180, 2012
6. Nonomura Y, Kabashima K.: Female pattern hair loss possibly caused by tamoxifen: Androgen receptor expression in the outer root sheath in the affected area. J Dermatol. 1060-1061, 2012
7. Kayama T, Kabashima K.; Improvement of anti-TNF α antibody-induced pustular psoriasis by azathioprine. Eur J Dermatol. 22(4), 565-566, 2012
8. Sakurai K, Kabashima K.: Fixed drug eruption induced by cyclophosphamide. Eur J Dermatol. 22(3), 401-402, 2012
9. Ono S, Tanizaki H, Kabashima K.: Late onset of livedo reticularis induced by amantadine treatment concomitant with erythrocytosis. Eur J Dermatol. 22(2), 273-274, 2012

2. 学会発表

1. Kabashima K: Live imaging of T-cells attacking keratinocytes expressing non-self antigens in SJS/TEN, Drug Hypersensitivity Meeting 5, April 11th-14th, Munich, 2012.
2. Nakajima S, Kabashima K: Exploration of biomarkers in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis using a newly developed mouse model, Drug Hypersensitivity Meeting 5, April 11th-14th, Munich, 2012.
3. 谷崎英昭, 中島沙恵子, 椛島健治, 他：好酸球性肺炎を合併したZonisamideによる薬剤性過敏症候群(DIHS)の1例、第44回日本アレルギー接触皮膚炎学会、7/13-15、軽井沢、2012

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

図 1

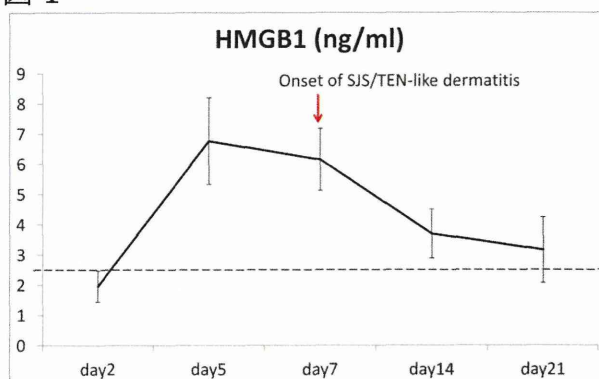
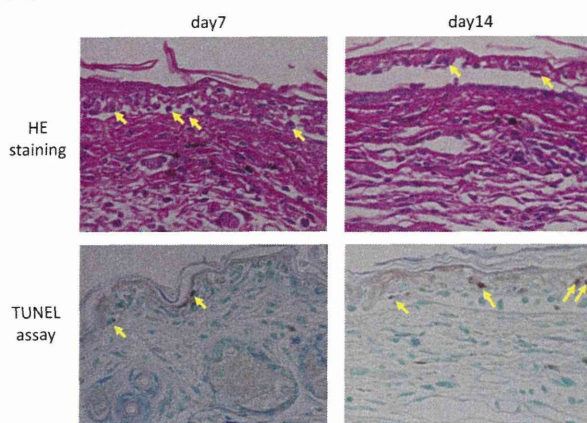


図 2



厚生労働科学研究費補助金「難治性疾患等克服研究事業
(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を用いた薬剤性過敏症症候群患者の
薬剤特異的Tリンパ球の検討

分担研究者 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 従来³H-thymidineの取り込みを検出するDLSTについて、我々は、フローサイトメトリー(FCM)を用いたDLSTで、CFSEが減弱しBrdUを取り込んだ増殖細胞を検出する研究を行ってきた。従来のDLSTではCD4あるいはCD8陽性のT細胞の分裂を検出しているが、とくにSJSの急性期ではCD8陽性T細胞が優位に増殖しており、DIHSの急性期でCD8T細胞が、回復期でCD4T細胞が分裂している症例があり、従来のDLSTが薬疹の臨床経過中に陽性となっても、検出している免疫反応は、薬疹の病期によって、全くことなる免疫反応を反映する。DIHSの回復期で検出されるDLSTにおいては薬剤特異的FOXP3陽性CD4T細胞(制御性T細胞)の割合が増加しており、薬疹患者において薬剤特異的なT細胞が誘導される現象には細胞傷害性のみならず、抑制性の免疫反応も同時に誘導される。Stevens-Johnson症候群(SJS)や薬剤性過敏症症候群(DIHS)といった重症薬疹における薬剤によるリンパ球幼若化試験(DLST)は、重症薬疹の病態におけるT細胞免疫の重要性を明らかにする上で有用である。DLSTは、薬剤特異的なT細胞の分裂を検出していること、DLSTの陽性反応は、薬疹の急性期や回復期といった病期によってCD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、制御性T細胞など、役割の異なる細胞の分裂を反映していることから、フローサイトメトリーを用いることで、原因薬剤の特定のみならず、薬疹の病態把握にも有用である。しかし、DLSTは偽陽性や偽陰性、薬剤を添加しない場合のcpmやSIの定義など、解決しなければならない問題も多い。

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(研究協力者として)

A. 研究目的

Stevens-Johnson症候群(SJS)や薬剤性過敏症症候群(DIHS)は発症が希であるため、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(引用論文1, 2)。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する方法を確立したことで、これらの重症薬疹の病態解明と、より有用な診断法の確立を目的として、薬疹患者の末梢血を用いて研究を行っている(引用論文3)。

平成21年8月から平成23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150症例の患者で、従来のDLSTが陽性となった患者のPBMCをFCMで解析した。薬疹の急性期に従来の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関連した7症例のうち2症例でCD8陽性T細胞が優位で、その他の5症例ではCD4陽性T細胞が優位であった。SJSの1症例では急性期にCD8T細胞が優位に(57%)分裂していた。DIHSの1症例では急性期にCD8T細胞が優位に(86%)、回復期でCD4T細胞が優位に(99%)分裂していた。DIHSの他の1症例では急性期にDLSTが陰性、回復期で陽性となり、CD4T細胞が優位に分裂していた。さらに別のDIHSの回復期に陽性となった1例では、分裂細胞におけるCD4+CD25+Foxp3+細胞の割合が、PHA刺激に比べ著明に増加(23%)していた。さらに、症例の蓄積を行うことで、重症薬疹の病態把握することを目的とした。

B. 研究方法

薬疹と診断した症例の急性期および回復期の末梢血単核球(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。

(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25年7月31日までの許可(承認番号08088-2)を受けた所定の説明書と同意書を用いた。

C. 研究結果

1. 播種状紅斑丘疹型 2例、多形紅斑型 3例、SJS 疑い1例、TEN 1例、DIHS 疑い 5例について、従来のDLSTとフローサイトメトリーによるDLSTを行った。
2. ラモトリギン、ゾニサミドによるDIHSの疑い各1例ずつで、従来のDLSTが陽性となったが、フローサイトメトリーでは薬剤特異的分裂細胞を特定できなかった。

D. 考察

CFSEの希釈のみでも細胞分裂をとらえられるかという点であるが、DLSTのようなわずかな細胞分裂をとらえる場合には、CFSE標識にBrdUの取り込みを組み合わせたDLSTの方がCFSE単独よりも優れていることが明らかであった。BrdUを取り込んだ細胞と、BrdUを取り込まなかった細胞のCD4、CD8陽性細胞を比較すると、かなりの差がみられる。とくにCD4、CD8ともに陰性の細胞の割合が増える。これは、薬剤特異的に分裂する細胞が、ごくわずかで、CFSEの希釈をとらえる際に、死細胞などCFSEが減弱し、非特異的な染色性の細胞の混入が無視できないためと考えられ、それらを除外する上で、BrdUの染色を組み合わせることが役立っていると考えられる。フローサイトメトリーによるDLSTは従来の方法に比べ、細胞染色の過程で細胞が徐々に失われることなどの要因も考えられるが、分裂細胞が可視化できない症例については、従来のDLSTが、何らかの原因で偽陽性となっていると考えざるをえない。抗てんかん薬であるカルバマゼピンやHIV治療薬であるアバカビルで、それぞれMHC class IであるHLA-B*15:02 HLA-B*57:01との関連が報告され、CD8陽性T細胞が認識する自己ペプチドが、HLAに結合した薬剤により、異なるペプチドに変わっていることが注目されている。薬剤特異的な制御性T細胞については、薬剤の中止のみで薬疹が軽快する際に、生体が炎症を終息させるために誘導しているとも考えられるが、これらの制御性T細胞が、その後の薬疹の発症を抑制するかは不明であり、薬剤の再投与試験において、皮疹が再現できない症例などで解析が重要と思われる。

E. 結論

DLSTはこれまで原因薬剤の特定のため活用されてきたが、決して満足いく結果を提供できている訳ではない。しかし、DLSTは、薬剤特異的なT細胞の分裂を検出している