

学位論文題名

Rapid immunochromatographic test for serum granulysin is useful for the prediction of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis

(迅速免疫クロマトグラフィー法を用いた血清グラニューライシン測定はステイブンス-ジョンソン症候群や中毒性表皮壊死症の発症予測に有用である)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

Stevens-Johnson syndrome (SJS) および Toxic epidermal necrolysis (TEN) は発熱を伴う紅斑、びらん、粘膜障害を呈する重症薬疹である。SJS/TEN の多くは多形滲出性紅斑や紅斑丘疹型の皮疹からはじまり、急速に表皮剥離や粘膜障害を生じる。最重症型である TEN は死亡率 20% と高率で、また SJS においても眼粘膜病変による視力障害等、重篤な後遺症を残す例も多い。そのため早期診断と適切な治療が求められるが、SJS/TEN の発症早期には通常の薬疹と臨床的に酷似しており鑑別が困難である。我々は粘膜病変を呈する前の SJS/TEN の血清 granulysin (GNLY) 値が通常薬疹と比べて有意に上昇することを報告した。よって血清 GNLY の上昇を検出することで SJS/TEN の早期診断が可能であることを想定し、免疫クロマトグラフィー法を用いて迅速診断キットの開発に着手した。

【対象と方法】

本研究において北海道大学病院および協力医療機関から SJS/TEN 患者 35 名の血清サンプルを収集し、うち 5 名は SJS/TEN 診断以前に血清を収集した。潰瘍、びらんを初めて皮膚粘膜または眼粘膜に初めて確認した日を、SJS/TEN 発症 1 日目とした。また健常人コントロールとして 31 名、通常薬疹コントロールとして 24 名から血清を収集し、SJS/TEN 患者と同様に検討した。

免疫クロマトグラフィー法は 2 種類のヒト GNLY 抗体をテストストリップに固相化し、結果を肉眼で確認できるように作製した。また免疫クロマトグラフィー法の精度を検討するため、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて各サンプルの血清中 GNLY 濃度を測定した。

【結果】

免疫クロマトグラフィー法を用いた GNLY 迅速診断キットの作製に成功した。本キットは、10 ng/mL GNLY 濃度以上でテストラインに赤色のラインが出現し肉眼で確認可能であった。

次に 5 名の SJS/TEN 発症前の血清サンプルを用いて検討した。その結果、5 検体のうち 4 検体でテストライン陽性の結果が得られた。ELISA にて血清 GNLY 濃度を確認したところ、全ての陽性検体で GNLY 濃度が高値を示した (30.4 ± 9.9 ng/mL : 平均値 ± 標準誤差)。陰性の結果であった 1 検体は 2.7 ng/mL であり健常人と同程度の値 (1.6 ± 0.6 ng/ml) を示した。また通常薬疹患者から得た血清サンプル 24 検体のうち 1 検体で陽性を示し、健常人から得た血清サンプル 31 検体はすべて陰性であった。

これらの結果から感度 80 %、特異度 95.8 % を示した。また免疫クロマトグラフィー法の結果をフィッシャーの正確確率検定で統計解析した結果、 $p=1.02 \times 10^{-3}$ となり迅速診断キットの判定と SJS/TEN の発症は有意に関連した。

【考察】

本研究において、血清中の GNLV 濃度上昇を検出する迅速免疫クロマトグラフィー法を確立することに成功した。本キットを用いて発症早期の SJS/TEN 患者血清を検討したところ、感度 80 %、特異度 95.8 %の結果が得られ、SJS/TEN の早期診断の一助になることが示唆された。また SJS/TEN で標的になり得る粘膜病変等が出現した場合、本研究の検査法は鑑別時に有用であることが示唆された。

以前我々は SJS/TEN の極早期に血清中可溶性 Fas リガンド濃度が有意に上昇し、その後速やかに低下することを見出し、可溶性 Fas リガンドが重症薬疹の診断マーカーとして有用であることを報告した。一方既報では SJS/TEN 患者の水疱内で GNLV が著明に発現し、重症薬疹発症のメディエーターであると報告されている。この報告をもとに、我々は SJS/TEN の臨床経過と血清中 GNLV 濃度推移について解析を行ったところ、表皮剥離や粘膜病変を呈する SJS/TEN 発症以前の時点で血清 GNLV 値が発症後より有意に上昇し、また通常薬疹患者や健常人と比較した場合、これらのグループとの間に有意に上昇していたことを報告した。また上昇した血清 GNLV 値は発症から 5 日以内に速やかに低下し、これは以前我々が報告した SJS/TEN における可溶性 Fas リガンド値の推移と類似していた。我々は可溶性 Fas リガンドについても同様の免疫クロマトグラフィー法の作成を試みたが、正常上限値が 100 pg/mL と低く、作製には至らなかった。一方 GNLV の正常上限値は 10 ng/mL (10000 pg/mL) で可溶性 Fas リガンドに比べて正常上限値が 100 倍高く、作製に成功した。

GNLV は Saposin-like proteins family の 1 つで、免疫反応において細胞障害性 T 細胞や NK 細胞から分泌され、微生物や腫瘍細胞、移植細胞、細菌、真菌や寄生虫に対して細胞膜の電荷を陰性にすることで細胞障害性を示すことが報告されている。そして GNLV は病原体に対して生体防御として重要な蛋白であり、カスパーゼや他の経路を介して標的細胞をアポトーシスに誘導することが報告されている。

GNLV の特徴は微生物や異物を広範囲に認識しアポトーシスを誘導することである。そして SJS/TEN との鑑別が特に必要である疾患として考慮すると、急性ウイルス性発疹症や移植片対宿主病等の検討が必要であると考えられる。本研究では上記二疾患を対象としていないため、これらの疾患においても本研究で開発した免疫クロマトグラフィー法を使用し同様な検討を実施することが肝要であると考えられる。現在これら疾患における血清 GNLV 値の検討を行っている。

【結論】

本研究では免疫クロマトグラフィー法を用いて、発症早期の SJS/TEN に特徴的な血清 GNLV の上昇を迅速簡便に検出する診断キットの開発に成功した。さらに本研究の診断キットを用いることで、通常薬疹から重症化し SJS/TEN を発症する可能性のある患者を迅速に予測しうることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 山 本 有 平
副 査 教 授 清 水 宏

学位論文題名

Rapid immunochromatographic test for serum granulysin is useful for the prediction of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis

(迅速免疫クロマトグラフィー法を用いた血清グラニューライシン測定はステイブンス-ジョンソン症候群や中毒性表皮壊死症の発症予測に有用である)

重症薬疹であるステイブンス-ジョンソン症候群や中毒性表皮壊死症の早期診断は臨床的に重要な課題である。両薬疹発症前の患者血清では、他の通常薬疹の患者や健常人の血清よりも血清グラニューライシン濃度が有意に増加していたことより、血清グラニューライシン濃度の推移が重症薬疹の早期診断マーカーになり得ると考え、血清グラニューライシンを検出する迅速免疫クロマトグラフィー法を用いた検査キットを開発し、その早期診断に有用であること明らかにした。さらに、重症薬疹の包括的研究として重症薬疹モデルマウス作製の検討も行った。

審査会において、副査の畠山鎮次教授より重症薬疹モデルマウスを作製する上で免疫不全マウスである NOG マウスを使用したが、他の免疫不全マウス、例えば RAG ノックアウトマウスを使用しなかった理由を問われ、NOG マウスはリンパ球などの免疫細胞を欠損しているが、他の免疫不全マウスでは NK 細胞等、マウス由来の免疫細胞が一部残存しており、拒絶反応を生じる可能性を考慮し、NOG マウスを用いたと回答した。加えて、可能な限りヒト由来の免疫細胞に置換するために NOG マウスを使用した回答した。さらに、グラニューライシンの産生細胞と産生機序および作用機序を問われ、グラニューライシンの産生細胞としては活性化した細胞障害性 T 細胞や NK 細胞の他に、ヘルパー T 細胞や NKT 細胞があり、そして細胞内の顆粒からパーフォリンやグランザイムと同様な過程で産生されると回答した。また、作用機序としては標的細胞の細胞膜の電荷を変化させアポトーシスを誘導する機序の他に、カスパーゼやその他の経路を介して感染細胞や腫瘍細胞等のアポトーシスを誘導することについて回答した。次に、副査の山本有平教授から、重症薬疹に対するグラニューライシン検査キットの特異性について問われ、グラニューライシンは体内の非自己を排除する生体防御として働くタンパク質であるため、感染症や急性移植片対宿主病、腫瘍等の疾患に対して血液中のグラニューライシンが増加する可能性はあると回答した。しかし、これまで報告されてきた重症薬疹以外の血清グラニューライシン濃度は重症薬疹で示した濃度よりも概ね低値を示すため、各疾患に対してさらに検討していくことで検査キットの特異性は維持できると回答した。さらに、重症薬疹の重症度と血清グラニューライシン濃度との相関性について問われ、重症度と血清グラニューライシン濃度との相関性は認めら

れないと回答した。しかし、急性移植片対宿主病等の重症度と血清グラニューライシン濃度が相関していると回答した。そして重症薬疹と血清グラニューライシン濃度の相関性に対して、今後例数を増やすことができれば相関性を見出すことができる可能性があるとして回答し、相関性があれば診断キットの有用性は高まることに言及した。次に、主査の今村雅寛教授より、他のアポトーシス誘導タンパクであるパーフォリンやグランザイムと重症薬疹との関連性について問われ、重症薬疹でのそれらの関連性について意見が分かれる旨を説明し、さらにグラニューライシンの増加が認められない症例の場合、グランザイムや可溶性 FasL の関与がある可能性を併せて回答した。最後に、副査で指導教授の清水 宏教授から、重症薬疹の問題点や本研究の経緯の説明の後、今後の展望について問われ、これまでの経験を活かし今後の研究をさらに発展させたいと回答した。

この論文は、重症薬疹の発症早期では通常薬疹の症状を呈し、臨床的に鑑別が困難であるにもかかわらず、発症早期の血清グラニューライシン濃度を検討することで、それらの早期診断を可能にする簡易な迅速診断キットの開発に成功したことで高く評価された。今後の解析を重ねることで、本研究成果が重症薬疹の新しい診断や治療、予防のアプローチ法のひとつになり得ることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。