

を採取・収集した。

C. 研究結果

SJS/TEN で変動する遺伝子と軽症薬疹とのクラスター解析による比較を行った結果、ネクロプトーシスと炎症のメカニズムに関与する4つの遺伝子を候補に挙げた（未発表データ）。その4つの遺伝子に関しSJS/TEN、軽症薬疹患者全血から抽出したRNAを用い現在発現を確認中である。

ジアフェニルスルフォンによる薬疹に関する研究では、HLA-B*1301 および HLA-B*1302 のホモロジーモデリングの結果、ほぼ同じ構造が得られたが、HLA-B*1302 では119番目のアミノ酸が側鎖の大きいトリプトファンであるのに対し、HLA-B*1301 では側鎖の小さいイソロイシンに変わっていることから、HLA-B*1301 では HLA-B*1302 には見られないサブポケットを見つけることができた。

得られた立体構造モデルに対して分子ドッキング計算を行い、結合様式を比較した所、HLA-B*1301 では、上記に記載した HLA-B*1301 に特有のサブ結合ポケットにジアフェニルスルフォンが結合しているのに対し、HLA-B*1302 では、HLA-B*1301 のポケットから離れた部位に結合していることがわかった。最後に、MM-GBSA 法を用いた結合親和性の比較から、HLA-B*1301 とレクチゾールは、HLA-B*1302 よりも極めて強く結合しそうなことが示唆された。

D. 考察

SJS/TEN のバイオマーカーとしてネクロプトーシスに関与する遺伝子が候補に挙げられ、より多くの検体でその有用性が確認できれば、本症の早期発見、治療の効果判定に有用となる可能性がある。

また、ジアフェニルスルフォンは、HLA-B*1301 にのみ存在する結合ポケットにレクチゾールが結合することで、他のHLAと比較してレクチゾールと高い親和性を持ちそうなことが示唆された。

E. 結論

既に報告されているように SJS/TEN の表皮壊死の発症機序にはネクロプトーシスに関与している可能性が高いが、ネクロプトーシス関連遺伝子が本症のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

またレクチゾールと HLA-B*1301 だけでなく、薬疹と HLA の関連が報告されている他の薬剤についても、立体構造や結合様式、結合親和性を調べる事で、薬疹発症のメカニズムを解明する一助になり得ると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Uno H, Kabashima K, Tohyama M, Watanabe T, Hashimoto K, Iijima M, Sueki H, Watanabe H: TNF- α as a useful predictor of human herpesvirus-6 reactivation and indicator of the disease process in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). J Dermatol Sci. 2014, 74:177-9

2. Ogawa K, Morito H, Hasegawa A, Miyagawa F, Kobayashi N, Watanabe H, Sueki H, Tohyama M, Hashimoto K, Kano Y, Shiohara T, Ito K, Fujita H, Aihara M, Asada H: Elevated serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) relates to reactivation of human herpesvirus 6 in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS)/drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS). Br J Dermatol. 2014 ;171:425-7.

3. Sueki H, Sasaki M, Kamiyama T, Ohtoshi S, Watanabe H, Nakada T: Drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms with histologic features mimicking cutaneous pseudolymphoma. J Dermatol. 2014 ;41:856-7.

4. Miyagawa F, Hasegawa A, Imoto K, Ogawa K, Kobayashi N, Ito K, Fujita H, Aihara M, Watanabe H, Sueki H, Tohyama M, Asada H: Differential expression profile of Th1/Th2-associated chemokines characterizes Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis (SJS/TEN) and drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms

(DIHS/DRESS) as distinct entities. Eur J Dermatol. 2015, in press

5. Kano Y, Tohyama M, Aihara M, Matsukura S, Watanabe H, Sueki H, Iijima M, Morita E, Niihara H, Asada H, Kabashima K, Azukizawa H, Hashizume H, Nagao K, Takahashi H, Abe R, Sotozono C, Kurosawa M, Aoyama Y, Chu CY, Chung WH, Shiohara T. Sequelae in 145 patients with drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: Survey conducted by the Asian Research Committee on Severe Cutaneous Adverse Reactions (ASCAR). J Dermatol. 2015, in press

2. 学会発表

1. Watanabe H, et al. Association between HLA-B*13:01 and DIHS/DRESS due to dapsone in a Japanese patients of pityriasis lichenoides et varioliformis acuta (PLEVA) 6th Drug hypersensitivity meeting. 2014.4. Bern, Switzerland.

2. 山本蘭, 阿部典子, 渡辺秀晃, 宇野裕和, 末木博彦. シアナマイドによる紅皮症型薬疹の1例. 日本皮膚科学会第854回東京地方会. 2014.6. 東京.

3. 笠 ゆりな, 今泉牧子, 北見由季, 渡辺秀晃, 末木博彦, 川那部岳志. 誘発に1日量2日間の投与を要したムコダインによる固定薬疹の1例. 日本皮膚科学会第858回東京地方会. 2014.12. 東京.

4. 末木博彦, 渡辺秀晃. 薬疹の最新動向と今後の展望. (基調講演)第78回日本皮膚科学会東京支部学術大会. 2015.2.東京.

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

厚生労働科学研究委託費「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
委託業務成果報告書

中毒性表皮壊死症の表皮壊死における hyperthermia とサイトカインの役割
分担研究者 藤山 幹子 愛媛大学医学系研究科皮膚科学 准教授

研究要旨 中毒性表皮壊死症、Stevens-Johnson 症候群は、高熱と皮膚粘膜の表皮（上皮）の障害を特徴とする疾患である。これまで表皮角化細胞の細胞死についての検討は、主に apoptosis のメカニズムを明らかにするものであったが、これら病態における表皮障害は apoptosis と necrosis の両方の経路により生じると考えられている。われわれは、発熱レベルの hyperthermia の状況下で、TNF- α 、IFN- γ の組み合わせが、表皮角化細胞に necrosis を誘導することを明らかにした。TNF- α は Stevens-Johnson 症候群と中毒性表皮壊死症の病変部表皮に浸潤する単球と T 細胞から、IFN- γ は T 細胞から産生されるサイトカインである。Stevens-Johnson 症候群や中毒性表皮壊死症では、これらサイトカインへの暴露に発熱が加わることで、表皮角化細胞の necrosis が誘導される可能性が考えられる。

A. 研究目的

中毒性表皮壊死症 (TEN) および Stevens-Johnson 症候群 (SJS) は、表皮角化細胞の全層性の変性壊死をきたす疾患である。一般的な細胞死の研究が主に apoptosis のメカニズムを中心に解析されてきた歴史的経緯より、SJS/TEN においても、これまで apoptosis を説明するメカニズムについて検討されてきた。しかし、SJS/TEN の表皮角化細胞の細胞死には apoptosis のみならず necrosis の果たす役割も大きいという認識が深まっており、現在そのメカニズムについての検討が始まったばかりである。

SJS/TEN では、浸潤している T 細胞が IFN- γ や TNF- α を産生するが、これらサイトカインは多形紅斑型など通常の薬疹および他の炎症性皮膚疾患でも局所で産生されているサイトカインであり、表皮角化細胞の細胞死に関与する可能性は低いと考えられてきた。ところが最近、われわれは、SJS/TEN 特異的に病変表皮に CD16 陽性単球が多数浸潤していることを見いだした。単球は TNF- α を最も多く産生する血球系細胞であり、表皮角化細胞は SJS/TEN において通常の薬疹や他の炎症性皮膚疾患とは桁違いの TNF- α に暴露されている可能性がある。そこで、TNF- α と IFN- γ の組み合わせ、さらに、TEN/SJS で必ずみられる発熱 (hyperthermia) が、表皮角化細胞の細胞死誘導に関与している可能性を考え検討を行

った。

B. 研究方法

CD16 単球の表皮浸潤は、他の炎症性皮膚疾患ではみられない SJS/TEN に特異的な所見であるため、CD16 単球の表皮内浸潤が SJS/TEN の病態形成に本質的役割を果たしている可能性がある。つまり、この状態を生じてしまうと、普遍的に細胞死が誘導されると考えている。そこで、本研究の細胞死の検討には、正常人の皮膚から培養した表皮角化細胞を用いた。

また、通常培養表皮角化細胞は、シャーレ内に接着した単層培養であるが、生体での表皮角化細胞は重層している。in vitro の実験において、同じ刺激下で重層化した表皮角化細胞は単層培養のときとは異なる反応性を示す場合がある。そこで、本研究では、線維芽細胞を含むコラーゲンゲルの上に表皮角化細胞を重層培養して角層まで形成した、いわゆる三次元培養皮膚を用いた検討もあわせて行い、通常培養の表皮角化細胞との反応性を比較研究した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、試料提供者に新たな危害を加える可能性は皆無であるが、その方法と研究内容は愛媛大学医学部臨床倫理委員会にて承認されている。試料

提供者からは、説明文書を用いて同意をえた。

C. 研究結果

培養表皮角化細胞および三次元培養皮膚において、TNF- α とIFN- γ の組み合わせ刺激は、36°Cでの通常の培養ではほとんど細胞死を生じることにはなかったが、38°Cでは著明に細胞死を誘導した。細胞死は、サイトカインの単回刺激では誘導されず、少なくとも2回の刺激が必要であった。以上の結果は、単層の培養表皮角化細胞と三次元培養皮膚において差を認めなかったため、以降の検討は単層の培養表皮角化細胞を用いて行った。

細胞死のタイプを検討したところ、hyperthermiaとサイトカインにより誘導される細胞死はapoptosisではなくnecrosisであることが明らかとなった。そこで、necroptosisの関与を検討したが、necrostatin-1の添加による抑制は認められなかった。一方、4-PBAの添加やATF4のknockdownなどの小胞体ストレスの抑制により、細胞死は抑制された。サイトカイン刺激は、hyperthermiaのもとで、小胞体ストレスを介したnecrosisを誘導することが示唆された。

D. 考察

細胞死のうちnecrosisの機序は、apoptosisと比べると十分解明されていない。apoptosisとnecrosisは同じ刺激によっても引き起こされるが、どちらのタイプの細胞死がより強く誘導されるのかについては、細胞の種類、細胞の存在する状況などにより異なると考えられている。表皮角化細胞のSJS/TENにおけるnecrosisには、これまでapoptosisを引き起こすことが明らかになった刺激でnecrosisも生じている可能性に加え、さらにこれまで知られていないメカニズムが関与している可能性がある。

われわれは、SJS/TENの表皮が通常の炎症性皮膚疾患とは比較にならない多量のTNF- α に暴露されていると考え、サイトカインによる細胞死に注目して検討を行っている。本研究において、TNF- α とIFN- γ の組み合わせが、hyperthermiaの状態では細胞死(necrosis)を誘導すること、また、このnecrosisの誘導に小胞体ストレスの経

路が関与することを明らかにした。小胞体ストレスを介した細胞死は、necrosisの機序を解明する手がかりとして注目されている分野である。また、SJS/TENでは発熱が必ず認められるが、これまで表皮角化細胞における発熱の意義については検討されていなかった。今後、サイトカインとhyperthermiaによる小胞体ストレスの誘導のメカニズム、およびnecrosisに至る経路の詳細を明らかにし、細胞死の抑制方法を検討する予定である。

E. 結論

Hyperthermiaとサイトカインの組み合わせによる細胞死は、SJS/TENの病態と組織学的所見を十分説明するものと考えられる。発熱のコントロール、サイトカインの発現や活性の抑制、小胞体ストレスの制御といったさまざまな治療戦略のありかたを示唆するものであり、新規治療薬の開発につながることを期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1.Uno H, Kabashima K, Tohyama M, Watanabe T, Hashimoto K, Iijima M, Sueki H, and Watanabe H. TNF-alpha as a useful predictor of human herpesvirus-6 reactivation and indicator of the disease process in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). *J Dermatol Sci*; 74: 177-179, 2014.

2.Ogawa K, Morito H, Hasegawa A, Miyagawa F, Kobayashi N, Watanabe H, Sueki H, Tohyama M, Hashimoto K, Kano Y, Shiohara T, Ito K, Fujita H, Aihara M, and Asada H. Elevated serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) relates to reactivation of human herpesvirus 6 in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS)/drug-induced hypersensitivity syndrome(DIHS). *Br J Dermatol*; 171: 425-427,

2014.

2. 学会発表

1. Tohyama M, Dai X, Shiraishi K, Murakami M, Sayama K: Endoplasmic reticulum stress-induced keratinocyte necrosis is a new mechanism of epidermal cell death in SJS/TEN. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Osaka, Dec 12-14, 2014.

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

厚生労働科学研究委託費「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
委託業務成果報告書

重症薬疹における病期ごとの Th1 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) といった重症薬疹では、T ヘルパー 1 (Th1) 細胞が産生するサイトカインの関与が知られている。一方で薬剤性過敏症候群 (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、Th2 細胞が産生するサイトカインの関連している。我々は重症薬疹患者の血清を用いて、SJS/TEN 3 例、DIHS 3 例のそれぞれ急性期、回復期について血清中の IFN- γ 、TNF- α 、IL-12/IL-23p40、IL-17A の濃度を比較した。IFN- γ は重症薬疹の急性期に高い傾向があり、意外にも SJS/TEN よりも DIHS の急性期で高い傾向であった。TNF- α については重症薬疹の回復期に高い傾向であった。IL-12/IL-23p40、IL-17A については一定の傾向がみられなかった。

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群 (SJS)、中毒性表皮壊死症 (TEN) や薬剤性過敏症候群 (DIHS) は重症薬疹であり、多くの症例がステロイドを中心とした従来の治療法で改善する一方で、重症例では現在の治療法の効果が不十分で、視力障害の後遺症や死亡する症例がある。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。薬疹はアレルギー反応としての側面から Th2 細胞の関与が知られるが、SJS/TEN といった重症薬疹ではかならずしも好酸球増多がみられるわけではなく、むしろ Th1 細胞の関与が重要と考えられる。TNF- α は細胞死を誘導するサイトカインとして注目されている。(引用文献 1) 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、Th1 細胞が産生するサイトカインを中心に測定を行った。

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 3 名の血清を用いて IFN- γ 、TNF- α 、IL-12/IL-23p40、IL-17A の濃度を V-PLEX Kit (Meso Scale Discovery) により計測した。

(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 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

IFN- γ は重症薬疹の急性期に高い傾向があり、SJS/TEN の急性期では平均 583pg/ml であったのに対して よりも DIHS の急性期で平均 1432pg/ml であり高い傾向であった。(図 1) TNF- α については重症薬疹の回復期に高い傾向で、DIHS の回復期で平均 195pg/ml で、SJS/TEN の回復期では平均 82.5pg/ml であった。(図 2) IL-12/IL-23p40 は健常人で平均 432pg/ml であった。

D. 考察

重症薬疹は、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、Th1 サイトカインの関与が考えられるが、TNF- α による細胞死の誘導のメカニズムが考えられている。一

方で、TNF- α 阻害薬のSJS/TENの治療への応用についてはまだ確立されたものではない。TNF- α 阻害薬は比較的安全に使用できる薬剤であるため、SJS/TENの急性期に用いてもよいと考えられるが、今回の検討では表皮細胞死が少ないDIHSで、むしろTNF- α が高値であり、TNF- α 阻害薬がSJS/TEN に有効となりうるかは不明であった。

E. 結論

今回の検討では症例数がすくないこともあり、TENやDIHSといった薬疹の臨床病型ごとの特徴を検討するには症例数を増やす必要があるが、これらの検討で治療法の確立につなげられる可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 小豆澤 宏明、横見 明典、谷 守、室田 浩之、中山 貴寛、玉木 康博、野口 眞三郎、片山 一郎 【重症薬疹の診断と治療】パクリタキセル投与中にみられた顔面紅斑の2例— Fixed erythroderma plaque — *Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergy* 8巻2号 Page109-113 2014.

2. Hashimoto N, Yamaoka T, Koguchi-Yoshioka H, Tanaka A, Tanemura A, Azukizawa H, Murota H, Kang J, Nakagawa Y, Shimazu T, Katayama I. Development of Necrotising Fasciitis in a Patient Treated for Rheumatoid Arthritis with Tocilizumab. *Acta Derm Venereol.* 95:370-71 2014

3. 小豆澤 宏明 【重症薬疹の診断と治療アップデート】重症薬疹の検査 アレルギー・免疫 1巻8号 Page1240-1246 2014.

4. Chung WH, Chang WC, Lee YS, Wu YY, Yang CH, Ho HC, Chen MJ, Lin JY, Hui RC, Ho JC, Wu WM, Chen TJ, Wu T, Wu YR, Hsieh MS, Tu PH, Chang CN, Hsu CN, Wu TL, Choon SE, Hsu CK, Chen DY, Liu CS, Lin CY, Kaniwa N, Saito Y, Takahashi Y, Nakamura R,

Azukizawa H, Shi Y, Wang TH, Chuang SS, Tsai SF, Chang CJ, Chang YS, Hung SI; Taiwan Severe Cutaneous Adverse Reaction Consortium; Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium. Genetic variants associated with phenytoin-related severe cutaneous adverse reactions. *JAMA.* 2014 Aug 6;312(5):525-34.

5. 小豆澤 宏明【薬物アレルギー—疑うべきポイントと対処法】薬物アレルギーの発症機序 薬事 2014 56巻14号 Page2135-2140

6. Kano Y, Tohyama M, Aihara M, Matsukura S, Watanabe H, Sueki H, Iijima M, Morita E, Niihara H, Asada H, Kabashima K, Azukizawa H, Hashizume H, Nagao K, Takahashi H, Abe R, Sotozono C, Kurosawa M, Aoyama Y, Chu CY, Chung WH, Shiohara T. Sequelae in 145 patients with drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: Survey conducted by the Asian Research Committee on Severe Cutaneous Adverse Reactions (ASCAR). *J Dermatol.* 2015 in press.

2. 学会発表

1. Hiroaki Azukizawa, Kenichi Kato, Ichiro Katayama, Analysis of B cell subsets in severe cutaneous adverse reaction The 6th Drug Hypersensitivity Meeting. Bern Switzerland, April 9-12th 2014

2. 清原 英司, 小豆澤 宏明, 片山 一郎 手掌に繰り返す紅斑と水疱を引き起こしたアセトアミノフェンによる固定薬疹 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 平成26年11月22日 仙台

3. 藤盛 裕梨, 吉岡 華子, 小豆澤 宏明, 片山 一郎 スピール膏貼付にて蕁麻疹が誘発されたアスピリン不耐症の1例 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 平成26年11月22日 仙台

4. 出口 彩香, 田中文, 山岡 俊文, 小豆

澤 宏明, 片山 一朗, 杉尾 勇太 急性汎発性発疹性膿疱症 (AGEP) 様の皮疹を呈した薬剤過敏症候群 (DIHS) の 1 例 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 平成 26 年 11 月 22 日 仙台

5. 山賀 康右 (大阪大学), 花房 崇明, 小豆澤 宏明, 片山 一朗, 小林 真紀, 橋本 直哉 ベバシズマブが誘因と考えられた Perforating dermatosis の 1 例 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 平成 26 年 11 月 22 日 仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
該当ございません。

I. 引用論文

1.Paradisi A, Abeni D, Bergamo F, Ricci F, Didona D, Didona B. Etanercept therapy for toxic epidermal necrolysis. Journal of the American Academy of Dermatology. 2014;71(2):278-83.

図 2

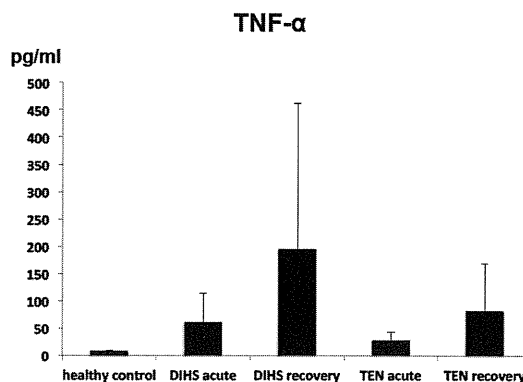
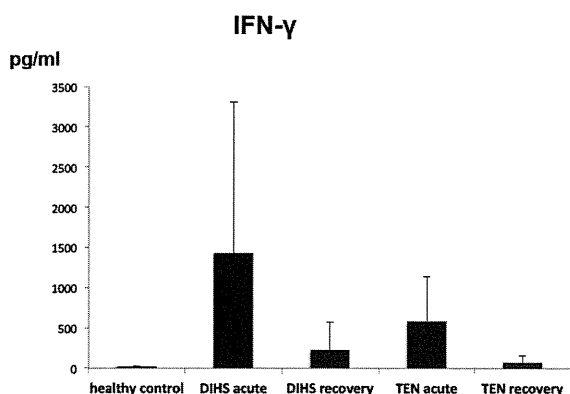


図 1



厚生労働科学研究委託費「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
委託業務成果報告書

重症薬疹における病因的 T 細胞の解析
分担研究者 高橋勇人 慶應義塾大学医学部皮膚科 助教

研究要旨 薬剤性過敏症症候群(DIHS)、中毒性表皮壊死症(TEN)、Stevens-Johnson 症候群(SJS)は経過中に高い致死率を示すことから重症薬疹と考えられている。古くから患者末梢血には薬剤特異的に反応する T 細胞が存在することが知られており、薬剤特異的 T 細胞が重症薬疹の病態において重要であることが、想定される。本研究では薬剤特異的 T 細胞を患者から単離し、その特性を明らかにすることにより、重症薬疹の病態を解明し、疾患克服を目指す。本年度は、薬剤特異的 T 細胞の解析に必要な抗原提示細胞株の複数樹立に成功した。来年度以降、T 細胞の解析をさらに進める予定である。

A. 研究目的

現在、DIHS; 薬剤性過敏症症候群、TEN; 中毒性表皮壊死症、SJS; Stevens-Johnson 症候群の 3 疾患が経過中に高い致死率を示すことから重症薬疹に分類されている。これらの疾患は経過中の高い致死率だけでなく、SJS/TEN では後遺症として高度な眼障害を残す場合や、DIHS では経過中にウイルス感染や自己免疫疾患を合併することが知られており、複雑な病態が想定されている。従来から、患者末梢血には薬剤特異的に反応する T 細胞が存在することが知られており、薬剤特異的 T 細胞が重症薬疹の病態において重要であると考えられてきた。本研究では薬剤特異的 T 細胞を患者から単離し、その特性を明らかにする事により、重症薬疹の病態をより詳細に明らかにし、薬疹の診断や治療に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

1) 抗原提示細胞株の樹立

抗原提示細胞株として EB ウイルスにより不死化した B 細胞株を用いる。感染させる EB ウイルスの調整のため、B958 細胞株を培養し、その培養上清を 40 μ m フィルターで濾過することで残渣を除去し、EB ウイルス液を調整した。次に患者末梢血から末梢血単核球細胞 (PBMC) を単離し、 2×10^6 個の PBMC を 24-well plate 上で EB ウイルス液、シクロスポリン (最終 0.5 μ g/ml) と混合して、培養する。2 週間後にコロニー形成を確認後、培養スケールを徐々に上げ、

細胞株を樹立する。

2) 薬剤特異的 T 細胞株の樹立

患者末梢血から PBMC を単離し、 2×10^6 個の PBMC を 24-well plate 上で、10%自己非働化血清含有 RPMI 中に原因薬剤を添加し培養する。培養 14 日目に放射線照射処理を行った 1×10^6 個の EBV 不死化 B 細胞株と薬剤抗原を添加し、再度刺激を行う。培養 28 日目に EBV 不死化 B 細胞株を用いて再刺激すると同時に、培養細胞を CFSE で標識し、薬剤特異的細胞分裂能を評価する。薬剤特異的反応を確認後、限界希釈法にて培養細胞から薬剤特異的 T 細胞クローン株を単離する。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、慶應義塾大学医学部の倫理委員会に研究計画を提出し、その承認を得ている(承認番号 20110133)。また分担医師から試料提供者への研究内容の説明をした後に、倫理委員会で検討、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

1) 抗原提示細胞株の樹立

B958 細胞株から調整した EB ウイルス液はヒト PBMC に効率良く感染し、高率にコロニー形成を誘導した。現在までに、DIHS 患者 4 例、SJS 患者 1 例の EBV 不死化 B 細胞株の樹立に成功した(表 1)。

表1 EBV不死化B細胞株の樹立を達成した症例

薬疹病型	原因薬剤
DIHS	バクタ
DIHS	エクセグラン
DIHS	ラミクター
DIHS	テグレート
SJS	ジェニナック

2) 薬剤特異的 T 細胞株の樹立

上記合計 5 例の患者のうち、新鮮な末梢血検体を得る事が可能であった DIHS1 例の PBMC を原因薬剤であるエクセグランで培養を開始した。その結果、培養細胞中にコロニーの形成を確認し、薬剤特異的な細胞増殖を起こしている可能性が示唆された。

D. 考察

本年度の研究を通じて、重症薬疹における T 細胞培養における基礎的な準備が整った。また T 細胞培養系を確立できたことで、次年度以降に、T 細胞クローン株を樹立できる状況に近づけた。

本研究は、まだ解析結果を得る準備段階にあるが、確実に結果を得るべく進展している。

E. 結論

重症薬疹における、薬剤特異的 T 細胞のクローン株樹立のための準備を整えた。

来年度以降、重症薬疹の病態解明に向けて、薬剤特異的 T 細胞の解析を行って行く。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1. Takeya Adachi, Hayato Takahashi, Takeru Funakoshi, Hiroyuki Hirai, Akihiko Hashiguchi, Masayuki Amagai and Keisuke Nagao: Comparison of basophil activation test and lymphocyte transformation test as diagnostic assays for drug hypersensitivity. DHM6, Bern, Switzerland. 2014.4.

2. 八代聖, 本田皓, 足立剛也, 船越建, 高橋勇人, 天谷雅行: ゾニサミド内服早期に発症した薬剤性過敏症症候群の1例. 第856回日本皮膚科学会東京地方会 城西地区, 東京, 2014年9月20日.

3. 足立剛也, 高橋勇人, 橋口明彦, 平井博之, 永尾圭介: 薬剤性過敏症症候群長期フォローアップにおける免疫動態の解析-薬剤リンパ球刺激試験と末梢血 CD4/8 比の有用性-. 第 44 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2014.11.

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

厚生労働科学研究委託費「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
委託業務成果報告書

重症薬疹治療薬の実用化において留意すべき事項

分担研究者 荒戸 照世 北海道大学医学研究科レギュラトリーサイエンス部門 教授

研究要旨 スチーブンス・ジョンソン症候群（以下、SJS）及び中毒性表皮崩壊症（以下、TEN）の治療方法として、ステロイド剤の全身療法では効果が不十分な場合にはヒト免疫グロブリン製剤静注（以下、IVIG）療法等を考慮することとされているが、国内外において SJS 及び TEN の効能・効果で承認された IVIG 製剤はなかった。2014 年 7 月に乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン（販売名：献血グロベニン-I 静注用）が「SJS 及び TEN」の効能・効果で承認されたことから、承認申請に用いられたデータパッケージを踏まえ、重症薬疹モデル動物を用いて治療薬を開発する場合の留意点を明確にした。

A. 研究目的

スチーブンス・ジョンソン症候群（以下、SJS）及び中毒性表皮崩壊症（以下、TEN）は発熱、前身の皮膚多形紅斑、粘膜障害を特徴とし、致命的な転機を辿る場合もある重篤な全身性疾患である。SJS 及び TEN の治療方法は、「SJS 及び TEN 治療指針 2009」において、早期の副腎皮質ステロイド剤の全身療法が第一選択とされているが、ステロイド剤の全身療法では効果が不十分な症例も存在する。そのような場合にはヒト免疫グロブリン製剤静注（以下、IVIG）療法、血漿交換療法を考慮することが記載されているが、国内外において SJS 及び TEN の効能・効果で承認された IVIG 製剤はなかった。2014 年 7 月に乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン（販売名：献血グロベニン-I 静注用）が「SJS 及び TEN（ステロイド剤の効果不十分な場合）」の効能・効果で承認されたことから、承認に必要とされるデータパッケージについて検討し、重症薬疹モデル動物を用いて治療薬を開発する場合の留意点を明確にすることを目的とした。

B. 研究方法

医薬品医療機器総合機構（PMDA）の HP 上で公開されている乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン（販売名：献血グロベニン-I 静注用）審査報告書

http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/P201400115/530277000_22100AMX01034_A100.pdf

及び申請資料概要

<http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/P201400115/index.html> を基に、承認に必要とされる資料内容について検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は報告書、文献等、公開資料を用いて行うものであり、相手方の同意・協力を必要とする研究、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究、生命倫理・安全対策に対する取り組みを必要とする研究など法令に基づく手続きが必要な研究は含まれない。

C. 研究結果

乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリンの申請に用いられたデータパッケージは、臨床に関する資料のみで構成されており、薬理試験を含む非臨床試験成績は添付されていなかった。提出された臨床資料は、国内第Ⅲ相試験 1 試験と公表文献等であった。

国内第Ⅲ相試験として、ステロイド剤効果不十分な SJS 又は TEN 患者（目標例数 10 例）を対象とした非盲検非対照試験が実施されていた。主要評価項目は、治療薬投与 7 日目における病勢評価スコア（眼病変、口唇／口腔内病変、皮膚病変、全身所見をそれぞれ 4 段階あるいは 7 段階で評価しスコア化）を用いた有効率であり、副次評価項目として病勢評価スコアを用いた有効率（4、10、20 日目）、病勢評価スコア（合計、各項目のスコア）、皮膚剥離面積、紅斑の面

積であり、その他の評価項目として転帰情報、角結膜上皮欠損について評価されていた。

有効性に関する主たる文献すべてにおいて、IVIG 製剤が投与されていない症例（ステロイド剤のみの投与等）との比較がなされていた。これらの文献のうち、死亡を評価したものが 6/7 報、入院期間 3/7 報、進行停止までの期間 2/7 報、上皮化／創傷治癒までの期間 2/7 報、ステロイドテーパリングまでの期間 1/7 報、病変面積の変化量 1/7 報（重複あり）であった。

D. 考察

乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリンの SJS 及び TEN の効能追加にあたり、薬理試験成績は添付されていなかった。IVIG 療法がガイドラインに記載され適応外使用されてきた実態があることに加え、本研究の分担研究者である阿部が述べているとおり、重症薬疹モデル動物の作成が困難であったことが理由の一つであると考えられた。阿部らにより重症薬疹モデルが確立されたことにより、臨床使用経験のみに根拠を求めることなく、種々の化合物の SJS 及び TEN に対する開発可能性が広がることが想定された。

薬疹モデルにより臨床効果を完全に予測することは困難であるものの、モデルを用いた非臨床試験において、臨床試験及び文献報告で検討されていた死亡、眼病変、口唇／口腔内病変、皮膚病変、全身所見等に関して十分評価するとともに適切な対照群をおいて検討する必要があると考えた。

E. 結論

乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリンの「SJS 及び TEN」の効能追加の承認申請に用いられたデータパッケージを踏まえ、重症薬疹モデル動物を用いて治療薬を開発する場合に評価すべき項目を検討した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 荒戸照世, 佐藤典宏:アカデミアにおけるトランスレーショナル・リサーチの現状と課題. バ

イオサイエンスとインダストリー 2014;72(4): 334-338

2. 学会発表

1. 荒戸照世, 金子真之, 前田浩次郎, 成川衛:日本で承認された患者数が特に少ない希少疾病用医薬品の臨床データパッケージについて. 第4回レギュラトリーサイエンス学会学術集会, 東京, 平成26年9月5日

2. 前田浩次郎, 金子真之, 成川衛, 荒戸照世:患者数が特に少ない希少疾病用医薬品の臨床評価のポイントについて. 第35回日本臨床薬理学会学術総会, 松山, 平成26年12月6日

3. 荒戸照世:実用化研究はレギュラトリーサイエンスの実践教育. 日本薬学会135年会, 神戸, 平成27年3月27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

Ⅲ. 学会等発表実績

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「重症薬疹における特異的細胞死誘導受容体をターゲットにした新規治療薬開発」

機関名 国立大学法人北海道大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Novel pathway of keratinocyte death in SJS/TEN.	Abe R	Drug Hypersensitivity Meeting 6 Bern Switzerland	2014. 4	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
A novel necroptosis pathway of annexin A1/FPR1 interaction in severe cutaneous adverse drug reactions.	Saito N, Qiao H, Yanagi T, Shinkuma S, Suto A, Fujita Y, Suzuki S, Nomura T, Nakamura H, Nagao K, Obuse C, Shimizu H, Abe R:	Sci Transl Med 16:245-95	2014. 6	国外
Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions.	Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Chuganji Y, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuizaka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N, NORTE Study Group:	Hepato Res (in press)	2014. 9	国外

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「重症薬疹における単球と制御性T細胞の相互作用」

機関名 学校法人杏林大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Monocytes control Treg in severe drug eruptions.	Shiohara T	Drug Hypersensitivity Meeting 6 Bern Switzerland	2014. 4	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Crucial role of viral reactivation in the development of severe drug eruptions: a comprehensive review.	Shiohara T, Ushigome Y, Kano Y, Takahashi R:	Clin Rev Allergy Immunol (in press)	2014. 4	国外
International consensus on drug allergy.	Demoly P, Adkinson NF, Brockow K, Castells M, Chiriac AM, Greenberger PA, Khan DA, Lang DM, Park HS, Pichler W, Sanchez-Borges M, Shiohara T, Thong BY:	Allergy 69:420-437	2014. 4	国外
The dynamics of herpesvirus reactivation during and after severe drug eruptions: their relation to the clinical phenotype and therapeutic outcome.	Ishida T, Kano Y, Mizukawa Y, Shiohara T:	Allergy 69:798-805	2014. 6	国外
Regulatory T cells in severe drug eruptions.	Shiohara T, Takahashi R, Ushigome Y, Kano Y:	Curr Immunol Rev 10:41-50	2014. 10	国外
Fixed drug eruption.	Shiohara T	Up To Date 2014. 10. 16	2014. 10	国外

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目 「FPR1に対するアンタゴニスト検索・スクリーニング用細胞の樹立
FPR1アンタゴニストのリード化合物の探索」

機関名 国立大学法人東京大学

1. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Bioluminescent tools for the analysis of G-Protein-Coupled receptor and arrestin interactions.	Hattori M, Ozawa T:	RSC Adv (in press)	2015.1	国外
Cell-Based assays and animal models for GPCR drug screening.	Takakura H, Hattori M, Tanaka M Ozawa T:	Methods Mol Biol 1272:257-270	2015	国外

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「重症薬疹モデルマウスの作成と病態機序の解析」

機関名 国立大学法人京都大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Regulation of cutaneous immune homeostasis, by balance between regulatory T cells and effector T cells in a newly developed GVHD-like model.	Saeko Nakajima, Kenji Kabashima:	43th Annual meeting of Japanese society for immunology Kyoto	2014.12	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Stevens-Johnson syndrome associated with mogamulizumab-induced deficiency of regulatory T cells in an adult T-cell leukaemia patient.	Honda T, Hishizawa M, Kataoka TR, Ohmori K, Takaori-Kondo A, Miyachi Y, Kabashima K:	Acta Derm Venereol (in press)	2014.11	国外
DIHS/DRESS with remarkable eosinophilic pneumonia caused by zonisamide.	Shibuya R, Tanizaki H, Nakajima S, Koyanagi I, Kataoka TR, Miyachi Y, Kabashima K:	Acta Derm Venereol 95:229-230	2015.1	国外

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「症型薬疹のバイオマーカーの検討および薬剤とHLAの結合親和性についての検討」

機関名 学校法人昭和大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Association between HLA-B*13:01 and DIHS/DRESS due to dapson in a Japanese patients of pityriasis lichenoides et varioliformis acuta (PLEVA).	Watanabe H, Tonooka E, Uno H, Ozeki T, Mushiroda T, Sueki H:	6th Drug hypersensitivity meeting Bern Switzerland	2014. 4	国外
シアナマイドによる紅皮症型薬疹の1例.	山本蘭, 阿部典子, 渡辺秀晃, 宇野裕和, 末木博彦:	日本皮膚科学会第854回東京地方会 東京	2014. 6	国内
誘発に1日量2日間の投与を要したムコダインによる固定薬疹の1例.	笠 ゆりな, 今泉牧子, 北見由季, 渡辺秀晃, 末木博彦, 川那部岳:	日本皮膚科学会第858回東京地方会 東京	2014. 12	国内
薬疹の最新動向と今後の展望.	末木博彦, 渡辺秀晃:	第78回日本皮膚科学会東京支部学術大会 東京	2015. 2	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
TNF- α as a useful predictor of human herpesvirus-6 reactivation and indicator of the disease process in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS).	Uno H, Kabashima K, Tohyama M, Watanabe T, Hashimoto K, Iijima M, Sueki H, Watanabe H:	J Dermatol Sci 74:177-9	2014. 5	国外

Elevated serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) relates to reactivation of human herpesvirus 6 in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS)/drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS).	Ogawa K, Morito H, Hasegawa A, Miyagawa F, Kobayashi N, <u>Watanabe H</u> , Sueki H, Tohyama M, Hashimoto K, Kano Y, Shiohara T, Ito K, Fujita H, Aihara M, Asada H:	Br J Dermatol 171:425-7	2014. 8	国外
Drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms with histologic features mimicking cutaneous pseudolymphoma.	Sueki H, Sasaki M, Kamiyama T, Ohtoshi S, <u>Watanabe H</u> , Nakada T:	J Dermatol 41:856-7	2014. 9	国外
Differential expression profile of Th1/Th2-associated chemokines characterizes Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis (SJS/TEN) and drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DIHS/DRESS) as distinct entities.	Miyagawa F, Hasegawa A, Imoto K, Ogawa K, Kobayashi N, Ito K, Fujita H, Aihara M, <u>Watanabe H</u> , Sueki H, Tohyama M, Asada H:	Eur J Dermatol (in press)	2014. 12	国外
Sequelae in 145 patients with drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: survey conducted by the asian research committee on severe cutaneous adverse reactions (ASCAR).	Kano Y, Tohyama M, Aihara M, Matsukura S, <u>Watanabe H</u> , Sueki H, Iijima M, Morita E, Niihara H, Asada H, Kabashima K, Azukizawa H, Hashizume H, Nagao K, Takahashi H, Abe R, Sotozono C, Kurosawa M, Aoyama Y, Chu CY, Chung WH, Shiohara T:	J Dermatol (in press)	2015. 1	国外

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「中毒性表皮壊死症の表皮壊死におけるhyperthermiaとサイトカインの役割」

機関名 国立大学法人愛媛大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Endoplasmic reticulum stress-induced keratinocyte necrosis is a new mechanism of epidermal cell death in SJS/TEN.	Tohyama M, Dai X, Shiraishi K, Murakami M, Sayama K:	The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Osaka	2014. 12	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
TNF-alpha as a useful predictor of human herpesvirus-6 reactivation and indicator of the disease process in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS).	Uno H, Kabashima K, Tohyama M, Watanabe T, Hashimoto K, Iijima M, Sueki H, Watanabe H:	J Dermatol Sci 74:177-179	2014. 3	国外
Elevated serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) relates to reactivation of human herpesvirus 6 in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS)/drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS).	Ogawa K, Morito H, Hasegawa A, Miyagawa F, Kobayashi N, Watanabe H, Sueki H, Tohyama M, Hashimoto K, Kano Y, Shiohara T, Ito K, Fujita H, Aihara M, Asada H:	Br J Dermatol 171:425-427	2014. 8	国外