

秀夫: 薬剤性過敏症症候群(DIHS)における血清 TARC 値の上昇とヒトヘルペスウイルス 6 との関連. 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会, 金沢, 平成 25 年 11 月 30 日.

5) 光井康博, 廣瀬千治, 宮川史, 余語章子, 飯岡弘至, 福本隆也, 小林信彦, 浅田秀夫, 浅井英樹, 岡田定規, 中村ふくみ, 宇野健司: アセトアミノフェンが原因と考えられた TEN の 1 例. 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会, 金沢, 平成 25 年 12 月 1 日.

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・助教

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。昨年度、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、重症薬疹モデルマウスとしての有用性を報告した。今年度、我々はこの Inv-mOVA マウスを Foxp3 遺伝子の制御下に hCD2 を発現する hCD2-Foxp3 マウスと交配することにより hCD2 抗体投与により Foxp3 陽性細胞を除去出来る Inv-mOVA マウスを作製し、重症薬疹における Foxp3 陽性制御性 T 細胞の果たす役割について検討を行った。

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

2005; Takahashi et al., *J Immunol*, 2009)が、その詳細な機序については未だ不明である。

そこで、我々は、重症薬疹における制御性 T 細胞の果たす役割を検討することを目的とし、昨年度作製した 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）と Foxp3 遺伝子の制御下で hCD2 を発現するノックインマウス（hCD2-Foxp3 マウス）を用いて検討を行うこととした。

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。

制御性 T 細胞は重症薬疹の病態に関与することが示唆されている(Azukizawa et al., *E J Immunol*,

B. 研究方法

重症薬疹における制御性 T 細胞の果たす役割を検討するために、Inv-mOVA マウスと hCD2-Foxp3 マウスを交配し、hCD2 抗体投与により Foxp3 陽性制御性 T 細胞を全身的に除去しうる

Inv-mOVA;hCD2-Foxp3 マウスを作製した。このマウスに OT-I マウス由来の CD8⁺T 細胞を移入し皮膚炎を誘導す

ることによりマウス重症薬疹モデルにおける制御性 T 細胞の果たす役割の検討を行った。

<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

マウス重症薬疹モデルにおける制御性 T 細胞の果たす役割を検討するために、まず、皮膚および所属リンパ節に浸潤している CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞、Foxp3 陽性制御性 T 細胞の細胞数やサブセットをフローサイトメトリーにて検討した。

Inv-mOVA マウスは、昨年度報告したとおり、OT-I マウス由来の CD8⁺T 細胞の移入後 7 日目より皮膚症状を発症し、移入後 14 日目前後まで増悪を続ける。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す。耳介皮膚では、移入後 7 日目より、CD8⁺T 細胞および Foxp3 陽性制御性 T 細胞の浸潤を認め、時間経過と共にその細胞数は増加した (図 1)。皮膚所属リンパ節においても皮膚と同様、細胞移入後 7 日目より CD4⁺ および CD8⁺T 細胞の浸潤を認め、その細胞数は時間経過と共に 14 日目まで増加し、臨床症状が治癒傾向にある 28 日目においては症状の極期と比較してこれらの細胞数は減少した (図 2)。所属リンパ節における CD4⁺細胞中の Foxp3 陽性細胞と Foxp3 陰性細胞の比を時系列で検討すると、Foxp3 陰性細胞数に対する Foxp3 陽性細胞数の比は時間経過と共に増加を認めた (図 3)。

Inv-mOVA;hCD2-Foxp3 マウスに OT-I マウス由来の CD8⁺T 細胞を経静脈的に移入したところ、Inv-mOVA マウスと同様に SJS/TEN 様の皮膚炎を誘導することが可能であった。次に、このマウスの Foxp3 陽性制御性 T 細胞を全身的に除去する目的で、hCD2 抗体を CD8⁺T 細胞移入の 1 日前、移入後 2 日目、5 日目、8 日目、11 日目、14 日目に経静脈的に投与したところ、hCD2 抗体投与群は、非投与群と比較して皮膚炎症状の著しい増悪を認めた (図 4)。

D. 考察

今回我々は、Inv-mOVA マウスと hCD2-Foxp3 レポーターマウスを交配することにより、hCD2 抗体の投与により Foxp3 陽性制御性 T 細胞を全身的に除去しうる Inv-mOVA;hCD2-Foxp3 マウスを作製した。このマウスに OT-I マウス由来の CD8⁺T 細胞を移入し、さらに hCD2 抗体投与により Foxp3 陽性制御性 T 細胞を全身的に除去すると、SJS/TEN

様皮膚炎の著しい増悪を認めた。この結果から、Foxp3 陽性制御性 T 細胞が SJS/TEN の病態に関与していることが示されたが、実際にどのようにその病態を制御しているかは不明である。次年度以降、制御性 T 細胞がどのような機序で SJS/TEN の病態に関与しているか、これらのマウスを用いて検討を行っていく予定である。

E. 結論

Inv-mOVA マウスと hCD2-Foxp3 レポーターマウスの交配により、全身的に Foxp3 陽性制御性 T 細胞を除去しうるマウス重症薬疹モデルを作製した。Foxp3 陽性制御性 T 細胞除去によりマウス SJS/TEN 様皮膚炎は増悪した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiraishi N, Nomura T, **Tanizaki H**, Nakajima S, Narumiya S, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K: Prostaglandin E2-EP3 axis in fine-tuning excessive skin inflammation by restricting dendritic cell functions. PLoS One. Jul 29;8(7):e69599, 2013
- 2) Iga N, **Tanizaki H**, Endo Y, Egawa G, Fujisawa A, Tanioka M, Miyachi Y, Kabashima K: Hydrolyzed wheat protein-containing facial soap-induced wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis in a

patient without filaggrin mutations. J Dermatol. Jun;40(6):494-5, 2013.

- 3) Ono S, Nakajima S, Otsuka A, Miyachi Y, Kabashima K: Pigmented purpuric dermatitis with high expression levels of serum TARC/CCL17 and epidermal TSLP. Eur J Dermatol. Oct 1;23(5):701-2, 2013

- 4) Otsuka A, Nakajima S, Kubo M, Egawa G, Honda T, Kitoh A, Nomura T, Hanakawa S, Sagita Moniaga C, Kim B, Matsuoka S, Watanabe T, Miyachi Y, Kabashima K: Basophils are required for the induction of Th2 immunity to haptens and peptide antigens. Nat Commun ; 4:1739, 2013

2. 学会発表

- 1) Kabashima K: “Visualization of cutaneous immune responses to hapten using two photon microscope”, 8th International Congress on Cutaneous Adverse Drug Reactions, Nov16-17, Taipei, Taiwan
- 2) Nakajima S: “T cells in Stevens Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis”, 8th International Congress on Cutaneous Adverse Drug Reactions, Nov16-17, Taipei, Taiwan

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 皮膚に浸潤する CD8 陽性(左) および Foxp3 陽性制御性 T 細胞数 (右)

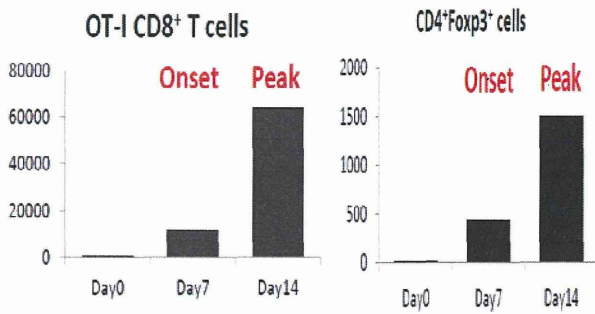


図2 所属リンパ節に浸潤する CD8 陽性および CD4 陽性 T 細胞数

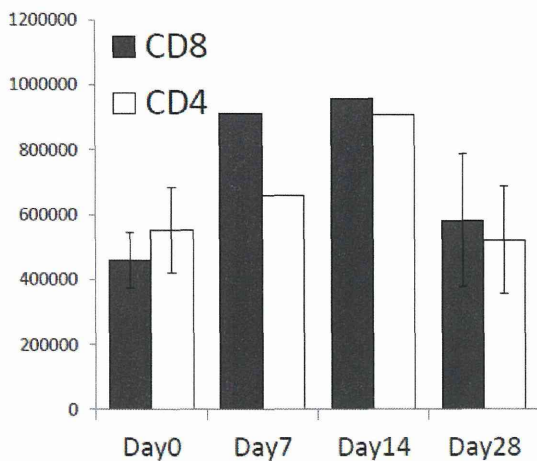


図3 所属リンパ節内 CD4 陽性細胞中の Foxp3 陽性細胞数と Foxp3 陰性細胞数の比

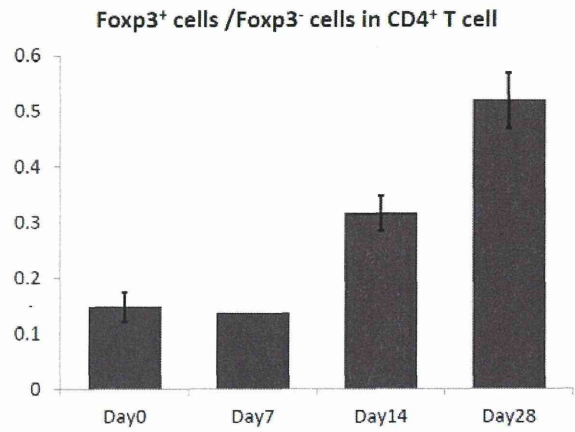
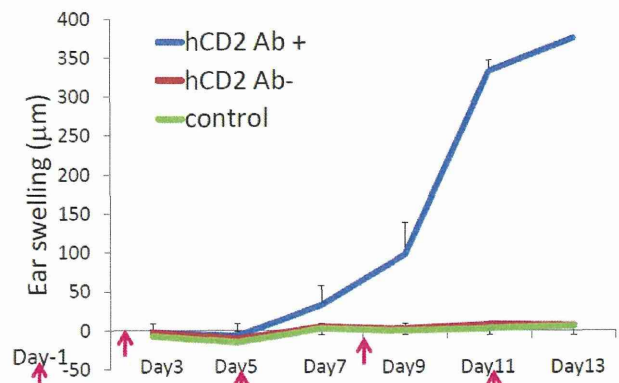


図4 Foxp3 陽性制御性 T 細胞除去による皮膚炎の増悪 (赤矢印: hCD2 抗体投与、青実線: hCD2 抗体投与群、赤実線: hCD2 抗体非投与群、緑実線: コントロール群)



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

重症薬疹患者の急性期と回復期における血清サイトカインの検討

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

Stevens-Johnson 症候群(SJS)、中毒性表皮壊死症(TEN)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。我々はこれまで、DLST を行う際に血清を保存してきた。今回その保存血清を用いて、TEN 3 例、DIHS 3 例のそれぞれの急性期、回復期についてサイトカインの解析を行った。薬疹におけるサイトカインは、T 細胞由来のみに限らず、B 細胞や他の免疫細胞が産生するものも重要であると考えられる。

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群(SJS)、中毒性表皮壊死症(TEN)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きた(引用論文3)。今回我々はその際に保存した血清を用いて、Multiplex Assay により、各血清あたり 30 種類のサイトカインの測定を行った。

B. 研究方法

TEN 3 例、DIHS 3 例それぞれの急性期、回復期と健常人4名の凍結血清を用いて Meso Scale Discovery (MSD) 社の Multiplex assay (Electrochemiluminescence; ECL)で測定を行った。測定したのは、以下の項目である。IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF- α , GM-CSF, IL-1 α , IL-5, IL-7, IL-12/IL-23p40, IL-15, IL-16, IL-17A, TNF- β , VEGF, Eotaxin, Eotaxin-3, IL-8 (HA), IP-10, MCP-1, MCP-4, MDC, MIP-1 α , MIP-1 β , TARC。

<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 28 年 7 月 31 日までの許可(承認番号 08088-4)を受けた所定の説明書と同意書を用いた。

C. 研究結果

TEN 3 例 急性期、回復期（2週間後）（うち 1 例は急性期のみ）を凍結保存した。

DIHS 3 例についても急性期、回復期の血清を凍結保存した。

現在、これらの凍結血清を用いて Multiplex assay を行っており、結果を解析中である。

D. 考察

重症薬疹は、主にHLAに結合した薬剤によりCD8陽性T細胞が活性化することで、表皮障害が引き起こされると考えられており、T細胞が産生するサイトカインは重要である。薬疹におけるT細胞はIFN- γ をはじめとした、Tヘルパー-type1 (Th1) のサイトカインと、IL-5などのTh2サイトカインの両方が関与していると考えられる。一方で、DIHSでは、ヒトヘルペスウイルス6型 (HHV-6) をはじめとして、ヘルペスウイルスの再活性化が

おこることが知られている。また、DIHSの急性期では、IgGの低下がみられることがあり、B細胞免疫の異常がおこっていると考えられる。さらにDIHSでは、発症後1年程度の間、自己免疫性甲状腺炎や膠原病といった自己抗体が関連する自己免疫疾患の発症がみられることから、B細胞免疫異常が長期にわたって関連することが明らかである。最近ではIL-10産生性B細胞が、制御性B細胞として自己免疫疾患に関わっていることが知られてきた。

E. 結論

薬疹の病態において、T細胞の役割について検討をおこなってきたが、サイトカインの解析から、B細胞をはじめとした、他の免疫細胞の役割について、検討することができ、今後同時期に保存した血球の細胞分画をフローサイトメトリーで解析することで、血清中サイトカインの意義を検討することで病態解明につなげたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 小豆澤宏明:【重症薬疹の診断と治療】薬疹におけるリンパ球刺激試験でとらえる薬剤特異的T細胞. 臨床免疫・アレルギー科 59巻4号, 438-444.

2) 小豆澤宏明: 【薬疹を診る-注意点とその対応】
最近の薬疹 注意すべき薬剤とその臨床症状. 日
本医師会雑誌 142巻3号, 503-507.

3) Nakajima K, Terao M, Takaishi M, Kataoka S,
Goto-Inoue N, Setou M, Horie K, Sakamoto F, Ito M,
Azukizawa H, Kitaba S, Murota H, Itami S, Katayama
I, Takeda J, Sano S: Barrier abnormality due to
ceramide deficiency leads to psoriasiform
inflammation in a mouse model. *J Invest Dermatol.*
2013 Nov;133(11):2555-65.

4) Hirobe S, **Azukizawa H**, Matsuo K, Zhai Y, Quan
YS, Kamiyama F, Suzuki H, Katayama I, Okada N,
Nakagawa S: Development and clinical study of a
self-dissolving microneedle patch for transcutaneous
immunization device. *Pharm Res.* 2013
Oct;30(10):2664-74.

2. 学会発表

1) 井上知子, 花房崇明, 小豆澤宏明, 横見明典,
片山一期: 抗TNF- α 阻害薬投与後に発症した、
thymoma non-associated multiorgan autoimmunityの
一例. 第112回日本皮膚科学会総会, 横浜, 平成25
年6月14日~16日

2) Azukizawa H: A case of TEN induced by aspirine
World SCAR joint meeting Keelung Chang Gung
Memorial Hospital, Taiwan, November 15th 2013.

3) Azukizawa H: Utility of Lymphocyte
transformation test demonstrated by flow cytometry.
The 8th International Congress of Cutaneous Adverse
Reactions. Chang Gung University, Taiwan,
November 16-17th 2013.

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

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.

3) Hanafusa T, **Azukizawa H**, Matsumura S,
Katayama I: The predominant drug-specific T-cell
population may switch from cytotoxic T cells to
regulatory T cells during the course of
anticonvulsant-induced Hanafusa T, Azukizawa H,
Matsumura S, Katayama I. hypersensitivity. *J.*
Dermatol. Sci., 2012 Mar;65(3):213-9.

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

重症薬疹の発症メカニズムにおける CD4 陽性細胞の意義

分担研究者 橋爪秀夫
市立島田市民病院皮膚科・主任部長

研究要旨

Stevens-Johnson 症候群/中毒性表皮壊死症(SJS/TEN)と薬剤性過敏症症候群 (DIHS) は、ともに重症薬疹ではあるが、皮疹や臨床像の違いから、異なるスペクトラムの疾患と考えられている。両者ともに細胞傷害性 CD8 陽性細胞および CD4 陽性細胞の浸潤を特徴としているが、前者についての詳細な検討に比べ、後者の細胞における検討は少なかった。今回、SJS/TEN には IL-17 産生 CD4 陽性細胞(Th17 細胞)が優位に浸潤しているのに対し、DIHS には制御性 CD4 陽性細胞が優位に浸潤していることが明らかになった。両細胞の起源は同一であり、サイトカイン環境によって分化が決定されることから、重症薬疹の臨床型決定因子として、サイトカイン環境が重要であることが示唆された。

B. 研究方法

研究協力者：藤山俊晴
松医科大学皮膚科・助教

検討に供した症例は 2006 年～2013 年浜松医科大学皮膚科および市立島田市民病院において加療した患者 (SJS 患者 4 名、TEN 患者 2 名、DIHS 患者 10 名) およびコントロールとして用いた金属アレルギー患者(2 名)の皮疹より我々が以前確立した方法(Hashizume et al. Acta Dermato-Venereol 2010)を用いて浸潤 T 細胞を採取し増幅したもの、およびそれから樹立した薬剤特異的 T 細胞クローンのフェノタイプおよび産生サイトカインを検索して比較し、重症薬疹の皮疹における疾患特異的 CD4 陽性細胞の特性を明らかにした。

A. 研究目的

重症薬疹である Stevens-Johnson 症候群・中毒性表皮壊死症(SJS/TEN)の疾患メカニズムを明らかにするため、免疫学的手法を用いて、特に未だに詳細な検討が行われていない CD4 陽性細胞の特性を明らかにすることを目的とした。

<倫理面への配慮>

薬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および皮膚生検組織を本研究に供した。その際、「皮膚および筋病変部皮膚浸潤 T 細胞の解析」という研究課題名で浜松医科大学医の倫理審査委員会より許可(承認番号 20-157)を受けた所定の説明書と同意書を用いた。

C. 研究結果

SJS/TEN の皮膚浸潤 T 細胞の CD4 細胞/CD8 細胞比は DIHS に比して有意に低下していた(図 1)。一方、CD4 陽性細胞のフェノタイプを検索すると、CD25 陽性 CD127 陰性の制御性 CD4 陽性細胞の割合は、DIHS が SJS/TEN に比べて有意に高く(図 2)、また CD25 陽性 Foxp3 陽性細胞の割合も DIHS の方が SJS/TEN より有意に高かった。これら CD4 陽性細胞の PMA 刺激後産生サイトカインを調べると、SJS/TEN の方が DIHS に比べて有意に IL-17 産生する割合が多かった(図 3 左)。

図 1 CD4/CD8 比

Percentage of CD4+CD25+CD127- cells in CD4+ T cells

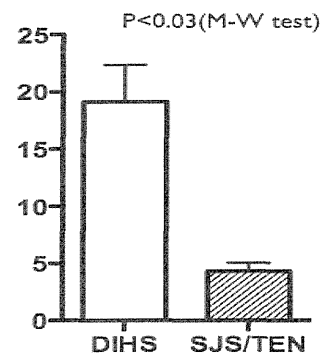


図 2 CD4 陽性細胞の Treg (%)

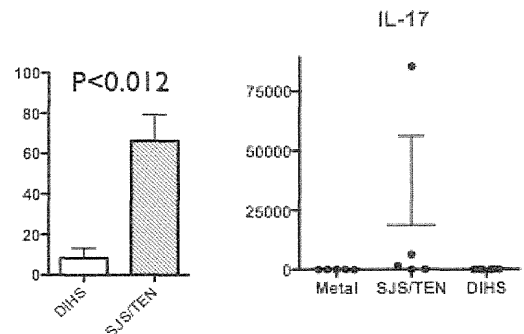
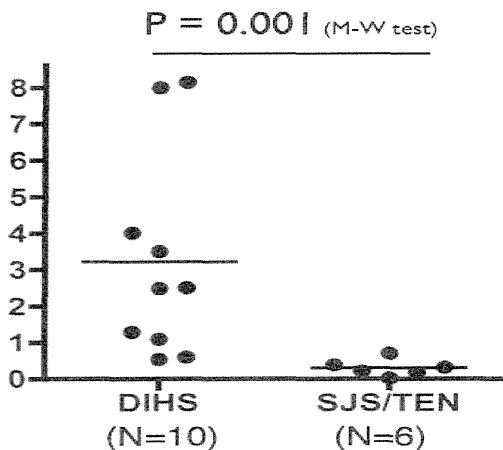


図 3 浸潤 CD4 細胞における IL-17 産生率(%) (左) と樹立した薬剤反応性 CD4 陽性細胞の IL-17 産生量 (pg/ml) (右)

皮疹部皮膚においても CD4 陽性 IL-17 陽性細胞は SJS/TEN には DIHS より多く認められた。この CD4 陽性細胞が薬剤特異的に出現したかを検証するため、皮疹部浸潤リンパ球から薬剤特異的 CD4 陽性細胞を樹立して検討した。その結果 SJS/TEN においては多量の IL-17 を産生する細胞が多くみられたが、DIHS においてはみられなかった(図 3 右)。したがって、IL-17 産生 CD4 陽性細胞は二次的に出現したものではなく、薬剤依存性に誘導された細胞であることが確認された。さらにこれらのクローンでは細胞傷害性分子として知られる granulysin を発現するものがあることが判明した。

D. 考察

炎症抑制に働く制御性 CD4 陽性細胞(Treg)と逆に促進する IL-17 産生 CD4 陽性細胞(Th17)は、機能的に対称的であるが同一の細胞を起源とし、周囲のサイトカイン環境にその分化が依存することが知られている。SJS/TEN と DIHS の皮疹部に浸潤する細胞傷害性 CD8 陽性細胞数には大差はみられないが、前者に強い表皮細胞障害がみられるのに対し、後者にあまり強い表皮細胞障害がみられないのは、CD4 陽性細胞の質的違いによる可能性がある。本結果は、それを裏付けるものである。すなわち、SJS/TEN においては炎症を促進するような Th17 が優位であるのに対し、DIHS では Treg が優位であった。しかも誘導された Th17 は薬剤特異的であることが示唆され、薬剤感作時の個体のサイトカイン環境が病態形成に関わると考えられる。残念ながら Treg はクローンとして樹立が難しいため、薬剤の反応性に対してははっきり検証する

ことができなかったが、皮膚浸潤 Treg は誘導型の形質を示したことから、DIHS に関与する Treg も薬剤感作時に誘導されたものである可能性が高いと推測される。

E. 結論

薬剤感作時の個体のサイトカイン環境が重症薬疹の臨床型の決定因子となる可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiyama T, Kawakami C, Sugita K, Kubo-Kabashima R, Sawada Y, Hino R, Nakamura M, Shimauchi T, Ito T, Kabashima K, **Hashizume H**, Tokura Y: Increased frequencies of Th17 cells in drug eruptions. J Dermatol Sci. [in press]
- 2) **Hashizume H**, Umayahara T, Hata M: Acquired hemophilia eclipsed by psoriatic arthralgia. J Dermatol. 40:1070-1071, 2013.
- 3) Hashizume H, Hata M: Deep venous thrombosis associated with cytomegalovirus reactivation in drug-induced hypersensitivity syndrome. J Eur Acad Dermatol Venereol. 27:658-659, 2013
- 4) **Hashizume H**, Fujiyama T, Kanebayashi J, Kito Y, Hata M, Yagi H: Skin recruitment of monomyeloid precursors involves human herpesvirus-6 reactivation

in drug allergy. Allergy. 68:681-689, 2013.

5) 橋爪秀夫: 【重症薬疹の診断と治療】重症薬疹の発症機序. 臨床免疫・アレルギー科. 2013;59巻(4号):461-470.

6) 橋爪秀夫: 薬疹のデータベースの現状. 日本医師会雑誌. 142(3):492, 2013.

2. 書籍

1) 橋爪秀夫: 薬疹・中毒疹 pp187-196皮膚疾患トップ20攻略本 古川福実編. 南江堂 東京.

2) 橋爪秀夫: 薬疹 pp1041-1042 2013今日の治療指針 山口徹, 北原光夫, 福井次矢 編. 医学書院 東京.

3. 学会発表

1) 橋爪秀夫: アトピー性皮膚炎の発症因子と発症予防-皮膚科医はこう考える! 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 教育セミナー2. 横浜, 平成25年5月11日.

2) 橋爪秀夫: 怖い薬疹と怖くない薬疹. 静岡県薬剤師会新人研修会. 静岡, 平成25年8月24日.

3) 橋爪秀夫: 馬屋原孝恒. グラニューライシン値測定による肝炎による3剤併用療法における重症薬疹の予見. 厚生労働省科学研究費補助金「難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業): 重症多形滲出性紅斑に関する調査研究(H22-難治-一般-003)」東京, 平成25年第一回班会議. 平成25年8月13日.

4) 橋爪秀夫. 馬屋原孝恒. 保存的治療のみで救命し得た高齢者壊死性筋膜炎の一例. 第106回静岡県皮膚科地方会. 浜松, 平成25年7月13日

5) Hashizume H: Th17 and Treg in the pathogenesis of severe cutaneous adverse reactions. 8th cutaneous adverse reaction meeting. 11/27. Taipei.

6) 橋爪秀夫: 薬剤データベースの進捗状況 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会, 金沢, 平成25年12月1日.

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

好塩基球活性化試験および薬剤リンパ球刺激試験による C 型肝炎 3 剤併用療法で生じた薬疹の検討

分担研究者 永尾圭介
慶應義塾大学医学部皮膚科・専任講師

研究要旨

慢性 C 型肝炎に対する新規薬剤療法として近年認可されたテラプレビル、ペグインターフェロン α -2b、リバビリンの 3 剤併用療法は高いウイルス除去率を示す一方で、Stevens-Johnson 症候群といった重症薬疹を含めた薬疹が高頻度に生じる点が問題となっている。我々は、慶應義塾大学病院で新規に同療法を開始する患者を対象に、薬剤投与前から発疹出現後まで、前向き試験として薬剤リンパ球刺激試験(DLST)と好塩基球活性化試験(BAT)を施行し検討を行った。その結果、本療法により生じる発疹には比較的早期に生じるより軽症な発疹と、比較的後期に生じるより重篤な発疹の二種類に大別できる傾向がある事が分かり、後期に発疹を出現した患者では BAT が陽性になりやすい傾向を認めた。さらに投与前に DLST あるいは BAT が陽性になった患者の全例で治療中に発疹を生じることがわかり、投与前検査により、薬疹発症を予測できる可能性が考えられた。

研究協力者：高橋勇人
慶應義塾大学医学部皮膚科学教室・助教
研究協力者：足立剛也
慶應義塾大学医学部皮膚科学教室・助教

A. 研究目的

慢性 C 型肝炎に対する新規薬剤療法として近年認可されたテラプレビル、ペグインターフェロン α -2b、リバビリンの 3 剤併用療法は高いウイルス除去率を示す一方で、重症薬疹の一型である Stevens-Johnson 症候群を含めた薬疹が高頻度に生じる点が問題となっている。しかしながら、過去の報告では DLST が陽性となる症例がなく、生じた発疹が薬剤によるものである、という科学的根拠が乏しい状況にあった。一方、我々は以前に BAT が DLST と異なるタイプの薬剤に対する生体の反

応を検出する *ex vivo* の方法として有用であることを報告している。そこで、同療法開始前および発疹出現後に BAT と DLST の両方を用いて、患者末梢血の薬剤に対する反応を検出することを試み、BAT の有用性および同療法により生じる発疹の病態機序について明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

検討に供した症例は 2011 年～2012 年に慶應義塾大学病院消化器内科において慢性 C 型肝炎に対する 3 剤併用療法を行った患者 14 名である。投与前開始前および発疹出現時にテラプレビル、ペグインターフェロン α -2b、リバビリンの 3 剤に対する

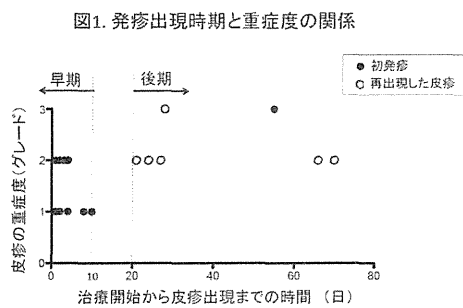
DLST および BAT24 時間接触法を施行し、結果を検討した。

<倫理面への配慮>

本研究の実施にあたって、当該研究内容は慶応義塾大学医学部倫理委員会において「C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法における治療効果の検討」（承認番号：20100262）および「アレルギー性皮膚・粘膜疾患の病態解明」（承認番号 20110133）という研究課題で承認されている。全ての検体は研究プロトコールにのっとり、患者の同意を書面で得た上で採取・収集した。

C. 研究結果

発疹が出現した患者の、投与開始から発疹出現までの期間とそのグレードの関係は図1の通りであった。



治療開始 10 日以内 (早期) の発疹は軽症であり、20 日以降 (後期) の発疹は比較的重症のものも含まれていた。早期に発疹がでた 8 例のうち 6 例は一度発疹が消退後、再度後期に発疹が出現した。

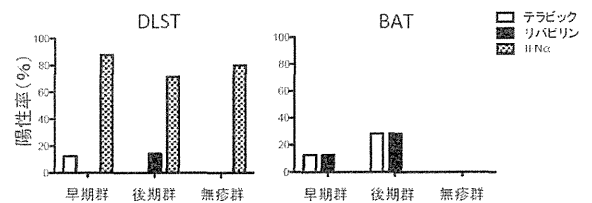
これをもとに、全対象者の内訳は表 1 のとおりとなった。

表1. 対象患者の内訳

	早期群	後期群	無疹群
皮疹出現 / 再出現	10日以内	20日以降	
症例数 (男/女)	8 (4/4)	7 (6/1)	5 (5/0)
年齢 (平均)	58~64(61.1)	32~69(56.0)	34~68(56.2)

治療開始前に施行した DLTS と BAT の各群における陽性率を図 2 に示す。

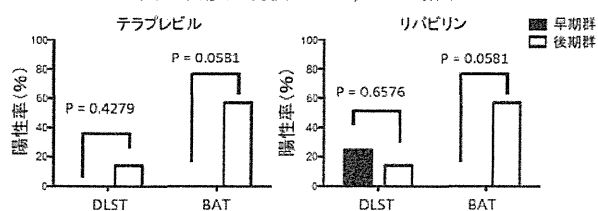
図2. 投薬前検査の結果



テラプレビルおよびリバビリンに対する DLST と BAT は早期群、後期群ともに少数の陽性反応を認めた。一方、無疹群においては全てが陰性であり、この結果から投与前にテラプレビルあるいはリバビリンに対して DLST あるいは BAT が陽性となった症例は必ず発疹が出現する事が明らかになった。

一方、実際に発疹が出た症例について、発疹出現後のテラプレビルとリバビリンに対する DLST および BAT の結果を図 3 に示す。

図3. 皮疹出現後のDLST/BATの結果



DLST についてはテラプレビルおよびリバピリンに対して少数ながら陽性となる症例があったが、BAT については早期群と比較して後期群で陽性率が高い傾向がみられた。

D. 考察

慢性 C 型肝炎に対するテラプレビルを含む 3 剤併用療法では高頻度で薬疹が生じるが、従来から用いられてきた原因薬剤の同定法である DLST では 3 剤に対する陽性率が非常に低かった。今回の研究でも発疹が出現した早期、後期両群において DLST が陽性になった症例はわずかであった。一方、BAT に関しては、とくに臨床的により重症となりやすい後期群において BAT の陽性率が高かった。この点は、テラプレビルを含む 3 剤併用療法においては、原因薬剤の同定方法として BAT が DLST よりも優れている可能性を示唆する。また過去に我々が報告してきたように、BAT と DLST の組み合わせにより、被疑薬の検出率が高まるといった結果とも合致する所見であった。薬疹における原因薬剤同定方法としての BAT の有効性は今後も様々な施設で検討されることが望まれる。

今回の研究における最大の特徴は薬剤投与前の症例に対して、あらかじめ投与予定の薬剤に対する反応性を DLST と BAT で検討した点である。過

去に本研究のような前向き試験の報告はない。本研究の結果によると、投与前にすでに DLST あるいは BAT のいずれかで陽性になった症例では、薬剤投与後に発疹が出現する傾向を認めた。この結果は、投与前に発疹出現を予測できることを意味する。今後も様々な薬剤が開発されていく中で、テラプレビルを含む 3 剤併用療法のように高頻度に薬疹を生じるが極めて高い薬効を望める薬剤が出てくる可能性がある。その場合、本研究で施行した投与前の DLST および BAT での検索が国民の薬害回避に極めて有効な手段となりえる可能性がある。

E. 結論

慢性 C 型肝炎に対するテラプレビルを含む 3 剤併用療法で生じる薬疹の原因被疑薬同定に BAT が有効であった。また薬剤投与前の 3 剤に対する DLST と BAT での検討により、発疹出現が予測でき、より効果的に重篤な副作用を回避できる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe-okada E, **Nagao K**, Takahashi H, Amagai M, Manabu OHYAMA: Immune response involving the bulge region besides telogen conversion contribute

to hair loss in a case of atypical drug-induced hypersensitivity syndrome. Journal of Dermatology [In press]

2. 学会発表

1) 足立剛也, 高橋勇人, 平井博之, 橋口明彦, 永尾圭介: C型肝炎3剤併用療法中に生じた皮疹発症前後におけるDLST/BATの検討. 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会, 金沢, 2013.11

1) 岡田絵美子, 高橋勇人, 永尾圭介, 谷川瑛子, 天谷雅行, 大山学: 薬剤性過敏症症候群に認めた脱毛の1例. 第29回日本臨床皮膚科医会総会, 名古屋, 平成25年4月.

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

重症薬疹の予後の解析

分担研究者 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

重症薬疹（中毒性表皮壊死症：TEN、Stevens-Johnson 症候群：SJS）は時に致死性の疾患であり、高率に眼障害などの重篤な後遺症を残す。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。

重症薬疹発症における重要な現象の表皮細胞死の発生メカニズムについて、これまでアポトーシスによる細胞死であると考えられてきた。しかし最近我々は本症発症における表皮細胞死はアポトーシス以外のメカニズムによって生じることを明らかにした。

A. 研究目的

重症薬疹（中毒性表皮壊死症：TEN、Stevens-Johnson 症候群：SJS）は時に致死性の疾患であり、高率に眼障害などの重篤な後遺症を残す。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。

重症薬疹発症における重要な現象の表皮細胞死の発生メカニズムについて、これまでアポトーシスによる細胞死であると考えられてきた。しかしその詳細は未だ不明な点が多い。

本研究課題において、病態発症のメカニズムを解明し、新規の早期診断および治療法の開発に結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

これまでの重症薬疹発症機序に対する研究で

は、薬剤特異的 cytotoxic T cell が表皮細胞死を誘導することから、重症薬疹で引き起こされる表皮細胞死は apoptosis であるとされてきた。しかし、実際の患者由来表皮細胞を用いた検討はほとんどみられない。本研究課題において、重症薬疹患者からの培養表皮細胞に、同患者の末梢血単核球 (PBMC) を原因薬剤で刺激した培養の上清を添加することで、表皮細胞死が生じるか観察する。同様に通常薬疹患者の培養表皮細胞、PBMC においても検討する。原因薬剤で刺激された重症薬疹患者 PBMC の培養上清が、重症薬疹患者のみならず、健常人由来表皮細胞の細胞死を誘導するならば、重症薬疹患者 PBMC の培養上清中に細胞死を誘導する液性因子が含まれていることを示唆する。一方重症薬疹患者由来表皮細胞は、重症薬疹患者 PBMC の培養上清のみならず、通常薬疹患者 PBMC 培養上清添加にても細胞死を誘導されるのであれば、重症薬疹患者表皮細胞に細胞死感受性の高い特徴があることが示唆される。

<倫理面への配慮>

本研究の実施にあたっては、試料提供者に危害を加える可能性は皆無であるが、研究の目的と概要を詳細に説明し、北海道大学医学研究科医の倫理委員会にて承認を得た。試料提供者からは本委員会で検討、承認された説明文書に準じて、同意を得た上で試料を採取・収集した。

C. 研究結果

表皮細胞は重症薬疹患者 (SJS) または健常人から採取し培養した。培養上清は SJS および通常薬疹 PBMC から得て、それぞれの組み合わせで添加し、細胞死を観察した (右図)。SJS 表皮細胞は SJS-PBMC 培養上清添加にて細胞死が誘導された。しかし予想に反して健常人表皮細胞は SJS-PBMC 培養上清添加にて細胞死は誘導されなかった。さらに SJS 表皮細胞は通常薬疹 PBMC 培養上清添加では細胞死は誘導されなかった。以上の結果から重症薬疹の表皮細胞死には、PBMC から産生される液性因子と、表皮細胞の細胞死感受性がいずれも不可欠であると考えられる。

さらに、重症薬疹 PBMC および通常薬疹 PBMC の培養上清を質量分析にて比較し、細胞死誘導液性因子の同定に成功した。

この候補因子は重症薬疹 PBMC の培養上清中に著明に含まれていた。さらにこの候補因子の受容体は重症薬疹患者の表皮細胞にのみ発現が誘導された。

一方培養上清による誘導される表皮細胞死は形態的にネクロシスの像をとり、細胞死誘導はプログラムされたネクロシス (ネクロプトーシス) に特異的な細胞内シグナルを介していた。

D. 考察

本研究の成果から、重症薬疹における表皮細胞死はネクロプトーシスにより起こることを明らかにした。表皮細胞死において疾患特異的な現象が起こることはこれまで全く報告もなく、極めて画期的知見である。この細胞死の詳細なメカニズムを解明できれば、発症誘導する遺伝的背景の存在が予想されることから発症予見因子を明らかにすることも期待できる。さらに細胞死の機序の一部を阻害することで新規治療法の開発が可能になる。

E. 結論

新規に開発した重症薬疹モデルマウスは様々な病態解析に加え、治療研究などに用いることもでき、臨床への応用が期待できる。

重症薬疹における新規の細胞のメカニズムは、重症薬疹特異的治療法の開発に直接結び付くと期待される。さらに重症薬疹 j の発症因子としても応用できることが予想される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Saito N, Yoshioka N, **Abe R**, Qiao H, Fujita Y,

Hoshina D, Suto A, Kase S, Kitaichi N, Ozaki M, Shimizu H: Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis mouse model generated by using PBMCs and the skin of patients. *J Allergy Clin Immunol* 131:434-441. 2013.

2) Yoshioka N, Suto A, **Abe R**, Saito N, Murata J, Hayashi-Ujiiie I, Hoshina D, Fujita Y, Shimizu H: Disturbed balance in three subpopulations of CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis patients. *Clin Immunol* 148:89-91. 2013.

2. 学会発表

1) **Abe R**: Mechanism of keratinocyte death in SJS/TEN. The 8th International Cutaneous ADR Congress, Taipei, Taiwan 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

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(DIHS)の全国疫学調査

分担研究者 黒沢美智子
順天堂大学医学部衛生学・准教授

研究要旨

わが国における薬剤性過敏症症候群(DIHS: Drug-induced hypersensitivity syndrome)の患者数と臨床疫学像を明らかにするために平成 25 (2013)年に全国疫学調査を実施した。全国疫学調査は患者数を推計する一次調査と臨床疫学像を調査する二次調査からなる。全国疫学調査一次調査の対象施設は全国の病院から病床数別に無作為抽出された病院と全大学病院の皮膚科、特別階層を加えた 1,022 科である。対象は 2012 年 1 月 1 日～2012 年 12 月 31 日の 1 年間に当該疾患で受療した患者とした。一次調査で患者ありと回答のあった施設を対象に二次調査を行った。一次調査の回収数は 662 例、回収率は 64.8%と良好であった。二次調査で重複、対象期間外、診断基準を満たさない不適格率を確認し、それらを考慮した上で患者数を推計した。2012 年に薬剤性過敏症症候群(DIHS)で全国の病院を受療した患者数は典型 DIHS が 220 人(95%信頼区間 160～280 人)、人口 100 万対 1.73(1.25～2.20)、非典型 DIHS が 360 人(95%信頼区間 275～450 人)、人口 100 万対 2.82(2.12～3.53)と推計された。二次調査票は 239 例 (一次調査報告数の 70.7%)回収され、222 例を分析対象とした。二次調査では DIHS の被疑薬、原疾患、既往歴、合併症、治療、転帰、死因、後遺症などを調査した。被疑薬は典型、非典型ともに抗てんかん薬が最も多かったが、それ以外の報告もあった。また DIHS の治療法や合併症、後遺症の内容、死亡例の死因について確認することができた。二次調査の分析は継続中で、今後、既往歴、原疾患、被疑薬の関連や治療法とその効果、転帰、後遺症についての詳細な分析を予定している。また、後遺症については本調査をベースに追跡調査の必要性が確認された。

共同研究者：狩野葉子

杏林大学医学部皮膚科学・教授

共同研究者：塩原哲夫

杏林大学医学部皮膚科学・教授

共同研究者：福島若葉

大阪市大大学院医学研究科公衆衛生学・准教授

共同研究者：廣田良夫

大阪市大大学院医学研究科公衆衛生学・教授

A. 研究目的

重症多形性滲出性紅斑(急性期)の代表的な疾患であるスティーブンス・ジョンソン症候群(SJS: Stevens-Johnson syndrome)、中毒性表皮壊死症(TEN: Toxic Epidermal Necrolysis)、薬剤性過敏症症候群(DIHS: Drug-induced hypersensitivity syndrome)のうち、SJS と TEN は平成 20 年 10 月に厚労省難治性疾患克服研究事業治療研究対象疾患となったが、DIHS はまだ対象となっていない。DIHS の大