

graft-versus-host disease. *Br J Dermatol* 2006; 155: 301–306.

6 Kano Y, Sakuma K, Shiohara T. Sclerodermoid graft-versus-host disease-like lesions occurring after drug-

induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol* 2007; 156: 1061–1063.

and texture of scars in the setting of Mohs complex closures 2 to 3 months after surgery. To our knowledge, this is the first time that this has been demonstrated with a fractional ablative laser or in a prospective study. It is also the first time that this has been demonstrated on nonfacial sites, as shown in the Figure.

Nine of the 10 subjects elected to have treatment of the control side with the laser at follow-up. It is a limitation that both sides of the scar were ultimately treated, which prevents longer-term evaluation.

We have used this method to achieve minimal scarring on face-lift incision lines with excellent results. This work could potentially change the current approach in all surgical disciplines if these results can be validated with a long-term (6-12 months) multicenter study.

David M. Ozog, MD
Ronald L. Moy, MD

Accepted for Publication: March 18, 2011.

Author Affiliations: Division of Mohs and Dermatological Surgery, Department of Dermatology, Henry Ford Hospital, Detroit, Michigan (Dr Ozog); and Moy-Fincher Medical Group, Beverly Hills, and David Geffen School of Medicine at University of California, Los Angeles (Dr Moy).

Correspondence: Dr Ozog, Division of Mohs and Dermatological Surgery, Department of Dermatology, Henry Ford Hospital, 3031 W Grand Blvd, Ste 800, Detroit, MI (dozog1@hfhs.org).

Author Contributions: *Study concept and design:* Ozog and Moy. *Acquisition of data:* Ozog. *Analysis and interpretation of data:* Ozog. *Drafting of the manuscript:* Ozog. *Critical revision of the manuscript for important intellectual content:* Ozog and Moy. *Study supervision:* Ozog and Moy.

Financial Disclosure: Dr Moy has filed a patent application for the process described herein.

Funding/Support: Financial support was provided by Moy-Fincher Medical Group.

Previous Presentations: Preliminary data from this study was presented at the American Academy of Cosmetic Surgery meeting; January 31, 2010; Orlando, Florida; and at the American Society for Dermatological Surgery meeting; October 22, 2010; Chicago, Illinois.

Additional Contributions: Lisa K. Chipps, MD, and Edgar Fincher, MD, PhD, evaluated and rated the patient posttreatment photographs. Gordon Jacobsen, MS, provided statistical analysis.

- Katz BE, Oca AG. A controlled study of the effectiveness of spot dermabrasion (scarabrasion) on the appearance of surgical scars. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24(3):462-466.
- Strauss JS, Kligman AM. Observations on dermabrasion. *Arch Dermatol.* 1956;74(4):397-403.
- Caver CV. Versatile dermabrasion. *J Dermatol Surg Oncol.* 1980;6(8):665-667.
- Greenbaum SS, Rubin MG. Surgical pearl: the high-energy pulsed carbon dioxide laser for immediate scar resurfacing. *J Am Acad Dermatol.* 1999;40(6, pt 1):988-990.
- Rohrer TE, Ugent SJ. Evaluating the efficacy of using a short-pulsed erbium: YAG laser for intraoperative resurfacing of surgical wounds. *Lasers Surg Med.* 2002;30(2):101-105.
- Weiss ET, Chapas A, Brightman L, et al. Successful treatment of atrophic postoperative and traumatic scarring with carbon dioxide ablative fractional resurfacing: quantitative volumetric scar improvement. *Arch Dermatol.* 2010;146(2):133-140.

High-Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) as a Novel Diagnostic Tool for Toxic Epidermal Necrolysis and Stevens-Johnson Syndrome

Stevens-Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN) are rare but potentially life-threatening adverse drug reactions characterized by epidermal necrosis.¹ Skin manifestations of SJS and TEN at the early stage can be similar to those of other ordinal drug eruptions like erythema exudativum multiforme (EM) and morbilliform drug eruptions, which sometimes makes early diagnosis difficult.

Table. Clinical Data of Patients

Clinical Entity, Patient No./Sex/Age, y	Suspected Causal Drug(s)	Area of Blistering and Detachment, % ^a	Day Blood Drawn
SJS, 1/M/22	NSAIDs	2	10, 13
SJS, 2/F/39	Tranexamic acid	42	8, 24
SJS, 3/F/56	Docetaxel	30	5
TEN, 1/F/71	Antibiotics	100	30
TEN, 2/F/50	Allopurinol	90	1, 4, 11, 20, 25
SJS, 4/M/21	Antibiotics	34	1, 6, 18
SJS, 5/F/50	Allopurinol	8	6, 17
SJS, 6/F/27	Phenobarbital	15	-7, 1, 5
TEN, 3/F/66	Imatinib	70	1, 7
SJS, 7/F/60	NSAIDs	30	-1, 5, 15
SJS, 8/F/77	Antibiotics	40	-5, 1, 10
SJS, 9/F/74	Antibiotics	95	6, 21
SJS, 10/M/82	Antibiotics	95	5, 20
MPE, 1/F/67	NSAIDs	NA	NA
MPE, 2/F/70	Unidentified drug	NA	NA
MPE, 3/F/59	Carbamazepine	NA	NA
MPE, 4/M/81	Cefditoren pivoxil	NA	NA
MPE, 5/M/81	Valsartan	NA	NA
MPE, 6/F/81	Losartan potassium	NA	NA
MPE, 7/F/53	Phenytoin	NA	NA
MPE, 8/M/64	Phenytoin	NA	NA
MPE, 9/F/68	Phenytoin	NA	NA
MPE, 10/F/53	Phenytoin	NA	NA
MPE, 11/F/68	Phenytoin	NA	NA
EM, 1/F/41	Cyanamide	NA	NA
EM, 2/F/49	Lansoprazole, NSAIDs	NA	NA
EM, 3/F/86	Celecoxib	NA	NA
EM, 4/M/72	Unknown	NA	NA
EM, 5/F/36	Unknown	NA	NA
EM, 6/M/30	Carbamazepine	NA	NA
EM, 7/M/43	Unknown	NA	NA
EM, 8/F/44	Magnesium oxide	NA	NA
EM, 9/M/32	Serrapeptase	NA	NA
EM, 10/F/73	Diclofenac sodium	NA	NA
EM, 11/F/44	Unknown	NA	NA
EM, 12/F/56	Unknown	NA	NA
EM, 13/F/56	Unknown	NA	NA

Abbreviations: EM, exudativum multiforme; MPE, maculopapular drug eruption; NA, not applicable; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; SJS, Stevens-Johnson syndrome; TEN, toxic epidermal necrolysis.

^aBlistering and detachment were expressed as a percentage of total body surface area.

Recent studies have shown that severely damaged cells, such as necrotic cells and apoptotic cells, release high-mobility group box 1 protein (HMGB1), a nonhistone nuclear protein with a dual function. Inside the cells, HMGB1 is a nuclear constituent loosely bound to chromatin, and it plays a role in transcriptional regulation, while outside the cells, HMGB1 serves as an activator of the inflammatory cascade.^{2,3}

Methods. To evaluate a link between HMGB1 and SJS and TEN, we measured HMGB1 levels in serum samples from 22 healthy control subjects (mean [SD] age, 31.2 [4.6] years; 9 men, 13 women), 11 patients with maculopapular drug eruptions (MPEs), 13 patients with EM,

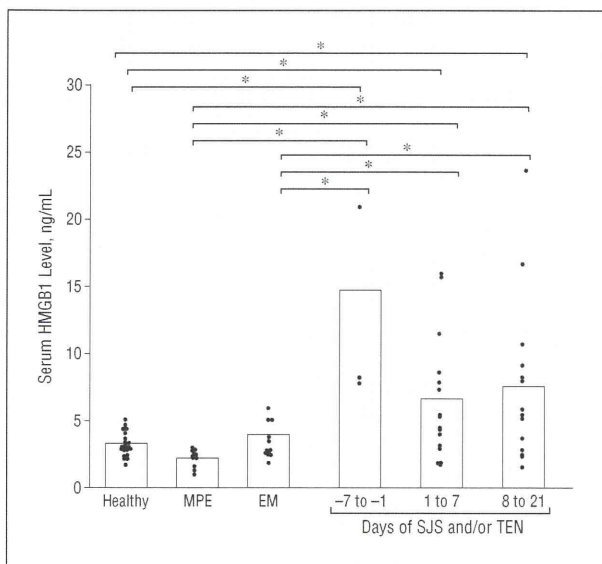


Figure 1. Increased serum high-mobility group box 1 protein (HMGB1) levels in patients with Stevens-Johnson syndrome (SJS) and/or toxic epidermal necrolysis (TEN). Serum HMGB1 levels of healthy control subjects, patients with maculopapular drug eruption (MPE), exudativum multiforme (EM), and SJS and/or TEN. In patients with SJS and/or TEN, we examined concentrations of serum HMGB1 during 3 time periods: days -7 to -1 (n=3), days 1 to 7 (n=15), and days 8 to 21 (n=14) by an enzyme-linked immunosorbent assay. * $P < .05$ between the indicated groups by the Tukey nonparametric multiple comparison test.

and 13 patients with SJS and/or TEN (**Table**). All diagnoses were based on the classification system proposed previously.⁴ Disease onset (day 1) in patients with SJS and/or TEN was defined as the day when mucocutaneous and/or ocular lesions occurred. (Of note, we collected the serum samples of SJS and/or TEN before the onset of SJS and/or TEN, when the patients might have been diagnosed as having EM or MPE at the time of the assay, but the patients then developed SJS and/or TEN.)

The serum HMGB1 levels were measured with an HMGB1 enzyme-linked immunosorbent assay kit (Shino-Test Co, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's protocol. Informed consents were obtained from each patient, and the institutional review board or ethics committee of each institution approved the study protocol.

Results. Serum HMGB1 levels of all healthy control subjects and patients with MPE and EM were lower than 6 ng/mL. In contrast, serum HMGB1 levels in patients with SJS and/or TEN at days -7 to -1, days 1 to 7, and days 8 to 21 after onset were significantly higher than those of both healthy controls and patients with MPE and EM (**Figure 1**). The sensitivity of the assay for SJS and/or TEN above the threshold level was 45.4%. Consistent with these results, immunohistochemical analysis for HMGB1 with anti-HMGB1 antibody levels (Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York) and diaminobenzidine staining demonstrated strong positivity for HMGB1 at the nuclei and perinuclei of keratinocytes in the necrotic keratinocytes in patients with SJS compared with those in healthy controls (**Figure 2**). In addition, HMGB1 in the epidermis in SJS cases was detected diffusely though the epidermis compared with the findings in healthy donors, suggesting that HMGB1 is present in the extracellular spaces in SJS and/or TEN.

Comment. The role of HMGB1 detected in SJS and/or TEN is unknown. Since HMGB1 serves as an activator of the inflammatory cascade and to attract a wide variety of cells,^{2,3} HMGB1 induced from necrolytic keratinocytes

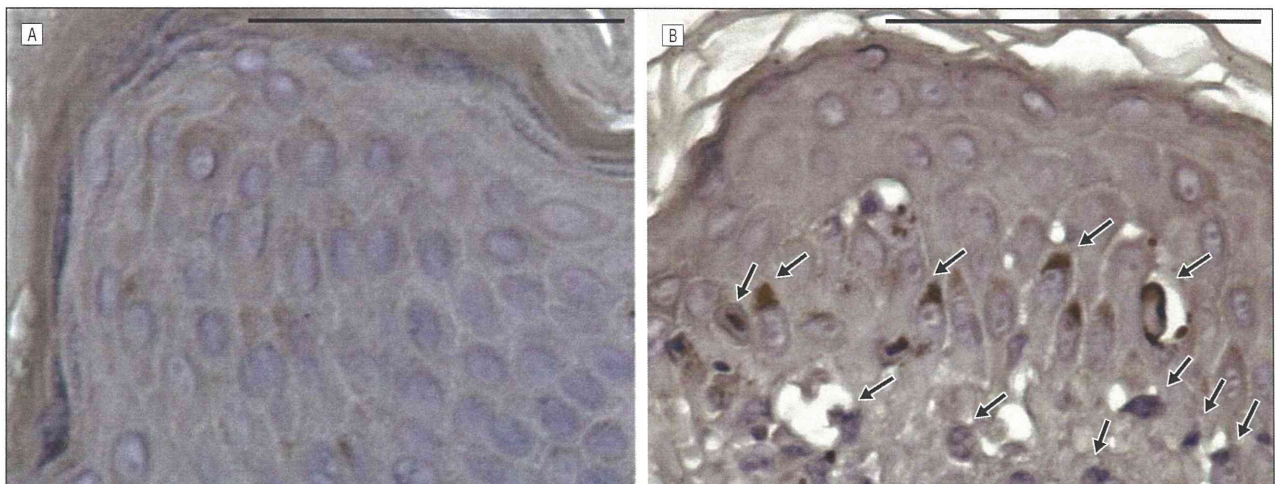


Figure 2. Skin samples from a healthy donor (A) and a patient with Stevens-Johnson syndrome (SJS); scale bars indicate 100 μ m. A, The skin of a healthy donor. B, Skin from a patient with SJS was immunostained for high-mobility group box 1 protein (HMGB1). Arrows point to highly HMGB1-positive areas at the nuclei and perinuclei of keratinocytes.

may act to stimulate inflammation and/or regeneration of the skin lesions. Increased levels of serum HMGB1 have been reported in several diseases such as severe infection and/or sepsis, trauma, cancers, and systemic lupus erythematosus,³ which were not observed in our patients with MPE, EM, and SJS and/or TEN.

It has been reported that granulysin and Fas ligand are possible candidates as biomarkers for early diagnosis of SJS and/or TEN,⁵⁻⁷ but the duration of elevated granulysin and Fas ligand levels is limited^{6,7}; therefore, false-negative results for SJS and/or TEN could occur. In this regard, HMGB1 levels were high at the early stage of SJS and/or TEN and remained elevated even after the onset, which is in contrast to the kinetics of granulysin and Fas ligand. Although the numbers of patients with SJS and/or TEN were limited in this study, we propose that measurements of HMGB1 in combination with granulysin and/or Fas ligand would be a useful diagnostic tool for cases of SJS and/or TEN that require early diagnosis and treatment.

Saeko Nakajima, MD
Hideaki Watanabe, MD, PhD
Mikiko Tohyama, MD, PhD
Kazunari Sugita, MD, PhD
Masafumi Iijima, MD, PhD
Koji Hashimoto, MD, PhD
Yoshiki Tokura, MD, PhD
Youichi Nishimura, MD, PhD
Hiromi Doi, MS
Miki Tanioka, MD, PhD
Yoshiki Miyachi, MD, PhD
Kenji Kabashima, MD, PhD

Accepted for Publication: April 13, 2011.

Author Affiliations: Departments of Dermatology at Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto (Drs Nakajima, Tanioka, Miyachi, and Kabashima and Ms Doi), Showa University School of Medicine, Tokyo (Drs Watanabe and Iijima), Ehime University School of Medicine, Toon (Drs Tohyama and Hashimoto), and University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu (Drs Sugita and Tokura), Japan; and Nishimura Skin Clinic, Fukui, Japan (Dr Nishimura).

Correspondence: Dr Kabashima, Department of Dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin-Kawara, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan (kaba@kuhp.kyoto-u.ac.jp).

Author Contributions: Drs Nakajima and Kabashima had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. *Study concept and design:* Watanabe, Sugita, Hashimoto, Tokura, Miyachi, and Kabashima. *Acquisition of data:* Nakajima, Tohyama, Iijima, Nishimura, Doi, and Tanioka. *Analysis and interpretation of data:* Nakajima, Watanabe, Hashimoto, and Kabashima. *Drafting of the manuscript:* Nakajima, Watanabe, Tohyama, Sugita, Hashimoto, Tokura, Nishimura, Doi, Miyachi, and Kabashima. *Critical revision of the manuscript for important intellectual content:* Nakajima, Iijima, Tanioka, Miyachi, and Kabashima. *Obtained funding:* Tanioka and Kabashima. *Administrative, technical, and material sup-*

port: Nakajima, Watanabe, Tohyama, Sugita, Hashimoto, Nishimura, Doi, and Miyachi. *Study supervision:* Iijima, Hashimoto, Tokura, and Kabashima.

Financial Disclosure: None reported.

Funding/Support: This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, and Health and Labor Sciences Research Grants (Research on Intractable Diseases) from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

1. Borchers AT, Lee JL, Naguwa SM, Cheema GS, Gershwin ME. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Autoimmun Rev*. 2008; 7(8):598-605.
2. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2007; 220:35-46.
3. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:367-388.
4. Auquier-Dunant A, Mockenhaupt M, Naldi L, Correia O, Schröder W, Roujeau JC; SCAR Study Group. Severe Cutaneous Adverse Reactions. Correlations between clinical patterns and causes of erythema multiforme majus, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis: results of an international prospective study. *Arch Dermatol*. 2002;138(8):1019-1024.
5. Chung WH, Hung SI, Yang JY, et al. Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Nat Med*. 2008;14(12):1343-1350.
6. Abe R, Yoshioka N, Murata J, Fujita Y, Shimizu H. Granulysin as a marker for early diagnosis of the Stevens-Johnson syndrome. *Ann Intern Med*. 2009; 151(7):514-515.
7. Murata J, Abe R, Shimizu H. Increased soluble Fas ligand levels in patients with Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis preceding skin detachment. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(5):992-1000.

14-MHz Ultrasonography as an Outcome Measure in Morphea (Localized Scleroderma)

The determination of therapeutic efficacy in morphea (aka, localized scleroderma) is difficult owing to a lack of validated outcome measures.^{1,2} Outside of the United States, 20- to 25-MHz ultrasonography has demonstrated its validity, reproducibility, and responsiveness to change.³ Preliminary studies on the lower-frequency ultrasonography available in the United States (10-15 MHz) demonstrate that it may have similar attributes.⁴⁻⁶ However, studies correlating ultrasonographic findings with lesion stage (inflammatory, sclerotic, or atrophic), clinical scoring systems, or histologic traits have not been conducted.

See Practice Gaps at end of letter

Methods. We identified 14 patients with 16 morphea lesions (**Table**) from the University of Texas Southwestern Medical Center Morphea Registry and DNA repository. Each patient and lesion was assessed for morphea subtype and clinical stage and was assigned a Modified Rodnan Skin Score (mRSS) by a single board-certified dermatologist (H.T.J.).

A single site for ultrasonography and biopsy, as well as a control site, was chosen by the dermatologist and marked with a surgical pen. Ultrasonographic examination was performed by 2 radiologists blinded to the results of the clinical assessment of each patient. Each lesion had dermal thickness measured and echogenicity determined as compared

特集II 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*

小豆澤 宏明**

Key Words : CFSE, BrdU, regulatory T cell, Stevens-Johnson syndrome (SJS), drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)

はじめに

薬疹は、薬剤投与により皮膚に生じる有害副反応であり、原因となった薬剤を中止することで、皮膚症状が改善することが多いため、検査をしなくても、ある程度は、原因薬剤を絞り込むことができる。一方で、薬疹の原因と思われる薬剤を再投与して、薬疹が再燃するかを確認することは、現実的には困難なことも多く、薬疹の原因薬剤を断定することは、意外に難しい。原因薬剤を限定しなければ、投与されていた薬剤をすべて使用できなくなり、その患者の治療の選択肢が減ることになる。

薬疹、特にStevens-Johnson症候群 (SJS)、中毒性表皮壊死症 (TEN)、薬剤性過敏症候群 (DIHS) といった重症薬疹では、薬剤に感作された T 細胞による遅延型過敏反応、Coombs と Gell による分類でいう IV 型アレルギー反応が重要である。薬疹の病態形成に関与する T 細胞は、IFN- γ を産生する T helper (Th) 1 細胞、好酸球を誘導する Th2 細胞、あるいは細胞傷害性 T 細胞 (CTL) などがある。これらのアレルギー反応にかかわる T 細胞が単独あるいはいくつか組み合わさり、

薬疹でみられる皮膚の炎症や表皮障害をひき起こすと考えられる。特にSJSやTENでは、CTLから放出される細胞傷害性顆粒、特に近年はGranulysinが、表皮障害のメカニズムとして注目されているが、その病態解明は十分とはいえない。

重症薬疹では内服誘発試験は原則禁忌とされ、原因薬剤の特定には薬剤によるリンパ球刺激試験 (DLST) とパッチテストが主に行われる。パッチテストは比較的信頼性が高い検査であるが、必ずしも陽性率が高いわけではない上に、原因薬剤を最も知りたい薬疹の急性期に行うことができない。さらに、再投与する可能性のある薬剤については、経皮感作の危険性も否定できず、外来では、貼付と判定のため患者の来院回数が多くなるなど不便な点もある。一方、DLSTは一般的に陽性率が低い印象があり、感度や特異度が不十分な検査と考えられていたが、採血のみで、薬疹の急性期であっても施行ができる利点がある。ここでは従来のDLSTを、より有用な検査として、活用するためにも、DLSTがどのような免疫反応をとらえているかについて解説する。

従来のDLST

DLSTは、欧米ではlymphocyte transformation test (LTT) と呼ばれ、末梢血単核球に薬剤を添加

* Drug-specific T cells detected by flow cytometric drug-induced lymphocyte stimulation test.

** Hiroaki AZUKIZAWA, M.D., Ph.D.: 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講座皮膚科学教室 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2]; Department of Dermatology, Course of Integrated Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN

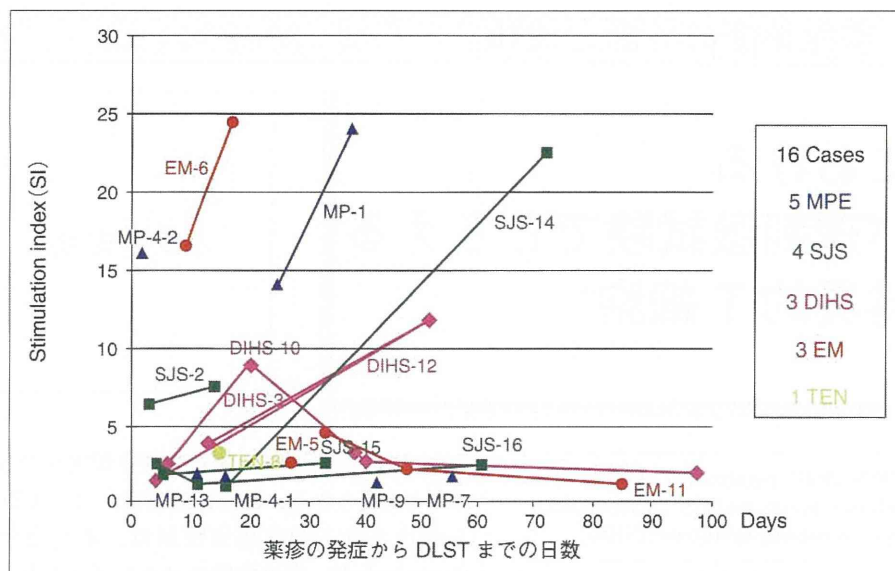


図1 薬疹発症からDLSTまでの日数とStimulation index(SI)の比較
 抗てんかん薬による播種状紅斑丘疹(MPE)型5例, 多形紅斑(EM)型3例, DIHS 3例, SJS 4例, およびTEN 1例の薬疹計16症例の, 薬疹の発症からDLSTまでの日数とSIの関係を示す. 同一症例においても検査時期が異なるとSIは大きく変化する.

し, 培養後5~7日で³H-thymidine(チミジン)を添加する。³H-thymidineは, 細胞分裂のDNA合成の際に核に取り込まれるため, 添加後24時間で, 培養液から細胞へ取り込まれたところで, 細胞のみグラスファイバーフィルターに吸着させ, その放射線量を計測する。薬剤を添加しなかった細胞の取り込みと比較してStimulation index(SI)を算出し, 1.8あるいは2.0倍を超える取り込みがあれば陽性とする。本邦ではSIを%で表示することが多く180%あるいは200%とすることも多い。しかし, 薬剤を添加しなかった細胞の³H-thymidineの取り込みは, かなりのばらつきがあり, SIのcut-offが現行のままでは良いかは疑問である。

末梢血単核球にはT細胞, B細胞, 単球などが含まれるが, DLSTで薬剤に反応して分裂するのはT細胞と考えられている。Nishioらは, 薬疹患者のT細胞を解析し, 播種状紅斑丘疹(MPE)型, 多形紅斑(EM)型, SJSではTh2細胞の割合が多く, また, CD8陽性細胞がEM型やSJSの患者では多くなっていると報告している²⁾。DLSTではこれらのT細胞の薬剤反応性の分裂を検出している。

当科で経験したMPE型, EM型, DIHS, SJS, およびTENの薬疹症例について, 薬疹の発症日を基準としてDLSTを検査するまでの日数とSIを比較したところ, 急性期に陰性であっても回復後に陽性になる症例や急性期からSI 5.0以上の強陽性の症例などがあり, SJSやDIHSといった重症薬疹に限らず, EM型やMPE型でもSI 20前後の強い反応を認めた(図1)。このようにDLSTの結果は薬疹の経過中にSIは大きく変化する。KanoらはMPE型, SJS/TEN, DIHSの異なる時期に行ったDLSTを比較し, MPE型とSJS/TENでは急性期に陽性となり回復期に陰性となる一方で, DIHSでは急性期では陰性であるが, 回復期に陽性になる症例が多いことを報告している³⁾。従来のDLSTでとらえている薬剤特異的な免疫反応は薬疹の病型・病期によって変化していると考えられる。

フローサイトメトリーによるDLST

従来のDLSTでは, 細胞分裂の際, 増殖細胞が放射性同位体(RI)標識した核酸(チミジン)である³H-thymidineを取り込み, それが発する放射線をcount per minute(cpm)として検出している。

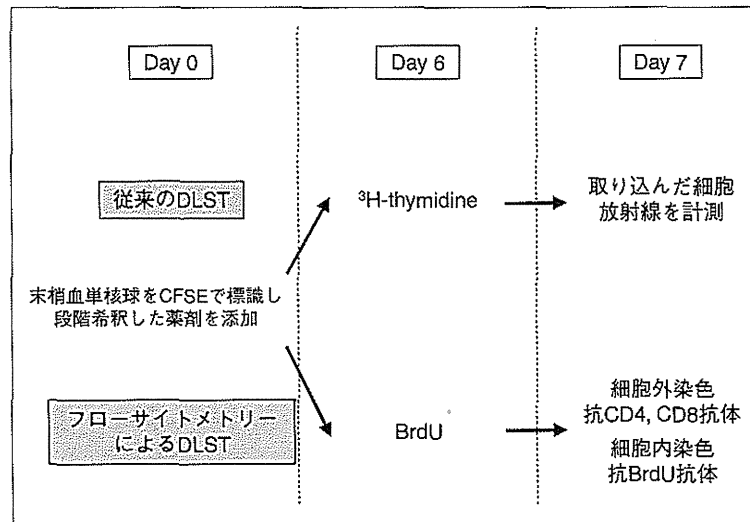


図2 従来のDLSTとフローサイトメトリーによるDLSTの比較

従来のDLSTとフローサイトメトリーによるDLSTを比較するため、比重遠心法により分離した患者末梢血単核球をCFSEで標識し、2つのプレートに分注して、段階希釈した薬剤を添加し、その後それぞれの方法を並行して行う。従来のDLSTでは、培養6日目に ^3H -thymidineを添加し、その取り込みを7日目に解析する。フローサイトメトリーによるDLSTでは、培養6日目にBrdUを加え、培養7日目に抗CD4、抗CD8抗体、抗BrdU抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析する。

この方法では培養細胞中でなんらかの細胞が分裂しているであろうとは考えられるが、どのような細胞が分裂しているかはわからない。フローサイトメトリーは細胞表面あるいは細胞内の分子を蛍光標識抗体で染色し、1秒あたり数千個の細胞を解析できる。フローサイトメトリーでは ^3H -thymidineと同様に増殖細胞にとりこまれる5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を抗体で染色する方法で、細胞周期のDNA合成期を検出できる。また、蛍光色素である5,6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)は、細胞が分裂するたびに蛍光強度が1/2に希釈されることを利用して細胞分裂を検出できる。これらの方法は、通常どちらか単独で、細胞分裂を検出するために用いられる。Tsugeらはフェニトインの蕁麻疹患者でCFSEを用いたDLSTを行い、CD4陽性分裂細胞にIFN- γ 産生細胞が含まれることを報告している⁴⁾。また、藍田らはBrdUとpropidium iodide (PI)を組み合わせでDLSTを報告している⁵⁾。

従来のDLSTで検出している細胞分裂のcpmは、数百から数千と弱いため、分裂細胞がきわめて

少ないと考えられる。そこで、われわれはフローサイトメトリーでDLSTを行う上で、CFSEの希釈とBrdUの取り込みの2つを組み合わせることで、わずかな分裂細胞を、より正確にとらえる方法を確立した⁶⁾(図2)。

従来のDLSTでは、末梢血単核球に薬剤を加えて6日間培養後、 ^3H -thymidineを加え24時間後に細胞に取り込まれた放射線を計測する。われわれは従来のDLSTとフローサイトメトリーによるDLSTを比較するために、CFSEの蛍光色素で標識した末梢血単核球を2つにわけ、薬剤を加えて培養し、従来のDLSTと同じ6日目にBrdUを添加し24時間後に細胞外の染色でCD4とCD8を、細胞内染色でBrdUを染色してフローサイトメトリーで解析した。

たとえば、フェニトインによるMPE型蕁麻疹の患者の発症25日後に施行した従来のDLSTでは、SI 5.0と強陽性で、健常人では陰性であったが、並行して行ったフローサイトメトリーによるDLSTでは、従来のDLSTに一致して、細胞分裂によりCFSEが希釈された細胞がみられ、これは健常人では検出されなかった。さらにこれらの細胞は、

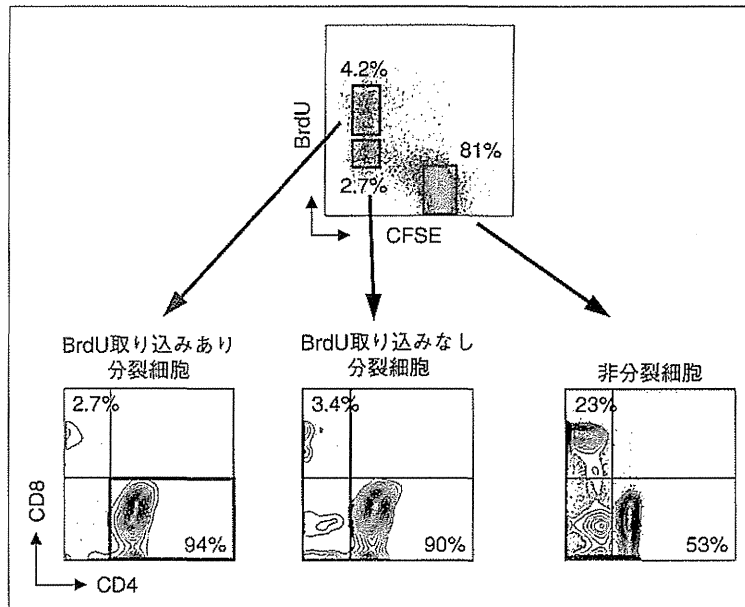


図3 フローサイトメトリーによるDLSTでとらえる薬剤特異的T細胞
 フェニトインによるMPE型薬疹での陽性症例を示す。従来のDLSTではSI 5.0と陽性であった症例で同時に行ったフローサイトメトリーを用いたDLSTを示す。フローサイトメトリーでは非分裂細胞と、分裂したがBrdUを取り込まなかった細胞、分裂し、かつBrdUを取り込んだ細胞の、3つの細胞分画を検出する。従来のDLSTはBrdU取り込みあり分裂細胞の反応をとらえていると考えられる。この症例の薬剤特異的分裂細胞は、ほとんどがCD4陽性T細胞である。

BrdUの取り込み「あり」と「なし」に分かれ、細胞薬剤特異的に増殖しているCD4およびCD8陽性細胞を特定することができる(図3)。

従来のDLSTで検出しているのは7日間培養するうちの最後の24時間の分裂細胞を検出しており、これはフローサイトメトリーではBrdUの取り込みに一致する。一方、CFSEは培養開始前に標識しているため培養7日間の細胞分裂すべてを反映する(図4)。

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、特に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。

われわれの施設で抗てんかん薬による薬疹の症例で、従来のDLSTがSI>2.0の陽性であった症例は16症例あったが、並行して行ったフローサイトメトリーを用いたDLSTで薬剤特異的分裂細胞を同定することができたのは6症例のみであった。症例数が決して十分であるとはいえないことと、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、なんらかの原因で偽陽性となっていると考えざるをえない。

重症薬疹における薬剤特異的T細胞

フローサイトメトリーによるDLSTで、各症例におけるDLST施行までの日数、薬疹型、被疑薬、

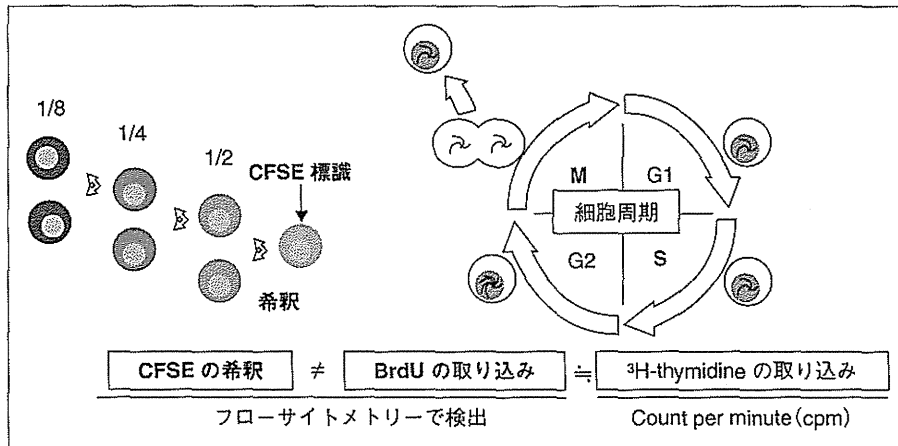


図4 細胞分裂の検出方法の比較

従来のDLSTでは増殖細胞が取り込んだ³H-thymidineによる放射線をcount per minute (cpm)として検出する。BrdUの取り込みでは、増殖細胞に取り込まれるBrdUを抗体で染色することで細胞周期のDNA合成期をフローサイトメトリーで検出する。蛍光色素であるCFSEは細胞が分裂するたびに蛍光強度が1/2に希釈されることで細胞分裂を検出する。³H-thymidineとBrdUは培養の最後の24時間の取り込みを反映し、CFSEの希釈は7日間の細胞分裂すべての結果である。

SIや薬剤特異的増殖細胞のCD4、CD8陽性細胞の割合を比較すると、ほとんどがCD4あるいはCD8陽性のT細胞の分裂であり、逆にそれ以外の細胞の分裂は検出できなかった。6症例中、4症例で、薬剤特異的T細胞はCD4陽性T細胞であった。一方、興味深いことにSJSやDIHSといった重症薬疹の症例の急性期で薬剤中止からの日数が短い症例においてCD8陽性細胞の分裂が優位であった。また、同じフェニトインが原因の薬疹症例を比較しても、CD4陽性T細胞が分裂している症例、CD8陽性T細胞が分裂している症例がみられ、一つの薬剤が引き起こす薬疹でも異なる免疫細胞が誘導されている。

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⁷⁾。

DIHSでは、急性期にCD8陽性T細胞が、回復期にCD4陽性T細胞が分裂していた。同一患者においてCD8とCD4というまったく異なる薬剤特異的T細胞が誘導されており、それらの割合が薬疹の経過とともに、大きく入れ替わるという現象が、フローサイトメトリーを用いたDLSTに

よってはじめて明らかとなり興味深い(図5)。

DLSTは制御性T細胞の分裂もとらえている

DLSTは、薬剤特異的なT細胞の分裂を検出しているが、単純に考えれば、薬疹をひき起こすエフェクター細胞の分裂をとらえているといえる。実際に重症薬疹の急性期のDLSTでは、DLSTではCD8陽性のCTLの分裂がみられることから、表皮障害を誘導しているエフェクター細胞が薬剤特異的に分裂していると考えられる。

しかし、同時にCD4陽性細胞の分裂も誘導されており、サイトカイン産生により炎症を誘導していると思われる。薬剤特異的に分裂するCD4陽性T細胞は重症薬疹の回復期にも検出される。われわれにとって驚きであったのは、DIHSの回復期の薬剤特異的に分裂するCD4陽性細胞のうち、25%近くがFoxp3陽性の制御性T細胞であった。これは、同時に行ったPHA刺激によるCD4陽性T細胞の分裂細胞に含まれる制御性T細胞と比べても明らかに多い割合である。この結果は薬疹の病態形成において皮膚障害を起こす薬剤特異的なエフェクター細胞のみならず、炎症を抑える働きを持つ、制御性T細胞が薬剤特異的に誘導されていることを示している(図5)。

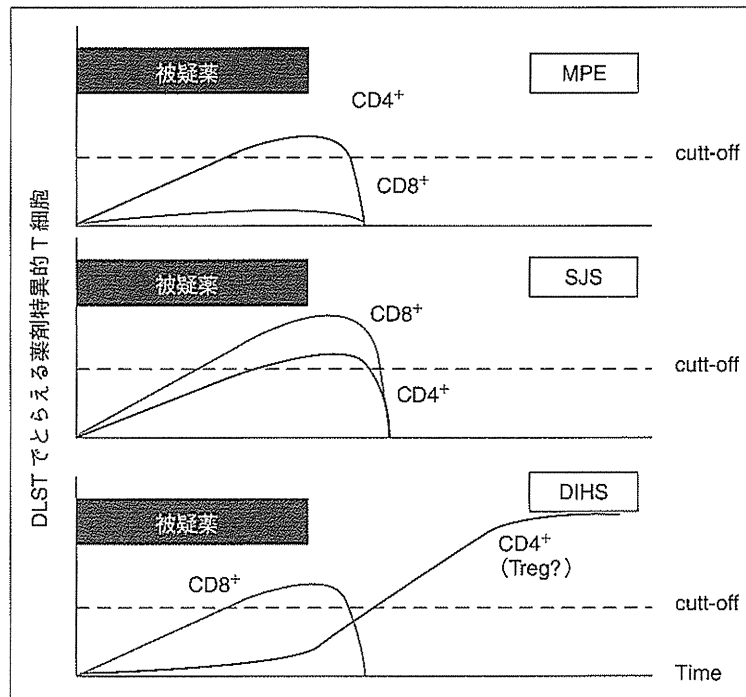


図5 DLSTでとらえる薬剤特異的 T 細胞
MPE型, SJS, DIHSにおける薬剤特異的 T 細胞のCD8陽性およびCD4陽性細胞の経時的变化を示す。DLSTのSIのcut-offを破線で示す。

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の解析が重要と思われる。

おわりに

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ないわけではない。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。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が、これらの研究成果を活用して、今後さらに有用な検査に進化させていくことができる可能性を持っている。

文 献

- 1) Chung WH, Hung SI, Yang JY, et al. Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Nat Med* 2008 ; 14 : 1343.
- 2) Nishio D, Izu K, Kabashima K, Tokura Y. T cell populations propagating in the peripheral blood of patients with drug eruptions. *J Dermatol Sci* 2007 ; 48 : 25.
- 3) Kano Y, Hirahara K, Mitsuyama Y, et al. Utility of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug sensitivity : dependence on its timing and the type of drug eruption. *Allergy* 2007 ; 62 : 1439.
- 4) Tsuge I, Okumura A, Kondo Y, et al. Allergen-spe-

- cific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity ; simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution assay. *Allergol Int* 2007 ; 56 : 149.
- 5) 藍田仁史, 尾渕浩一, 中山正子, 番地正博. フローサイトメトリーを用いたDLST検査法の確立. *医学検査* 2007 ; 56 : 5.
- 6) 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 hypersensitivity. *J Dermatol Sci* 2012 ; 65 : 213.
- 7) Illing PT, Vivian JP, Dudek NL, et al. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature* 2012 ; 486 : 554.

* * *

最近の薬疹—注意すべき薬剤とその臨床症状

小豆澤宏明

キーワード●薬剤性過敏症症候群, スティーブンス・ジョンソン症候群, 中毒性表皮壊死症

■はじめに

医学研究の進歩と共に新規薬剤が開発され、治験や臨床の現場で使用されているが、その数は年々増えており、これまでなかった作用機序の薬剤が次々に承認されている。それと共に、これまで知られていなかった副作用・有害事象も次々と報告されている。薬剤はその主作用で起こる有害事象と、そうでない、いわゆる副作用があるが、主作用による有害事象であっても、治験中に初めて分かる場合もあり、開発時点ですべてを予期することは困難である。たとえば、生物学的製剤であるインフリキシマブは乾癬治療薬でありながら、乾癬に似た症状を誘発するなど、いわば逆説的な副作用がみられることがある。

薬疹とは、全身投与（経皮投与を除く）された薬剤またはその代謝産物の直接的・間接的作用により誘導される皮膚粘膜病変を指す。薬疹の代表である、薬剤に対するアレルギー機序による病態は、薬剤の用量に非依存性であり、限られた患者のみにしかみられない反応であるため、発症を予測することがきわめて困難な有害副反応である。アレルギー機序による薬疹は、発症すると多くの場合、原疾患の治療が中断され、皮膚障害による直接的な弊害のみならず、

他の治療法への変更のため、治療期間が延長するなど患者への影響は大きい。

本稿では最近注目されている薬疹の病型と、特に注意すべき新規薬剤について解説する。

I 薬剤性過敏症症候群 (drug-induced hypersensitivity syndrome ; DIHS)

薬疹といっても、薬剤に対するアレルギー反応の機序はさまざまであるが、大きく分けると、蕁麻疹やアナフィラキシーといった即時型アレルギーと、数日から数週間の投与期間を経て発症する遅延型アレルギーがある。遅延型アレルギーとしては、播種状紅斑丘疹型薬疹のように、比較的軽症で頻度が高く、麻疹や風疹といったウイルス性発疹症との鑑別が必要となるものから、中等症で、多形紅斑型薬疹といった重症薬疹への移行が疑われるもの、そしてスティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS)、中毒性表皮壊死症 (TEN) などの重症薬疹がある。

SJS や TEN は、視力障害などの後遺症を残す、あるいは致死率が高いことから、恐ろしい薬剤有害副反応として古くから知られていた。以前は、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) と TEN が混同されていたり、また SJS と TEN は粘膜症状の強さが異なることから、別の疾患概念と考えられていたが、近年は、SJS と TEN

Cutaneous adverse reaction caused by new drugs

Hiroaki Azukizawa : Department of Dermatology, Course of Integrated Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka University

大阪大学大学院医学系研究科助教 (皮膚科学)

を同一の疾患概念として取り扱うことが多くなった。

2005年に厚生労働省研究班から、SJSとTENの診断基準が示され、2009年にはSJSとTENの治療指針も示され、ステロイド全身投与を初期から積極的に行うことが推奨されている¹⁾。また、保険適用がある血漿交換療法のみならず、保険適用がないヒト免疫グロブリン製剤静注 (IVIG) 療法についても考慮すべき治療法として指針に含められている。2009年には、重症多形滲出性紅斑 (急性期) として、公費負担の対象疾患に認定され6か月間助成が受けられるようになった。

最近の薬疹としては、DIHSが代表的である。DIHSは重症薬疹に含まれるが、SJSやTENとは異なり、粘膜症状はないか、あっても軽度で、これまで発熱、肝機能障害、リンパ節腫脹などの全身症状を伴う多形紅斑型薬疹、紅皮症型薬疹あるいは膿疱型薬疹と診断されていたものなかに、ヒトヘルペスウイルス (HHV) の再活性化を伴う病態があることが分かり、独立した薬疹の概念として確立され、注目されている²⁾ (本誌500ページ表3参照)。

DIHSの病態は、薬剤アレルギーによる病態と再活性化したHHV [HHV-6, HHV-7, サイトメガロウイルス (CMV)] による病態が複合したものであることが特徴である。通常のアレルギーでは、原因薬剤の中止後、比較的すみやかに病態が終息することが多いが、DIHSでは皮疹や肝機能障害などの症状が二峰性あるいは三峰性にみられ、発症から2~6週間程度遷延した状態となる。それだけでなく、1型糖尿病や自己免疫性甲状腺疾患、さらには発症後1年以上経過してから全身性エリテマトーデスや全身性強皮症などの自己免疫疾患を発症する症例があり、薬剤投与がきっかけでウイルスの再活性化や自己免疫反応という免疫の変調が起こる病態と考えられている。

DIHSの病態で興味深いのは、比較的限られ



図1 ラモトリギンによるDIHS

た薬剤 (カルバマゼピン、フェニトイン、ゾニサミド、ジアフェニルスルホン、サラゾスルファピリジン、アロプリノール、メキシレチンなど) で発症することである。

ヨーロッパでは drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) という病名で報告される症例も多く、DIHSとDRESSは国内外でほぼ同義として扱われることが多いが、厳密には本邦のDIHSのほうがHHV-6の再活性化という概念を診断項目に含んでいる点で、DRESSよりも狭義の病態であるといえる。

II ラモトリギンによる重症薬疹

重症薬疹の原因薬剤としては、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs)、抗生剤、抗てんかん薬、痛風治療薬などが代表的であるが、薬疹病型によって原因薬剤は異なる。抗てんかん薬であるカルバマゼピン、フェニトイン、ゾニサミドなどはSJSやTENあるいはDIHSなど重症薬疹を引き起こすことがよく知られている。最近注意すべき抗てんかん薬としては、ラモトリギンがある。

ラモトリギン (ラミクタール®) は、他の抗てんかん薬で十分な効果が得られないてんかん患者に対する併用療法として2008年に承認された。また、2011年には双極性障害における気分エピソードの再発・再燃抑制の適応が認められている。国内臨床試験では215例中、重篤な

表1 ラモトリギンの双極性障害における気分エピソードの再発・再燃抑制に用いる場合（成人）の用法・用量

	単剤療法の場合	バルプロ酸ナトリウムを併用する場合	バルプロ酸ナトリウムを併用しない場合 ^{注2)}	
			(1) 本剤のグルクロン酸抱合を誘導する薬剤 ^{注1)} を併用する場合	(2) (1) 以外の薬剤 ^{注3)} を併用する場合
1・2週目	25mg/日 (1日1回投与)	12.5mg/日 (25mgを隔日投与)	50mg/日 (1日1回投与)	単剤療法の場合に従う。
3・4週目	50mg/日 (1日1回または2回に分割して投与)	25mg/日 (1日1回投与)	100mg/日 (1日2回に分割して投与)	
5週目	100mg/日 (1日1回または2回に分割して投与)	50mg/日 (1日1回または2回に分割して投与)	200mg/日 (1日2回に分割して投与)	
6週目以降	200mg/日 (最大400mg/日) (1日1回または2回に分割して投与) (増量は1週間以上の間隔をあけて最大100mgずつ)	100mg/日 (最大200mg/日) (1日1回または2回に分割して投与) (増量は1週間以上の間隔をあけて最大50mgずつ)	6週目300mg/日 7週目以降300～400mg/日 (最大400mg/日) (1日2回に分割して投与) (増量は1週間以上の間隔をあけて最大100mgずつ)	

注1) フェニトイン、カルバマゼピン、フェノバルビタール、プリミドン、その他本剤のグルクロン酸抱合を誘導する薬剤。

注2) 本剤のグルクロン酸抱合に対する影響が明らかでない薬剤を投与されている患者は、バルプロ酸ナトリウムを併用する場合の用法・用量に従うこと。

注3) リチウム、オランザピン、その他本剤のグルクロン酸抱合に対し影響を及ぼさない薬剤。

(ラミクタール[®]添付文書より)

皮疹の報告は1例のみであったが、承認後はSJS、TEN、DIHSといった重症薬疹の報告が相次いでいる(図1)。

重症薬疹の原因薬剤という観点からラモトリギンを考えると、投与開始から8週間以内は重篤な皮膚障害がみられることのみならず、定められた用量を超えて投与すると、発疹発現の危険性が高くなることは注目すべきである。

重症薬疹の患者は医薬品を適正な目的のために適正な用法・用量で使用したにもかかわらず、副作用によって一定以上の健康異常を生じた場合に医療費などの給付により被害者を救済する医薬品副作用被害救済制度によって救済される可能性がある。しかし、不適正使用によって重症薬疹が起こった場合は、この制度により救済されないので注意が必要である。ラモトリギンは、投与量が用法・用量に記載されている増量後の最大投与量を超えていなかったとして

も、初回用量や漸増方法が厳格に守られていなければ、不適正使用となることを強調したい。

ラモトリギンは、併用薬と適応疾患によって初回用量と漸増量が異なる。ラモトリギンは双極性障害では単剤療法が認められるが、てんかん患者では認められていない。また、バルプロ酸ナトリウムを併用する場合としない場合、さらにカルバマゼピンなどの薬剤を併用する場合で投与量がそれぞれ異なる(表1)。

ラモトリギンはグルクロン酸転移酵素(主にUGT1A4)により代謝されるため、バルプロ酸ナトリウムを併用すると、肝におけるグルクロン酸抱合が競合してラモトリギンの半減期が延長し、血中濃度が上がりやすくなるため、初回用量が少なく設定されている。逆にカルバマゼピン、フェニトイン、フェノバルビタール、プリミドンといった薬剤を併用すると肝におけるラモトリギンのグルクロン酸抱合による代謝が



図2 テラプレビルによる多形紅斑型薬疹 (DIHS) が疑われた症例)

促進され、半減期が短縮されることによりラモトリギンの血中濃度が上がりにくいため用量を多くする必要がある。さらにこれらの併用薬ごとに1・2週目、3・4週目と5週目以降の漸増方法が規定されている。

ラモトリギンによるSJS, TEN, DIHSといった重症薬疹でさらに注意が必要な点は、併用薬としてバルプロ酸ナトリウム、カルバマゼピン、フェニトイン、フェノバルビタールといった、重症薬疹が起こることが知られている薬剤が多い点である。ラモトリギンのみならず、併用薬も原因薬剤あるいは被疑薬となる症例があり、薬疹の治療のために中止をする薬剤には十分な注意が必要である。

特にてんかん患者ではラモトリギンによる重症薬疹が起きたときに、その後の痙攣コントロールをどうするかが問題となる。ラモトリギンのみを中止し、皮疹がすみやかに改善する症例であればよいが、DIHSのように皮疹の遷延や再燃がみられる症例では、併用薬の中止や変更を検討せざるをえない状況が起こりうる。

ラモトリギンによる重症薬疹の診断では、薬剤によるリンパ球刺激試験 (DLST) が陽性になることが比較的多いため診断に有用である。一方で、DLSTは結果が出るのに1週間を要するため原因薬剤の中止の判定には使えず、またDLSTそのものは偽陰性が多い検査法であることを熟知したうえでの活用が必要である。

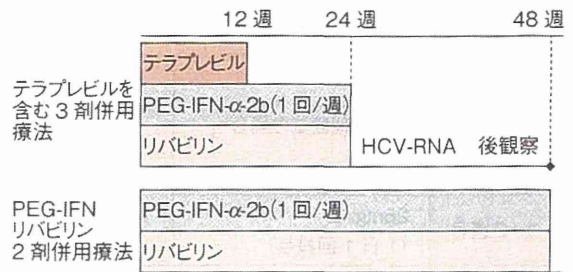


図3 テラプレビル3剤併用療法と2剤併用療法の比較

III テラプレビルによる重症薬疹 (図2)

テラプレビル (テラピック®) は、C型肝炎ウイルス (HCV) の複製に必須の酵素であるNS3-4A セリンプロテアーゼを選択的に阻害する新規C型肝炎治療薬であり、2011年9月に承認され、C型肝炎治療に用いられている。

これまでC型肝炎はペグインターフェロン (PEG-IFN)、リバビリンの48週間投与による2剤併用療法が標準的治療として行われてきたが、テラプレビルを加えた3剤併用療法はテラプレビルを12週間内服、PEG-IFNとリバビリンを24週間投与することで、2剤併用療法よりも短い治療期間で高い有効性が得られる治療法である (図3)。市販後の全例調査により、重篤な腎機能障害、肝機能障害に加えて、TENの重篤な皮膚障害に対しても注意喚起が行われている。

Roujeauらは2011年までに行われた、日本も含め3つの国際的な第III相臨床試験における、テラプレビルを含めた3剤併用療法の1,797例と2剤併用療法の493例を比較し、テラプレビルに関連した皮膚炎症状を報告している³⁾。それによるとリバビリン、PEG-IFNの2剤併用療法では34%で何らかの皮膚反応がみられたのに比べ、テラプレビルを含む3剤併用療法では56%でみられた。さらに、Grade3とされる体表面積の50%を超えるか、あるいは水疱、紫斑、表皮剥離、粘膜病変のいずれかを伴う頻度は2剤併用療法では0.4%、テラプ

レビルを含む3剤併用療法では3.7%であり、重症薬疹の危険性が高くなっていることを報告している。この報告では3剤併用療法を行った1,797例中、専門家による検討で、少なくともSJSが2例、DRESS (DIHS) 3例がみられたと報告している。

このようにSJSとTENを含む重症薬疹の報告がみられることは注目すべきであり、特にDIHSは、限られた薬剤のみで発症することが知られており、このような新規薬剤でみられることは興味深い。

テラプレビルを含む3剤併用療法では、実際に軽症から重症までさまざまな重症度の皮膚障害があり、播種状紅斑丘疹型薬疹や湿疹型薬疹、間擦部型薬疹などといった薬疹がみられる。播種状紅斑丘疹型薬疹では体表面積の50%を超える広範囲の紅斑がみられることがあるものの、一過性でテラプレビルを含め3剤を中止することなく、継続できる症例もある。

テラプレビルは投与早期から高尿酸血症がみられることが知られ、それに対してアロプリノールが処方される症例がある。国内第III相臨床試験における血中尿酸値増加の発現率は2剤併用療法で7.9%であったのに対し、3剤併用療法では60.7%に認められた。血中尿酸値は投与開始後早期に増加し、テラプレビル投与期間中は高値で推移し、一部の症例では薬剤による治療が行われる。

アロプリノールはDIHSの代表的原因薬剤の

1つであり、前述のようにテラプレビルもまた、DIHSの新規原因薬剤であることから、その併用はDIHSのリスクを高めるだけでなく、アロプリノール、テラプレビルのいずれが原因薬剤であるかの特定を困難にする。C型肝炎治療における重症薬疹のリスクを避ける意味でもアロプリノールを含む重症薬疹の原因薬剤の併用は極力避ける必要がある。

■ おわりに

新規薬剤は患者に新たな治療の機会をもたらす希望の光であり、今後ますますの臨床応用が期待される。一方で、新規薬剤は患者を未知の有害副反応の危険にさらす可能性もある。新規薬剤の投与中は、患者を注意深く観察するとともに、皮膚科を含め各診療科の連携を迅速に行うことで、有害副反応を最小限にとどめることが重要であると考えられる。

..... 文 献

- 1) 相原道子, 狩野薬子, 飯島正文他: 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) 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. 日皮会誌 2009; 119: 2157-2163.
- 2) 橋本公二: 薬疹 Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS). 日皮会誌 2006; 116: 1575-1581.
- 3) Roujeau JC, Mockenhaupt M, Tahan SR, et al: Telaprevir-Related Dermatitis. *Arch Dermatol* 2013; 149: 152-158.

CORRESPONDENCE

Toxic epidermal necrolysis complicated by sepsis, haemophagocytic syndrome, and severe liver dysfunction associated with elevated interleukin-10 production

Toxic epidermal necrolysis (TEN) is a condition of blistering and widespread purpuric macules involving more than 30% [1] of the total skin surface area. It is a life-threatening condition associated with a mortality rate of 20-70%, which is attributed to sepsis (33%) or other causes [1]. In more than 90% of cases, TEN is characterised as an adverse reaction to an administered drug [1]. Severe liver dysfunction is not typical during TEN as it affects 10% of cases.

Here, we report a case of TEN complicated by haemophagocytic syndrome (HPS) and severe liver dysfunction, in which increased interleukin (IL)-10 levels were detected in the patient's serum.

A 76-year-old Japanese woman, who was treated for 2 weeks with etodolac for cervical spondylosis, developed a cough and sore throat similar to a common cold 4 days after treatment began. On examination, severe liver dysfunction was found (serum levels of 1,166 IU/l aspartate aminotransferase and 1,302 IU/L alanine aminotransferase) accompanied for 3 days by extensive skin eruption. After these findings, etodolac administration was discontinued, and the patient was transferred to our hospital.

In addition to skin symptoms, extensive bulla formation and erosions were found in the oral and vulva mucous membrane. An abdominal lesional skin biopsy showed full-thickness epidermal necrosis and eosinophil infiltration. A drug lymphocyte stimulation test was etodolac-negative. Results of paired serological tests for mycoplasma, Epstein-Barr virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus were all negative. Moreover, no serum anti-hepatitis A, -hepatitis B surface antigen, or -hepatitis C virus antibody was found. Antinuclear antibody was negative. Despite steroid pulse

therapy (1 g/day for 3 days), plasma exchange (total of five times), intravenous immune globulin administration (0.4 g/kg/day for 5 days), and antibiotic therapy during hospitalisation, the severe liver dysfunction and progression of epidermal detachment (approximately 60% of the body surface area) was prolonged, and the patient died due to sepsis.

Serum levels of IL-10 and other indicator molecules were monitored over the course of hospitalisation of the patient (summarized in *figure 1A*). In this case of TEN with HPS complication, increased IL-10 production appears to be a marker of poor prognosis. The elevated IL-10 is proposed to be a mediator of ongoing advanced liver degeneration during immunoenhancement, in an hypothesis we propose to explain our observations (*figure 1B*).

In cases of TEN, attention to sepsis followed by erosions is critical. The complicating HPS observed is a rare but frequently fatal disorder of immune regulation, characterized by pancytopenia, hepatosplenomegaly, and increased proliferation and activation of macrophages [2]. Clinical symptoms of HPS are not specific, and therefore diagnosis is frequently delayed or found at autopsy [3]. From our observations, we hypothesise that HPS may have begun at a period during sepsis when additional elevation of IL-10 was observed.

IL-10 is a central and critical anti-inflammatory cytokine produced by various cell populations including Foxp3⁺ regulatory T cells, Th1, Th2, Th17, B-cells, and dendritic cells [4]. Serum concentration of IL-10 is significantly higher in fulminant versus severe acute hepatitis [5]. It has been observed that serum IL-10 is elevated in patients with both sepsis and HPS and proposed to be a prognostic factor [3, 6]. In this case report, serum IL-10 levels were apparently elevated after plasma exchange during progression of epidermal detachment. We propose that while modest increases in IL-10 levels may have a positive effect, a massive anti-inflammatory response may in fact lead to a poor prognosis.

In conclusion, this report is the first to show that a case of TEN complicated by sepsis, HPS, and severe liver dysfunction was accompanied by enhanced and prolonged

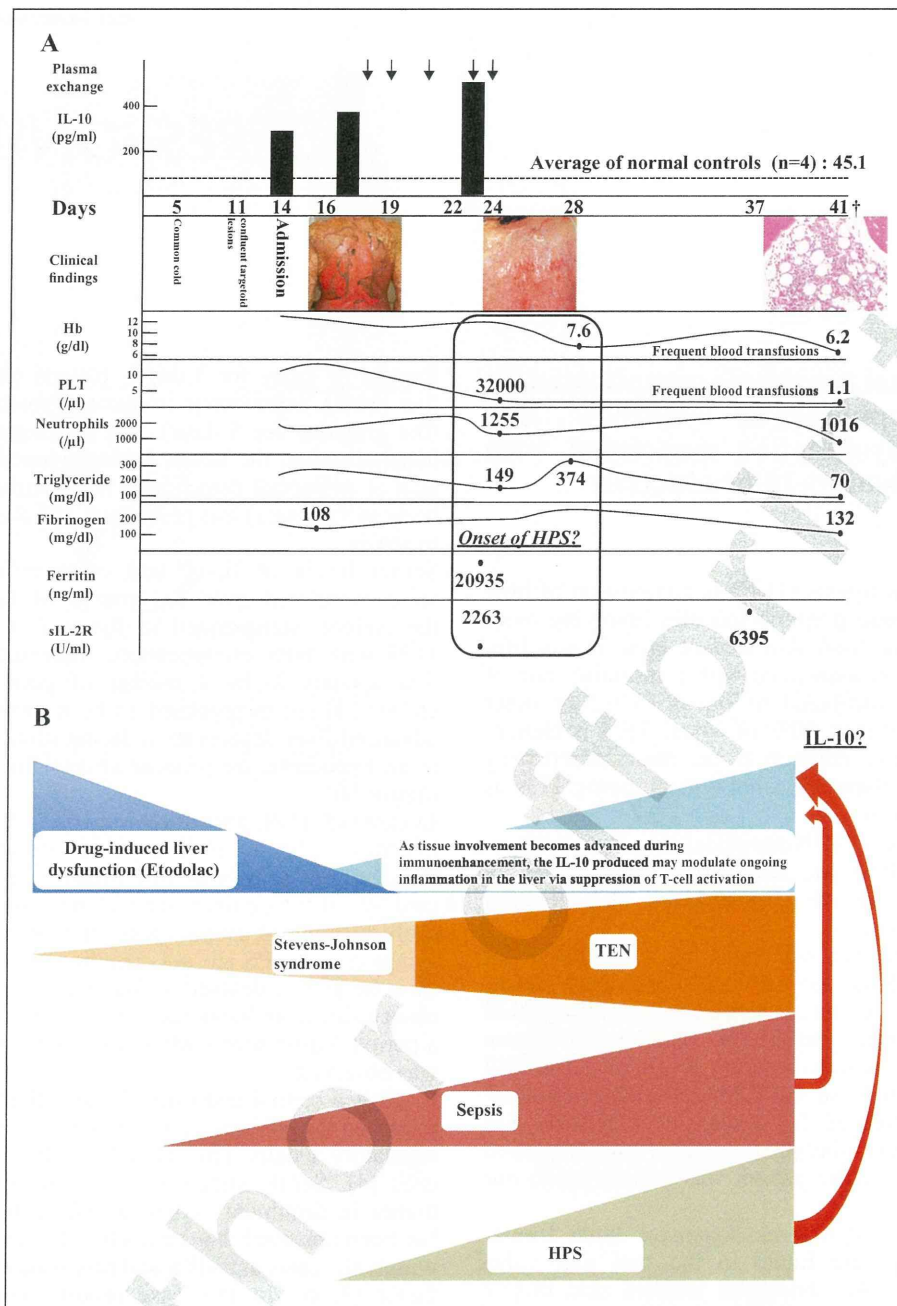


Figure 1. A) History, time course, and clinical findings of a patient with toxic epidermal necrolysis. Serum levels of IL-10 (measured by ELISA; Becton-Dickinson) and other indicators over the course of hospitalisation are shown. The average levels of IL-10 in normal control subjects are indicated by the broken line. The small inserts show the extensive skin involvement in the patient, and a photomicrograph of a section of involved skin indicates epidermal necrosis and eosinophil infiltration. Serum IL-10 levels were apparently further elevated after plasma exchange (indicated by arrows at the top of the figure). The proposed period of onset of haemophagocytic syndrome is indicated by the central boxed region. Abbreviations and symbols used: Hb, haemoglobin; PLT, platelet count; sIL-2R, soluble IL-2 receptor; HPS, haemophagocytic syndrome; †, death of the patient. **B)** Hypothesis relating prolonged elevated serum IL-10 levels to progression of liver dysfunction. Although drug-induced liver damage may improve after discontinuation of nonsteroidal immunosuppressant treatment, the elevated IL-10 production caused by sepsis and haemophagocytic syndrome is proposed to modulate ongoing liver inflammation via suppression of T-cell activation.

elevation of IL-10 production. Our observations are consistent with IL-10 being a key regulating factor in TEN progression. ■

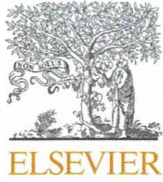
Disclosure. *Financial support: none. Conflict of interest: none.*

¹ Department of Dermatology,
² Department of Traumatology and
Acute Critical Medicine,
³ Department of Pathology,
Osaka University Graduate School
of Medicine,
2-2 Yamadaoka, Suita,
Osaka 565-0871 Osaka, Japan
<yamaoka@derma.med.osaka-
u.ac.jp>

Toshifumi YAMAOKA¹
Hiroaki AZUKIZAWA¹
Atsushi TANEMURA¹
Hiroyuki MUROTA¹
Tomoya HIROSE²
Koichi HAYAKAWA²
Takeshi SHIMAZU²
Naoki WADA³
Eiichi MORII³
Ichiro KATAYAMA¹

1. Palmieri TL, Greenhalgh DG, Saffle JR, *et al.* A multicenter review of toxic epidermal necrolysis treated in U.S. burn centers at the end of the twentieth century. *J Burn Care Rehabil* 2002;23: 87-96.
2. Janka GE. Hemophagocytic syndromes. *Blood Rev* 2007; 21: 245-53.
3. Tang Y, Xu X, Song H, *et al.* Early diagnostic and prognostic significance of a specific Th1/Th2 cytokine pattern in children with haemophagocytic syndrome. *Br J Haematol* 2008; 143: 84-91.
4. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 170-81.
5. Nagaki M, Iwai H, Naiki T, *et al.* High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J Infect Dis* 2000; 182: 1103-8.
6. Csontos C, Foldi V, Pálincas L, *et al.* Time course of pro- and anti-inflammatory cytokine levels in patients with burns—prognostic value of interleukin-10. *Burns* 2010; 36: 483-94.

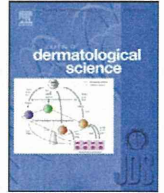
doi:10.1684/ejd.2012.1870



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Dermatological Science

journal homepage: www.elsevier.com/jds



The predominant drug-specific T-cell population may switch from cytotoxic T cells to regulatory T cells during the course of anticonvulsant-induced hypersensitivity

Takaaki Hanafusa, Hiroaki Azukizawa*, Sayaka Matsumura, Ichiro Katayama

Department of Dermatology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 August 2011

Received in revised form 22 November 2011

Accepted 2 December 2011

Keywords:

Drug allergy

Adverse drug reaction

Immunologic tests

In vitro tests

Immunology

ABSTRACT

Background: Delayed hypersensitivity is responsible for severe cutaneous adverse drug reactions (cADRs), especially in Stevens-Johnson syndrome (SJS), toxic epidermal necrolysis, and drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) (also known as drug rash with eosinophilia and systemic symptoms [DRESS] syndrome). The drug-induced lymphocyte stimulation test (DLST), or lymphocyte transformation test (LTT), is used to identify the culprit drug in severe cADR cases.

Objective: The aim of this study was to examine the immune reactions in cADR patients through the identification of the drug-specific proliferating cells by flow cytometric DLST (FCM-DLST).

Methods: The peripheral blood mononuclear cells of 16 anticonvulsant-induced cADR patients were investigated by conventional DLST and a FCM-DLST protocol in which CFSE dilution and BrdU incorporation were combined. FCM-DLST allowed for the identification of the drug-specific proliferating cells in six cases. Three of these cases were DIHS cases, whereas there was one case of SJS, one case of maculopapular rash (MP), and one case of erythema multiforme (EM) among the six cases.

Results: In FCM-DLST, drug-specific proliferating T cells were detected as CFSE^{low} BrdU^{high} cells. These cells corresponded to the cells incorporating ³H-thymidine in conventional DLST. Although CD4⁺ T-cell proliferation dominated the observed proliferation in most of the cases (in the recovery stage of the three DIHS cases, the MP case, and the EM case), drug-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTLs) were detected, especially in the acute stages of the SJS case and one of the DIHS cases. There was a dramatic switch in the predominant drug-specific proliferating T-cell population in the course of one of the cases of DIHS in which CD8⁺ CTLs were predominant initially, whereas CD4⁺ T cells were predominant later. Moreover, drug-specific CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) proliferated during the recovery stage in one DIHS case.

Conclusions: FCM-DLST revealed that the cell proliferation detected by conventional DLST is a heterogeneous proliferation of both CD8⁺ CTLs and CD4⁺ T cells that likely includes Tregs. However, the number of cADR cases in this study was limited, which limits the conclusions that can be drawn from it.

© 2011 Japanese Society for Investigative Dermatology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

T-cell-mediated delayed hypersensitivity is responsible for the pathogenesis of severe cutaneous adverse drug reactions (cADRs), including Stevens-Johnson syndrome (SJS), toxic epidermal necrolysis (TEN), and drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS), also called hypersensitivity syndrome (HSS) or drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome [1–4]. In severe cADR, the drug-induced lymphocyte stimulation test (DLST), or lymphocyte transformation test (LTT), is used to

identify culprit drugs [5]. In conventional DLST, freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are incubated with the culprit drug for 5–7 days, and cell proliferation is measured by ³H-thymidine incorporation. Because ³H-thymidine incorporation occurs in all proliferating PBMCs, drug-specific proliferating cells cannot be individually assessed by conventional DLST.

Flow cytometry (FCM) is a well-established semiquantitative assay that can measure the cell surface and intracellular molecules expressed by individual cells in a heterogeneous population. It has also been used for analyzing the in vitro immune reaction that occurs in DLST [6]. Drug-specific T cells and their cytokine production were detected by a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-based proliferation assay [7–9]. CFSE is partitioned equally during cell division, resulting in the

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6879 3031; fax: +81 6 6879 3039.
E-mail address: azukizaw@derma.med.osaka-u.ac.jp (H. Azukizawa).