

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860924

研究課題名(和文)重症薬疹迅速診断キットの有用性の検討

研究課題名(英文)Development of diagnostic test for cutaneous adverse drug reaction.

研究代表者

村田 純子(Murata, Jyunko)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：10598387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症薬疹(中毒性表皮壊死症；TEN、Stevens-Johnson症候群；SJS)は眼症状などの重篤な後遺症を残すことがあり、時に致死性の疾患である。血漿交換や大量免疫グロブリン療法などが試みられているが未だ難治症例も多くみられる。

本研究課題においてさらなる臨床における新規の診断マーカーを検索し、加えて重症度を予測できるマーカーも検索する事を目的とした。

薬疹症例において、薬疹原因薬剤は患者末梢血単核球(PBMC)を刺激、活性化させ、重症薬疹において産生が亢進される、またはより優位に亢進するものの検索を行った。本研究ではsFasLやgranulysinなど細胞死誘導因子が候補として同定された。

研究成果の概要(英文)：Severe cutaneous adverse drug reactions (Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis) are life-threatening diseases.

In this project, we investigated to identify diagnostic and prognostic markers using patients' PBMCs. Patients' PBMCs were stimulated with causative drugs and mRNA and proteins were collected. These mRNA and proteins profiles were compared to those of non-severe cutaneous adverse drug reactions (maculopapular tyoe).

We identified sFasL and granulysin are the markers.

研究分野：皮膚科

キーワード：重症薬疹 診断マーカー

1. 研究開始当初の背景

重症薬疹(中毒性表皮壊死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS)(右図)は時に致死の疾患であり、加えて重篤な後遺症を残す。特に TEN はいまだ致死率が 20-30%と高率であり、SJS においては失明または重度の視力障害を残す。また肝障害も高率に合併する。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。これまで SJS/TEN の発症機序について様々なサイトカイン、液性因子、免疫細胞などの関与が報告されてきた。我々はこれまで重症薬疹の発症病態において、主に表皮細胞アポトーシスを誘導する可溶性 FasL (sFasL) の関与について検討し報告してきた: 1) 重症薬疹患者血清中 sFasL が上昇しており、患者末梢血単核球は原因薬剤添加により sFasL を産生する(Abe R et al., Am J Pathol 2003)、2) 水疱・びらん、または粘膜疹出現前に sFasL は上昇し、その後速やかに低下する(右図)(Murata, et al., J Allergy Clin Immunol 2008)。しかし、sFasL は病状が悪化するにしたがい、血中濃度が低下することから、発症のトリガーではあるが、病状増悪や病状の維持にはあまり寄与しないことが考えられた。さらに sFasL は疾患特異性はそれほど高くなく、その他の疾患(劇症肝炎、GVHD など)でも血中濃度が増加することが報告されている。そのためさらなる重症薬疹特異的診断マーカーの検索を継続した。

2008 年、Chung らは新たにアポトーシスを誘導タンパクである granulysin が重症薬疹の水疱部に有意に発現していることを報告した(Chung WH et al., Nat Med 2008)。Granulysin は virus 感染時などに、NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞などから産生され、感染細胞のアポトーシスを誘導することが知られているが未だ不明な点が多い。加えて申請者は TEN/SJS 患者血清中の granulysin を測定したところ、発症早期に有意に増加することを見出した(右図)(Abe R, Murata J et al., Ann Intern Med 2009)。通常薬疹では上昇がみられず、granulysin も重症薬疹早期診断マーカーになりうると考えた。

さらに我々は、この成果に基づき重症薬疹早期診断のための簡易測定キット作成を試みた。イムノクロマト法を用いて、最適な granulysin に対する 2 種のモノクローナル抗体を選定した。

申請者の作成した診断キットでは、患者血清 50µl をバッファーと混合し、キットに滴下すると、15 分以内に、血清中の granulysin 濃度が 10ng/ml 以上の時にテストラインが出現する。

患者血清(Day -3)では、濃度が 50ng/ml であり、テストラインが出現した。一方患者血清(Day 10)では、濃度が 3ng/ml で、テストラインは現れなかった。このように申請者は、迅速測定キットの作成に成功した(Fujita Y, Murata J et al., J Am Acad Dermatol

2011)。



2. 研究の目的

上述のように申請者はこれまで重症薬疹発症早期に特異的に上昇する血清マーカーを検索してきた。さらにその結果に基づき、臨床の場で応用可能な、迅速測定キットの作成にも成功した。

本研究課題において、迅速診断キットの臨床における有用性を検討するため、多施設において症例、検体を収集し、検討を行う。

さらに他のタイプの重症薬疹(薬剤過敏性症候群など)においても granulysin 濃度および、キットの判定を行い(下図)、診断および重症度との関連を検討する。

今回の研究で重症型薬疹の最初期の状態での診断がさらに迅速化し、早期治療が可能となれば合併症や致死率の低下というアウトカムが得られる意義がある。

3. 研究の方法

(1) 早期診断マーカー検索

重症薬疹患者:

現在北大病院には 20 名以上の重症薬疹患者が定期通院し、例数を多く検討できる状況である。またほとんどの症例において原因薬剤を同定できている。また本研究課題は北海道大学医学研究科医の倫理委員会で承認を得ている。

重症薬疹患者血清:

全国の医療機関に重症薬疹患者の血清の提供を呼びかけ、これまで 50 例以上の症例の血清を収集している。さらに発症早期から経時的に複数の時点での血清を収集した症例も多い。この血清を用いて、すでに申請者は可溶性 FasL の測定結果を報告している(Murata, et al., J Allergy Clin Immunol 2008)。現在も全国の医療機関からの血清収集を引き続き行っており、さらにサンプル数を増やしている。

原因薬剤刺激における発現増強する mRNA およびタンパク:

多くの薬疹症例において、薬疹原因薬剤は患者末梢血単核球(PBMC)を刺激、活性化させる。この活性化を測定するのがいわゆる薬剤リンパ球刺激試験(DLST)である。通常薬疹においても重症薬疹においても、DLST は同様に陽性となり、鑑別には用いることはできない。

本研究課題の目的は、通常薬疹と早期重症薬疹との鑑別に有用なマーカー検索であるので、この原因薬剤刺激時に、重症薬疹において産生が亢進される、またはより優位に更新するものを検索する。重症薬疹および通常薬疹患者の PBMC に原因薬剤を添加刺激し、その後 PBMC の mRNA を採取する。この mRNA を用いて DNA microarray を施行し、重症薬疹と通常薬疹のデータを比較し、重症薬疹で優位に発現増強される molecule を同定する。候補同定後、原因薬剤刺激した PBMC の培養上清においてタンパクレベルでの発現を ELISA または Cytometric Bead Array を用いて測定する。

原因薬剤刺激における発現増強するタンパクの患者血清における動態解析：

前述の検討で同定した候補タンパクの実際の濃度を、患者血清を用いて検討する。特に重症薬疹患者において、皮膚びらん・水疱、または粘膜症状が発現する前の時点（すなわち重症薬疹と確定診断できていない時点）において、通常薬疹と比較し優位に上昇していれば早期診断マーカーになりえる。

#### (2) 重症度予測マーカー検索

原因薬剤刺激における発現増強する mRNA およびタンパク：

重症薬疹患者の PBMC に原因薬剤を添加刺激し、その後 PBMC の mRNA を採取する。この mRNA を用いて DNA microarray を施行し、重症薬疹のなかでも、より重症なもの（皮膚びらん・潰瘍面積が広範囲（80%以上）なもの）とそうでないものを2群に分けてデータを比較し、重症度が高い症例で優位に発現増強される molecule を同定する。候補同定後、原因薬剤刺激した PBMC の培養上清においてタンパクレベルでの発現を ELISA または Cytometric Bead Array を用いて測定する。候補同定後、迅速測定キットの作成を行う。

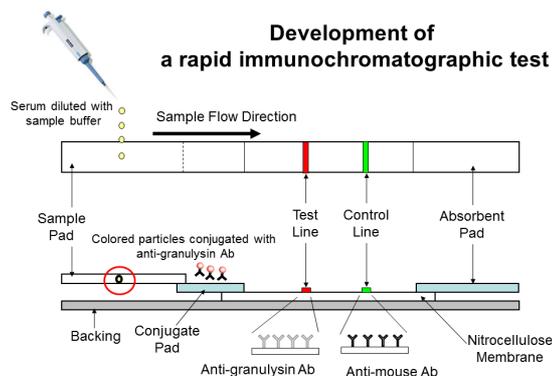
#### 4. 研究成果

重症薬疹（中毒性表皮壊死症：TEN、Stevens-Johnson 症候群：SJS）は眼症状などの重篤な後遺症を残すことがあり、時に致死的疾患である。血漿交換や大量免疫グロブリン療法などが試みられているが、いまだ難治症例も多くみられる。これまで申請者は、早期診断が早期治療開始に結びつくと考え研究を行ってきた。我々は血清中 granulysin が発症早期に著増し、早期診断に有用であることを明らかにしてきている。

薬疹症例において、薬疹原因薬剤で患者末梢血単核球(PBMC)を刺激、活性化させた。この原因薬剤刺激時に、重症薬疹において産生が亢進される、またはより優位に亢進するものの検索を行った。PBMC の mRNA を用いて DNA microarray を施行し、重症薬疹と通常薬疹のデータを比較し、重症薬疹で優位に発現増強

される molecule の同定を行った。候補同定後、原因薬剤刺激した PBMC の培養上清においてタンパクレベルでの発現を ELISA を用いて測定した。具体的には sFasL や、granulysin など細胞死誘導因子が候補として同定された。しかし今回の研究課題では新規の因子の同定にはいたらなかった。

今後も検討を続け、さらに重症薬疹早期診断マーカー迅速測定キット作成も行う。



#### 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3件)

1. Tsujiwaki M, Abe R, Ohguchi Y, Hoshina D, Murata J, Fujita Y, Nomura T, Ambo M, Shimizu H.  
Recurrent course and CD30 expression of atypical T lymphocytes distinguish lymphomatoid papulosis from primary cutaneous aggressive epidermotropic CD8+ cytotoxic T-cell lymphoma.  
*Acta Derm Venereol.* 2014 Sep;94(5):613-4. 査読有、doi: 10.2340/00015555-1806.
2. Horie K, Abe R, Homma E, Murata J, Nomura T, Shimizu H.  
Solitary tumour on the neck: a quiz. Cutaneous Rosai-Dorfman disease.  
*Acta Derm Venereol.* 2014 Sep;94(5):619-22. 査読有、doi: 10.2340/00015555-1792.
3. Yoshioka N, Suto A, Abe R, Saito N, Murata J, Hayashi-Ujiie 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.* 2013 Jul;148(1):89-91. 査読有、doi: 10.1016/j.clim.2013.04.002

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村田 純子 (MIRATA JYUNKO)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：10598387