

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年9月24日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791086

研究課題名（和文）血症交換療法の確立のための奏効機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of action for establishing novel strategies of plasmapheresis

研究代表者

平原 和久（HIRAHARA KAZUHISA）

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：90360106

研究成果の概要（和文）：血漿交換は重症薬疹や水疱症の治療において最も有用な治療手段である。しかし、その作用機序に関しては不明な点が多い。本研究において、我々は血漿交換やステロイドパルス療法前後の血清中の様々なサイトカインレベルや末梢血中の regulatory T cell (Treg) を測定することにより、何故血漿交換がこれらの疾患において最も有用なのかを明らかにしたいと考えた。血漿交換の方法は水疱症においては主に二重膜濾過法 (DFPP) を、重症薬疹においては主に全血漿交換 (PE) と DFPP を用いた。結果は、血清中の IL-10 レベルが血漿交換の効果と最も良く相関しており、血清中の IL-10 を測定することが、むしろ薬疹よりも水疱症においてよりこの治療の効果を予期するのに有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Plasmapheresis (PP) is one of the most effective option for treatment of severe drug eruption and autoimmune blistering disorders. The mechanism of action of PE in these diseases as in other autoantibody-mediated disease remains unknown. In this study, we asked whether alterations of serum cytokine levels and regulatory T cells (Treg) after PE or corticosteroid pulse therapy could be the mechanism of why PE is a much more effective option for treatment of severe drug eruptions and recalcitrant autoimmune diseases than other options. In autoimmune blistering disorders, double-filtration plasmapheresis (DFPP) has been predominantly used, while serum exchange (PE) has been more frequently used for severe drug eruptions than DFPP. We found that high levels of serum IL-10 after PP was associated with its remarkable efficacy in both disease conditions and that serum IL-10 levels may be a more valuable biomarker to identify patients likely to respond to PP in autoimmune blistering disorders than in severe drug eruptions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：水疱症、重症薬疹、血漿交換、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚科領域において重症薬疹や水疱症で

は多くの生命が奪われている。しかし、これらの疾患における初期治療はステロイドの

投与が第一選択となるが、ステロイドに抵抗を示す症例ではその後の治療法が確立されていない。以前よりステロイドに抵抗性の水疱症に対し血漿交換療法の報告が見られるが、血漿交換法には単純血漿交換法(PE)と二重膜濾過血漿交換法(DFPP)があり、そのどちらにも有用であったとの報告がある(Lee J B et al; J Dermatol, 30(4), 326-31, 2003)。そのため、当院でも類天疱瘡や尋常性天疱瘡といった水疱症に対し血漿交換を行い、様々な結果が得られている。一方、重症薬疹における治療効果は目覚ましく、その効果はステロイド・パルス療法や免疫グロブリン療法(IVIG)でも軽快が得られなかった難治症例に対しても有効であり、現時点におけるこれら難治性疾患の治療法としては最も優れたものと言える。しかし、これまで血漿交換療法が広く用いられてきた割に、血漿中の炎症性サイトカインや蛋白の除去以外の作用機序は殆ど不明であり、血漿交換療法における二種類の方法をどのように選択し、どのような治療間隔で行うのが良いのかというガイドラインの確立には程遠い状況である。この原因として、治療施設が限られている点と本法は重症薬疹など緊急性の高い状況で行われることが多いため、評価に耐えるようなタイミングでのサンプルの採取が難しいことがあげられる。

## 2. 研究の目的

血漿交換療法は多くの難治性疾患の治療として用いられ、高い有効性を示しているが、作用機序は不明である。しかもPEとDFPPの二種類の方法が患者にどのような影響の違いを与えるかについての検討はほとんどなく、明確な選択基準がないまま使用されているのが現状である。本研究では、重症薬疹や水疱症の治療としてPEとDFPPを用いた際、免疫反応がどのような影響を受けるかについて、主にサイトカイン反応とregulatory T細胞(Treg)の反応を中心に解析する。最終的に、血漿交換療法の臨床効果を最も反映する因子を決定することにより、血漿交換のどの方法を、どのような治療間隔で行うことが最も効果的に皮疹を軽快させるかを明らかにし、標準的な血漿交換療法の確立に結びつけたいと考えている。

重症薬疹や水疱症において、PE、DFPP前後に血清、血漿、末梢血リンパ球(PBMC)を採取し、そのサイトカインレベル、リンパ球分画のサイトカイン産生能や皮膚へのホーミングに必要な接着分子の発現などを多角的に検討する。特に重点をおくのはPE、DFPP前後で得られた血清のサイトカインレベルとTregの数とその抑制能である。Tregの抑制能に関しては、Teffのサイトカイン産生や増殖反応をTregがどの程度抑制するかをみる

ことにより測定し、血漿交換前後で比較する。

## 3. 研究の方法

我々は中毒性表皮壊死症(TEN)、Stevens-Johnson症候群(SJS)、drug-induced hypersensitivity syndrome(DIHS)等の重症薬疹の他、天疱瘡、類天疱瘡患者に血漿交換を行った際の前後の血清とリンパ球を保存している。それらの血清を用いてサイトカインのレベルを血漿交換の前後で検討する。血漿交換療法の種類については、重症薬疹と水疱症で選択に偏りがある。その理由として、過去のPEとDFPP施行によるサイトカインレベルの検討において、PEでは多くの炎症性サイトカインが除去されるのに対し、DFPPでは除去が十分ではなく一部のサイトカイン産生は逆に亢進してしまうというデータが得られているからである。そのため、我々の施設では炎症性サイトカインが原因と考えられる重症薬疹においては主としてPEを選択するのにに対し、水疱症は緊急性が重症薬疹ほどではない自己免疫疾患であり、多量の新鮮血漿を必要とするPEには多くの問題があり、患者の負担も大きいため、全例でDFPPを施行している。どちらの疾患でも血漿交換は2~3日間連続で施行している。検体の採取は血漿交換施行直前と施行翌日に行い、血漿中のサイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ )を測定する。サイトカインはフローサイトメトリーの技術を用いたマルチプレックスアッセイシステムにより測定する。この値の変動が、臨床効果や自己抗体価(水疱症の場合)とどのように関係するかについても検討する。これと平行してPBMC中のTregの頻度とその抑制機能を測定する。

測定した多数のサイトカインのうち、どれが最も臨床的な治療効果を反映するか、Tregの数、機能はそのサイトカインレベルとどのように相関するかを明らかにし、どの病態には、どのような血漿交換の方法を、どのような間隔で行うことで最も治療効果が上がるかを決定したいと考えている。このような検討はワンポイントで行っても殆ど意味がなく、一つの症例につき経時的に検討したデータを集積することで、初めて治療のガイドラインの確立に結びつくと考えられる。

## 4. 研究成果

今回の対象疾患である水疱症と重症薬疹では通常ステロイドの中等量-多量の全身投与が行われている。その後、このステロイド治療に抵抗性で追加療法の必要な症例に対し、ステロイド・パルス療法、あるいはそれに加えて血漿交換療法を施行している。そのため、パルス療法や血漿交換前のサイトカインレベルは既にステロイドの影響を受けた

状態であるが、ステロイド投与前の血清についても検討を行った。

重症薬疹ではステロイドの全身投与にも拘わらず、増悪傾向が見られた症例にステロイド・パルス療法か血漿交換療法を用いているが、パルス療法で奏効しなかった症例でも血漿交換療法後（とくに PE）に軽快が得られている。実際、重症薬疹においては血漿交換療法前に TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IFN- $\gamma$  等の炎症サイトカインの上昇が認められたが、パルス療法後では殆どのサイトカインが減少していた。それに加え、IL-10 の減少も認められた。これらのサイトカインの変動は、ステロイドの全身投与のみで血漿交換法を施行していない重症薬疹においても、発症期と回復期と比較したところ、パルスや血漿交換療法の施行前後に比べ変動幅は低いものの、同様の変化を示した。しかし血漿交換（とくに PE）ではステロイド・パルスと異なり、IL-10 レベルの上昇が見られた。しかしこれも数日血漿交換を繰り返す方が上昇しやすく、その上昇も 1 週間以内に再び低下してしまうことも分かった。PE と DFPP でも差が認められ、後者では単球由来の炎症性サイトカインが一時的に上昇し、それが DFPP の臨床効果の低さをある程度反映する結果となっていた。DFPP では脱血した血液を血漿分離器にて血球成分と血漿成分に分けるが、その後血漿成分は破棄せず、血漿成分を二次膜で膜孔より一定の分子量（アルブミンやグロブリン等）を除去し、再び患者へ送血する。その結果、分子量の小さいサイトカインの多くは理論的にほとんど除去できないこととなる。実際、炎症性サイトカインは DFPP の前後で除去されずに、逆に膜に触れることで単球が活性化され IL-8 や TNF- $\alpha$  の増加が認められた。つまり重症薬疹では DFPP より PE を選択する方が良く、その臨床効果をモニターするためには、PE 直後の血清中の IL-10 レベルを測定することが有用で、その治療間隔は 1 週間以内とするべきであると考えられた。

一方、水疱症でもステロイド抵抗性の症例に DFPP を 2~3 日連続で施行しているが、重症薬疹と異なり複数回繰り返すことで軽快する症例が多い。そのため、同一患者で臨床効果の違いに応じたサイトカインの変動を検討出来た。血漿交換が著効した症例では重症薬疹と同様に IL-10 の著明な上昇が見られた。この IL-10 の上昇は重症薬疹よりも遙かに著明であり、臨床効果や自己抗体価の低下の程度と良く関連していた。水疱症の治療効果の目安として自己抗体のレベルが用いられるが、血清中の IL-10 レベルはその変動よりさらに鋭敏に治療効果、予後と関連していた。

IL-10 の上昇の機序として、血漿交換により IL-10 産生性 regulatory T 細胞 (Treg) が

活性化され、数の上での増加に加え、低下していた機能の回復をもたらされた事を示唆する結果が得られた。また血漿交換は単球からの IL-10 産生を高めることも分かった。血漿交換療法はサイトカインの除去だけでなく、抑制性サイトカインの産生増加、Treg の頻度の増加、機能の回復も重要な作用機序の一つと考えられた。

結論として、DFPP にて有効であった水疱症と PE を施行した重症薬疹において、IL-10 の上昇が共通して認められた。特に、水疱症においては DFPP が著効した症例で IL-10 の上昇が著明で、効果と IL-10 の上昇の程度が関連していた。重症薬疹においては、PE が著効した症例でも IL-10 の上昇が軽度にとどまる場合があり、IL-10 レベルのみでは治療効果や予後の判定に十分とは言えなかった。そのため、重症薬疹では血清中の IL-10 レベルに加え、Treg の数や機能を合わせて調べる必要があると考えられた。それに対して、水疱症では自己抗体に加えて血清中の IL-10 を頻回に測定することにより、いつ DFPP を行うか、何回繰り返すべきかなどの治療計画を立てることが容易になると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. 平原和久: 皮膚科医が知っておくべき新しい疾患や治療法 免疫再構築症候群. 日皮会誌 121:3073-3075, 2011. (査読有)
2. 平原和久: 薬疹の最先端—最新の概念・病態・治療 重症薬疹の最新治療. 医学のあゆみ 238(7,8):793-797, 2011. (査読有)
3. 平原和久: 重症薬疹の診断と治療 重症薬疹のステロイドの使い方. 日皮会誌 120:2578-2581, 2010. (査読有)
4. Hirahara K, Kano Y, Mizukawa Y, Takahashi R, Kimishima M, Shiohara T: Differences in immunological alterations and underlying viral infections in two well-defined severe drug eruptions. Clin Exp Dermatol 35:863-868, 2010. (査読有) doi:10.2340/00015555-1417
5. Kano Y, Ishida T, Hirahara K, Shiohara T: Visceral involvements and long-term sequelae in drug-induced hypersensitivity syndrome. Med Clin North Am 94:743-759, 2010. (査読有) doi:10.1016/j.mcna.2010.03.004

[学会発表] (計 4 件)

1. 平原和久:薬疹本音トーク 初期に薬疹を疑わず、経過中もステロイドの投与を行わず死に至ってしまったDIHSの1例. 第41回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、山梨、2011年7月17日.
2. Kano Y, Ishida T, Hirahara K, Shiohara T: Autoimmune diseases are sequelae of drug-induced hypersensitivity syndrome. 22th World Congress of Dermatology, Seoul, May 27, 2011.
3. Hirahara K, Kano Y, Shiohara T: Cytomegalovirus reactivation in severe drug eruptions. The First Eastern Asia Dermatology Congress, Fukuoka, Oct.1. 2010.
4. 平原和久、佐藤典子、稲岡峰幸、塩原哲夫:血漿交換によりステロイドの効果が減弱した toxic epidermal necrolysis の1例. 日本皮膚科学会第831回東京地方会(合同臨床地方会)、東京、2010年7月10日.

[図書] (計1件)

1. 平原和久 : DIHS の死亡例の特徴. 診る・わかる・治す 皮膚科臨床アセット 2 薬疹診療のフロントライン. 古江増隆、相原道子編、東京、中山書店、2011、p. 128-131.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

平原 和久 (HIRAHARA KAZUHISA)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号 : 90360106

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし