

令和元年6月18日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16342

研究課題名(和文)重症薬疹の早期診断法の開発

研究課題名(英文)Development of early diagnostic method of severe drug eruption

研究代表者

難波 千佳(Namba, Chika)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50736139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ニトロセルロースメンブレンを皮膚表面に貼付し経皮的に炎症性サイトカインの検出を行うskin blotting法を用いて、炎症性皮膚疾患においてサイトカインの検出を試みた。具体的には、多型紅斑・固定薬疹・Stevens-Johnson症候群・薬剤過敏症候群・中毒性表皮壊死症・多形慢性痒疹などにおいてTNF- とIFN- などのサイトカインの検出を行った。疾患ごとに検出されるサイトカインの差について検討し、生検皮膚の病理診断で確認された皮膚障害の程度との相関の有無を検討した。結果としては、皮膚障害のgradeの高い症例では、病変と非病変部においてサイトカインの検出に差がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症薬疹は早期診断が重要となる疾患であるが、多型紅斑型の発疹が、Stevens-Johnson症候群や中毒性表皮壊死症のような重症薬疹へ進展するかどうかは臨床所見のみでは鑑別は困難である。また、早期診断に有用な血中のバイオマーカーは未だないことから、診断と評価には皮膚生検が不可欠である。今回行ったskin blotting法による経皮的なサイトカインの検出により、皮膚障害の重症度を予測することが可能となれば、侵襲度の高い皮膚生検を行わず、非侵襲的な方法で重症薬疹の早期診断を行うことが可能となるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：There is a technique referred to as “skin-blotting” to measure the amounts of percutaneously expressed cytokines by putting the nitrocellulose membrane on the lesional skin. We analyzed the cytokines such as TNF- and IFN- on the lesional skin of the inflammatory skin diseases and examined the correlation with the degree of skin damages based on the histopathological diagnosis. We investigated if the evaluation of the cytokines detected by the skin-blotting is useful for the early diagnosis or identification of the severity of erythema multiforme, fixed drug eruption, Stevens-Johnson syndrome, drug-induced hypersensitivity syndrome, toxic epidermal necrolysis, and prurigo chronica multiformis. Then, we detected the differences between the lesional and non-lesional skins of severe patients.

研究分野：乾癬、薬疹

キーワード：skin blotting法 炎症性皮膚疾患 TNF- IFN-

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) Stevens-Johnson症候群、中毒性表皮壊死症は重症薬疹であり、早期診断が重要となる疾患である。しかし、多形紅斑型の発疹が、Stevens-Johnson症候群、中毒性表皮壊死症へ進展するかどうかを臨床所見のみで鑑別することは困難である。これまでに血液中のバイオマーカーについても種々の検討がなされているが、早期診断に有用な決定的なものは未だない。診断と評価には皮膚生検が不可欠であるが、早期診断に必要な迅速病理診断を行える施設は限られている。また、皮膚生検は侵襲を伴う検査であるため、検査が行えない場合もある。

我々はこれまでにStevens-Johnson症候群と中毒性表皮壊死症の表皮障害のメカニズムを研究してきたが、これらの疾患の表皮障害にはサイトカインが重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。多形紅斑、Stevens-Johnson症候群、中毒性表皮壊死症は、表皮がターゲットとなる疾患であり、いずれも早期病変は種々の程度のinterface dermatitisを示すが、Stevens-Johnson症候群や中毒性表皮壊死症では表皮の変性壊死の始まりが確認される。免疫染色で検討を行うと、多形紅斑では主にIFN- $\gamma$ が表皮に作用しているが、Stevens-Johnson症候群や中毒性表皮壊死症ではIFN- $\gamma$ に加えTNF- $\alpha$ が表皮に強く作用していることが明らかとなった。IFN- $\gamma$ とTNF- $\alpha$ はほとんどの炎症性皮膚疾患で発現しているサイトカインではあるがStevens-Johnson症候群、中毒性表皮壊死症では、CD16を発現する単球が表皮から表皮真皮結合部に多数浸潤しており、通常の皮膚炎とは桁違いの高濃度のTNF- $\alpha$ に暴露されていると考えられる (Tohyama M, et al. Br J Dermatol, 2012)。我々はin vitroの検討で、IFN- $\gamma$ とTNF- $\alpha$ の組み合わせが、表皮にnecrosisを誘導することを明らかにした。以上のことから、Stevens-Johnson症候群や中毒性表皮壊死症に進展する多形紅斑ではTNF- $\alpha$ がより多く検出されることが予想され、また、TNF- $\alpha$ の検出がStevens-Johnson症候群と中毒性表皮壊死症の早期診断に有用である可能性が示唆される。

(2)ここで我々は、皮膚にニトロセルロースメンブレンを貼付して可溶性蛋白をメンブレンに吸着し、免疫染色を用いて吸着された蛋白を検出するskin blotting法について注目した。この方法は、東京大学医学系研究科・創傷看護分野の真田弘美教授と峰松健夫博士らのグループにより開発された。彼らは、FITC 標識デキストラン (F-Dex) を徐放するアガロースゲルを背部皮下に埋入したマウスにニトロセルロースメンブレンを貼付すると、経表皮あるいは経毛包ルートで排出されたF-Dexが注入濃度に依存してメンブレンに検出されることを見だし、UVB照射マウスの皮膚においても照射量に依存してメンブレンにTNF- $\alpha$ が検出されることを確認した (Minematsu, et al., Adv Skin Wound Care, 2014)。ヒトにおいては、高齢者の脆弱な皮膚ではtype IV collagenとmatrix metalloproteinase-2が減少しTNF- $\alpha$ が増加していること (Koyano, et al., Int Wound J, 2014)、肥満の程度と相関して皮膚のTNF- $\alpha$ が増加していること (Minematsu, et al., Adv Skin Wound Care, 2014)をskin blotting法により確認して報告している。Skin blotting法は現在ではkit化されており、貼付するニトロセルロースメンブレンは1x1cm大と小さく、貼付時間は10分であり、侵襲がない点で非常に魅力的な検査方法といえる。

### 2. 研究の目的

本研究では、炎症性皮膚疾患においてIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ の検出をskin blotting法で行い、検出度を評価するとともに、疾患との相関について検討する。その上で、skin blotting法がTNF- $\alpha$ の関与が知られているStevens-Johnson症候群や中毒性表皮壊死症などの重症皮膚疾患の早期診断の侵襲のない検査方法となるか検討する。また、ニトロセルロースメンブレン貼付により、サイトカインが経皮的に検出されるメカニズムについて検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 炎症性皮膚疾患におけるskin blottingによるサイトカインの検出

経皮的なサイトカインの検出に影響を強く与える可能性のある、1)バリア機能が元々障害されているアトピー性皮膚炎、魚鱗癬などの疾患、2)厚い鱗屑・角層を有する尋常性乾癬などの炎症性角化性病変、3)浸出液を伴うあるいは水疱を形成する病変、4)感染性病変を除外し、対象とする疾患は、水疱性類天疱瘡の紅斑部位、多型慢性痒疹の紅斑部位、結節性紅斑、多形紅斑、Stevens-Johnson症候群、中毒性表皮壊死症、中毒疹とする。各疾患につき5例以上、総数30例程度を目標とする。

いずれの疾患も病変と非病変部位に、1x1cm大のニトロセルロースメンブレンを10分間貼付してサンプルを回収する。病変と非病変部位は、近傍あるいは左右対称にあたる部位とし、角層の厚い掌蹠を除外し、紫外線の暴露を受けない部位を選択する。また、テープによる接触皮膚炎の既往を有するものは、対象から除外する。

ニトロセルロースメンブレンのskin blotting kitは、東京大学医学系研究科・創傷看護分野・峰松健夫博士により提供を受ける。Skin blotting法は侵襲を伴わない検査であるが、愛媛大学倫理委員会の審査を受けた説明文書を用いて説明し、患者の同意を文書で得て実施する。採取したサンプルは4℃で保存し、メンブレンを抗体を用いて蛍光染色を行い、TNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ を同時に測定する。

## (2) 多形紅斑のskin blotting法と免疫染色による検討

多形紅斑で、Stevens-Johnson症候群や中毒性表皮壊死症に進展する可能性が疑われる場合には、通常、迅速病理診断を目的として皮膚生検を行っており、皮膚生検を行う病変部位と同程度の臨床像を呈する近傍の病変について、skin blotting法を施行する。多形紅斑で診断を行ったあとの生検皮膚を用いて研究を行うことについては、愛媛大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会にて既に承認されている。対象患者には説明文書を用いて説明し、同意をえる。OCT compoundで包埋した凍結皮膚組織を薄切し、スライドガラスに貼付する。冷アセトンで固定後、H2O2で内因性ペルオキシダーゼを不活化する。一次抗体を1時間からover night反応させたあと、二次抗体を反応させる。その後ACE染色で発色する。一次抗体としては、抗TNF- 抗体、抗IFN- 抗体、さらにはTNF- やIFN- で表皮角化細胞に発現が誘導されるHLA-DR、ICAM-1 などに対する抗体を用いる。また、TNF- の産生源であるCD16陽性細胞についても免疫染色を行う。Skin blotting法と免疫染色の結果をそれぞれ定量的に評価し、生検皮膚の病理診断で確認された皮膚障害の程度との相関の有無を検討する。Stevens-Johnson症候群や中毒性表皮壊死症は、年間1例程度しか経験しないが、それらを含めて多形紅斑10例ほどの解析を目標とする。

## 4. 研究成果

### (1) サイトカインの測定

多形紅斑・固定薬疹・Stevens-Johnson症候群・薬剤過敏症症候群・中毒性表皮壊死症・急性汎発性発疹性膿疱症などの薬疹、多形慢性痒疹、水疱性類天疱瘡などにおいて、病変部・非病変部にそれぞれニトロセルロースメンブレンを貼付した。メンブレンは抗体を用いてTNF- とIFN- などのサイトカインの測定を行った。臨床診断名ごとでTNF- とIFN- の検出に一定の傾向はみられなかった。

また、非病変部におけるTNF- とBMI・年齢・性別について検討したが、優位な差は見られなかった。

### (2) サイトカインの検出と皮膚障害の程度の相関

Skin blotting法を施行した時期と同時期の生検皮膚の病理診断で確認された皮膚障害の程度について検討し、skin blotting法の結果と生検部皮膚で確認された皮膚障害の程度との相関の有無を検討した。

皮膚障害のgradeが高い症例のみを抽出し検討すると、病変部と非病変部においてサイトカインの検出に差がみられた。Skin blotting法施行時の発熱、ステロイドの内服の有無で、サイトカインの検出の値に一定の傾向は見られなかった。

### (3) 今後の展望

これまで、炎症性皮膚疾患においてskin blotting法は検討されておらず、非常に興味深い研究である。生検皮膚において皮膚障害のgradeが高い症例において、skin blotting法により病変部・非病変部でサイトカインの検出に差が見られた。さらに症例を蓄積し検討を行う必要があるが、これまで侵襲度の高い皮膚生検を行うことにより皮膚障害の程度の確認を行っていたが、皮膚生検を行わずこのskin blotting法により非侵襲的な方法で皮膚障害の重症度を予測することが可能となる可能性がある。

さらなる今後の検討課題として、表皮障害が強くなるとサイトカインを検出しやすくなる可能性があるため、三次元培養皮膚を用いてニトロセルロースメンブレンに経皮的にサイトカインが吸着されるメカニズムについて明らかにする必要があると考えている。

また、このskin blotting法が、重症多形滲出性紅斑の早期診断の侵襲のない検査方法となるかどうかを最終目的として、炎症性皮膚疾患において経皮的に検出されたサイトカインの意義についてさらに検討するために、生検皮膚組織、血清におけるサイトカインとの相関などについても検討を行いたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

— Namba C, Tohyama M, Murakami M, Yoshida T, Ugumori T, Hato N, Tano T, Hamakawa H, Kojima Y, Nishina T, Monden N, Fujita H, Sayama K.  
Relationships between cetuximab-induced anaphylaxis and specific antibodies against allergen and tick-transmitted infections, *J cutan Immunol Allergy*, 2018; 1: 58-63.  
DOI: 10.1002/cia.12016. 査読有

— Miyoshi S, Nagao T, Kukida M, Miyoshi KI, Namba C, Kitazawa S, Nakamura Y, Hamaguchi N, Higaki J.  
A case of pulmonary Hemorrhaging as a Fatal Complication of IgA vasculitis, *Intern Med*, 2018; 57: 3141-3147.

DOI: 10.2169/internalmedicine.0817-18. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

難波千佳 他、セクキヌブ投与中に IgA 腎症を発症した乾癬性関節炎の 1 例、第 33 回日本乾癬学会学術大会 (2018)

難波千佳 他、KL-6 上昇のためにバイオスイッチを 2 回行った乾癬性関節炎の 1 例、第 117 回日本皮膚科学会総会 (2018)

難波千佳 他、アダリムマブ投与中に全身に紅斑を生じ薬剤性ループスとシェーグレン症候群による皮疹の鑑別を要した 1 例、第 32 回日本乾癬学会学術大会 (2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。