

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 吉岡 直也

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ィーブンス-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)

【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 GNLY 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 GNLY 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 GNLY 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 GNLY 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 GNLY 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 GNLY 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。

GNLY 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 GNLY 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。

GNLY 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 GNLY 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 GNLY 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。