

図1 膿疱性乾癬における SKALP/elafin の免疫染色。染色性は低下し、極性もはっきりしない

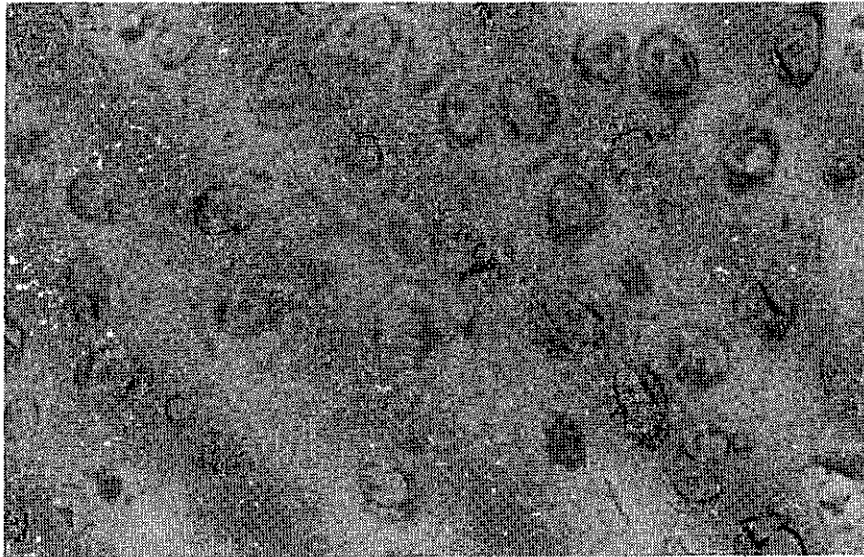


図2 膿疱性乾癬における SKALP/elafin の免疫染色。部分的に核周囲の凝集像が認められる

#### 4) 尋常性乾癬、膿疱性乾癬表皮における SKALP/elafin の発現： 免疫電顕による超微細分布の検討

研究協力者：飯 塚 一（旭川医科大学皮膚科）

KEY WORD：膿疱性乾癬、尋常性乾癬、SKALP、elafin、周辺帯

#### 抄 録

〔目的〕乾癬病変部における SKALP/elafin の超微細構造的局在について検討した。〔方法〕膿疱性乾癬、尋常性乾癬につき抗ヒト elafin 家兎ポリクロナル抗体により Lowicryl K11M を用いて免疫電顕法により局在の検討を行った。SKALP/elafin のほかインボルクリンについても検討を加え、両者の局在を比較した。〔結果〕乾癬表皮有棘層上層での免疫電顕法により、核周囲のゴルジ装置と思われる部位から、コロイダルゴールドに標識された elafin が分泌小胞と思われる円形構造物に一致して細胞質内に局在して認められた。また部分的に円形配列状に標識された elafin が細胞膜へ移動し、細胞外へ分泌される像も認められた。エラフィンおよびインボルクリンの免疫電顕 2 重染色を行ったところ、有棘層上層部分、すなわち辺縁帯がまだ形成されていない部位では、インボルクリンの多くは辺縁帯に位置しているのに対し、エラフィンは、その多くが細胞質内および細胞間に存在していた。一方、角層の辺縁帯が完成された部位ではインボルクリンのみならずエラフィンも辺縁帯に位置していた。〔結論〕SKALP/elafin は、有棘層上層ではインボルクリンを主体とした架橋形成が不完全であるがゆえに、細胞外に分泌される一方、辺縁帯がほぼ完成した角層内では、辺縁帯の存在そのものによってエラフィンの分泌が阻害され、エラフィンは細胞内で辺縁帯の成分として架橋されることが示唆される。

ET=Immunoelectron microscopic analysis of SKALP/elafin in psoriasis.

AU=Iizuka Hajime (Asahikawa Medical College, Department of Dermatology)

AB= [Purpose] In order to analyze the localization of anti-leukoproteinase, SKALP/elafin, in psoriasis immunoelectron microscopic analysis was performed. [Method] Samples of pustular psoriasis, and psoriasis vulgaris were analyzed immunohistochemically and immunoelectron microscopically. Anti-human rabbit polyclonal anti-elafin antibody was used as the primary antibody. Localization of involucrin was also analyzed. Localization was detected by colloidal gold. [Results] SKALP/elafin was observed perinuclearly and in round-shaped microvesicles in viable psoriatic keratinocytes. Secretion of SKALP/elafin from psoriatic keratinocytes was also observed. Double staining of SKALP/elafin and involucrin disclosed that in the lower epidermis, where cornified cell envelope formation was not completed, involucrin was detected in the cornified cell envelope area, while SKALP/elafin was detected extracellularly. In the upper horny layer where cornified cell envelope was fully-developed, both involucrin and SKALP/elafin were localized on the cornified cell

envelope. [Conclusion] It was suggested that SKALP/elafin is not secreted in the upper horny layer of psoriatic epidermis, because of the presence of rigid cornified cell envelope that hampers secretion of SKALP/elafin.

## はじめに

膿疱性乾癬は好中球の強い浸潤により特徴づけられる。好中球エラスターゼ、プロテイナーゼ 3 に対する表皮細胞由来の peptide inhibitor である SKALP/elafin は分泌蛋白としての挙動のほかに、辺縁帯構成成分としての機能も知られており、前者は基本的に細胞外で、後者は細胞内で働くことから、両者の作用の分別機構に興味を持たれる。われわれの過去の検討により、尋常性乾癬における SKALP/elafin の免疫染色における極性が明らかとなり、SKALP/elafin は前駆体であるプレプロエラフィンが、おそらくミクロソーム分画に属する細胞内小器官を介して外方に分泌されることが想定された。今回、われわれは免疫電顕的な手法を用いて、特に尋常性乾癬における SKALP/elafin の細胞内局在について検討を加えた。

## 対象と方法

膿疱性乾癬、尋常性乾癬につき抗ヒト elafin 家兎ポリクロナル抗体により Lowicryl K11M を用いて cryofixation、cryosubstitution を行い、immunogold silver enhancement 法により、免疫電顕法で細胞局在の検討を行った。SKALP/elafin のほかインボルクリンについても検討を加え、両者の局在を比較した。

## 結 果

1 次抗体として抗ヒト elafin 抗体を用いた有棘層上層での免疫電顕法により、核周囲のゴルジ装置と思われる部位から、コロイダルゴールドに標識された elafin が分泌小胞と思われる円形構造物に一致して細胞質内に局在して認められた (図 1)。また部分的に円形配列状に標識された elafin が細胞膜へ移動し、細胞外に分泌される像も認められた (図 2)。エラフィンおよびインボルクリンの免疫電顕 2 重染色を行ったところ、有棘層上層部分、すなわち周辺帯がまだ形成されていない部位では、10nm で標識されたインボルクリンの多くは周辺帯上に位置しているのに対し、5 nm で標識されるエラフィンは、その多くが細胞質内および細胞間に存在していた (図 3)。一方、角層の周辺帯が完成された部位ではインボルクリンのみならずエラフィンも周辺帯に位置していた (図 4)。

## 考 察 、 結 論

SKALP/elafin は正常表皮では発現せず尋常性乾癬など炎症性皮膚疾患において病変部で発現することが知られている。SKALP/elafin はシグナルペプチドを有し、これに続いてセメントインとよばれるトランスグルタミナーゼの基質ドメインがあり、カルボキシル末端にプロテアーゼ阻害作用を有するエラフィン配列がある。シグナルペプチドの存在は分泌蛋白としての挙動を想定させるが、一方、周辺帯形成においてはトランスグルタミナーゼが細胞内から働くため、SKALP/elafin が、ある条件下では細胞内に留まり、周辺帯の構成成分となる可能性が残される。両者の分別作用機構は不明であったが、今回の免疫電顕を用いた結果により、SKALP/elafin は、核周囲のゴルジ装置と思われる部位から、分泌小胞と思われる円形構造物

に一致して細胞質内に局在すること（図1）、また部分的に円形配列状に標識された elafin が細胞膜へ移動し、細胞外に分泌されること（図2）、さらに免疫電顕2重染色法により、周辺帯がまだ不完全な有棘層上層部分では、インボルクリンの多くは周辺帯上に位置しているのに対し、エラフィン（Elafin）は細胞質内および細胞間に存在すること（図3）、一方、角層の辺縁帯が完成された部位ではインボルクリンのみならずエラフィンも周辺帯に位置すること（図4）が示された。すなわち SKALP/elafin は超微細構造上も分泌蛋白、周辺帯構成蛋白の両者の挙動を示すことが明らかとなった。SKALP/elafin は有棘層上層ではインボルクリンを主体とした架橋形成が不完全であるがゆえに、細胞外に分泌される一方、周辺帯がほぼ完成した角層内では、周辺帯の存在そのものによってエラフィンの分泌が阻害され、エラフィンは細胞内で辺縁帯の成分として架橋されることが示唆される。

## 謝 辞

研究に協力していただいた中根宏先生、山本明美先生に深謝します。

## 参考文献

- 飯塚 一：表皮細胞増殖亢進からみた膿疱性乾癬。厚生省特定疾患稀少難治性疾患調査研究班平成10年度報告書 p.66-70、1999
- 飯塚 一：膿疱性乾癬表皮における SKALP/elafin の免疫染色。厚生省特定疾患稀少難治性疾患調査研究班平成11年度報告書（印刷中）。
- Ishida-Yamamoto A, Eady RAJ, Watt FM, Roop DR, Hohl D, Iizuka H: Immunoelectron microscopic analysis of cornified cell envelope formation in normal and psoriatic epidermis. *J Histochem Cytochem* 44: 167-175, 1996
- Ishida-Yamamoto, Kartasova T, Matsuo S, Kuroki T, Iizuka H: Involucrin and SPRR are synthesized sequentially in differentiating cultured epidermal cells. *J Invest Dermatol* 108: 12-16, 1997
- Ishida-Yamamoto A, Tanaka H, Nakane H, Takahashi H, Iizuka H: Antigen retrieval of loricrin epitopes at desmosomal areas of cornified cell envelopes: an immunoelectron microscopic analysis. *Exp Dermatol* 8: 402-406, 1999

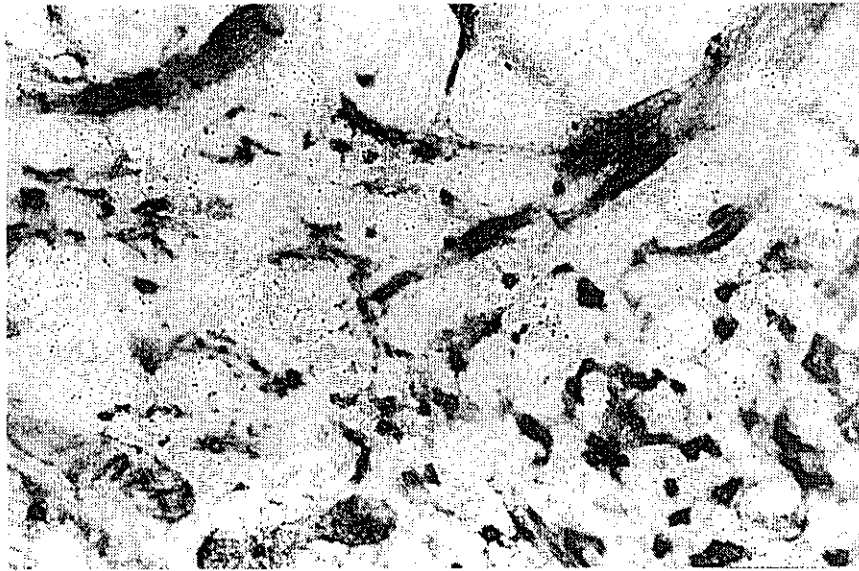


図1 有棘層上層での免疫電顕所見。核周囲のゴルジ装置と思われる部位から、コロイダルーゴールドに標識された elafin が分泌小胞と思われる円形構造物に一致して細胞質内に局在して認められる。

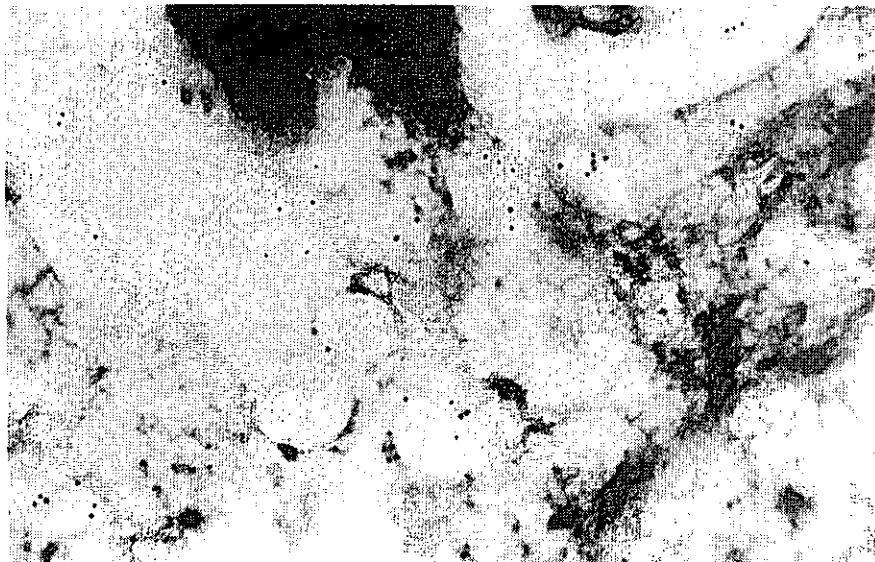


図2 円形配列状に標識された elafin が細胞膜へ移動し、細胞外に分泌される像も認められる。

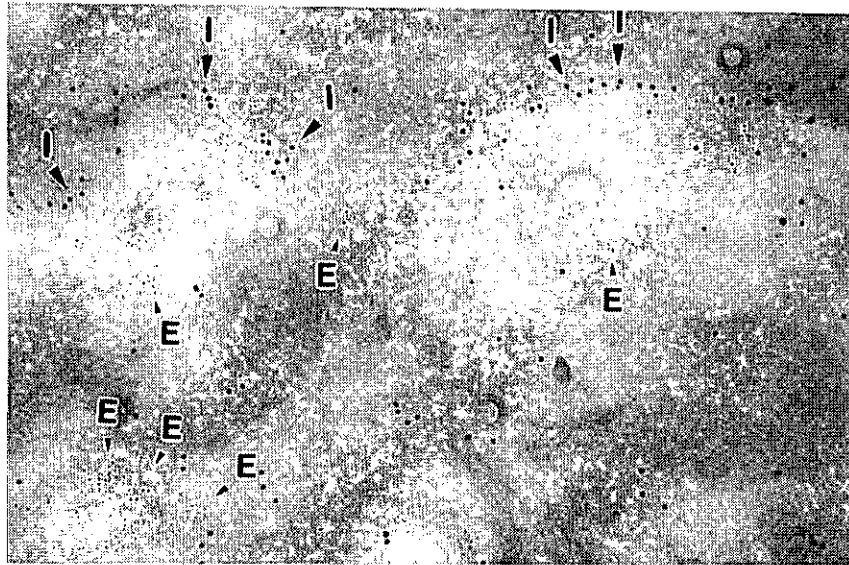


図3 エラフィンおよびインボルクリンの免疫電顕2重染色所見。有棘層上層部分では、10nmで標識されたインボルクリンの多くは周辺帯上に位置しているのに対し、5nmで標識されるエラフィンは、その多くが細胞質内および細胞間に存在している。

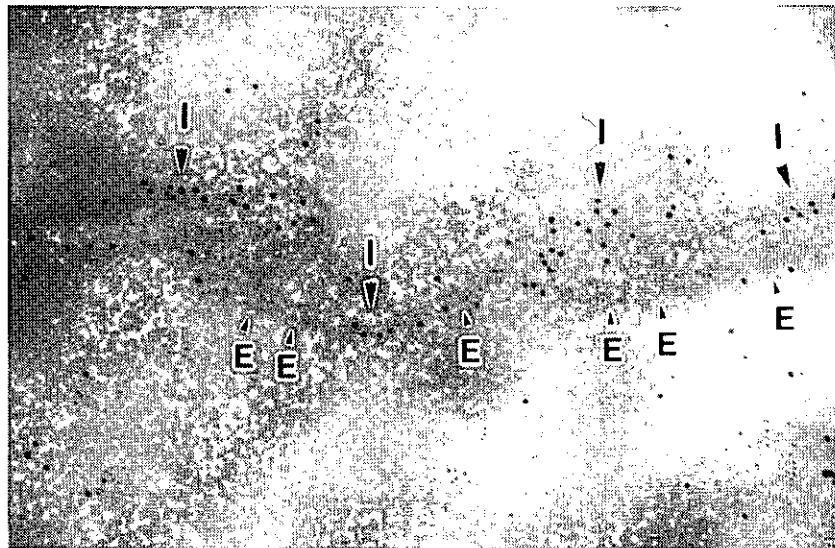


図4 エラフィンおよびインボルクリンの免疫電顕2重染色所見。周辺帯が完成された角層ではインボルクリンのみならずエラフィンも周辺帯に位置している。

## 5) 乾癬表皮肥厚に関わる転写因子 Activator Protein-2 の役割： 表皮細胞増殖の観点から

研究協力者：金子史男（福島医科大学皮膚科）

共同研究者：尾山徳孝、岩月啓氏（福島医科大学皮膚科）

関亦正幸、本間好（同生体物質研究部門）

### 要 約

乾癬病変部皮膚の浸潤細胞や表皮角化細胞自身から産生される炎症性サイトカインがその皮疹形成に与える影響を、表皮増殖因子受容体（EGFR）の発現調節の面から検討した。IL-6 は生理学的な濃度で、健常人由来の表皮角化細胞（NHKs）における EGFR 発現を誘導した。その蛋白発現は2時間以内から生じ、約6時間で一定レベルに達した。一方、乾癬皮疹部由来の表皮角化細胞（PLKs）は無刺激状態でも若干の EGFR 発現が認められ、IL-6 に対する NHKs に比べて乏しかった。また IL-6 は、表皮の増殖・分化に重要な遺伝子の発現調節を行う activator protein-2 (AP-2) を転写レベルで誘導した。NHKs ではこの誘導が IL-6 の濃度依存的であったのに対し、PLKs と扁平上皮癌細胞（HSC-5）では、低濃度でもより強い AP-2 発現が誘導できた。以上より、1) 皮膚の炎症時には IL-6 による直接的、ないしは AP-2 を介した間接的な EGFR 発現誘導が NHKs の増殖を亢進させること、2) PLKs や HSC-5 ではそれらの発現性が NHKs とは異なることが明らかになった。

### 緒 言

乾癬の病変部皮膚では、表皮角化細胞の増殖・分化に関わる様々な分子の発現異常が指摘されており、これらの多因子による総合的な異常が皮疹形成に重要であると考えられている。これは単一遺伝子を target とした動物モデルにおいて、乾癬に特徴的な皮膚所見を完全には再現できていないことから裏付けられる。転写因子 activator protein (AP) -2 は AP family に属し、keratin5、14、transglutaminase、involucrin、epidermal growth factor (EGF) ligand family、EGF receptor (EGFR) など、乾癬病変部表皮において異常発現していると報告のある遺伝子群の転写を調節している<sup>1, 2)</sup>。AP-2 の皮膚における役割については、既に免疫組織学的、遺伝子工学的にも検討がなされており、癌細胞において AP-2 の過剰発現が認められることや<sup>3)</sup>、AP-2 knock out マウスの解析<sup>4)</sup> などから、単に増殖・分化のみならず、皮膚の発生初期段階においても重要な分子であることが指摘されている。

我々は既に、EGFR の発現異常が乾癬の表皮肥厚に大きく関わっている可能性について報告した<sup>5)</sup>。この異常のみではその病態の全てを説明することは不可能ではあるが、乾癬の効率のよい表皮細胞増殖システム、および皮疹再現性の高さからも、ある特定の分子群の発現調節異常が皮疹形成に重要であることが推察される。今回は、AP-2 が EGFR を含むそれらの遺伝子群の発現異常を一括して制御している可能性について検討した結果<sup>6)</sup>をもとに、乾癬発症のメカニズムを考察する。

## 対象と方法

### 対象

実験に用いた初代培養表皮角化細胞は、ステロイド外用や免疫抑制剤の投与が行われていない乾癬患者の皮疹部、および健常人の生検組織から前法<sup>5, 7, 8)</sup>に基づいて分離した。これを増殖因子 (+) 無血清低 Ca 培地 (Keratinocyte-SFM; Gibco BRL) で 2~4 回継代培養し、各々 psoriatic lesional keratinocytes (PLKs) と normal human keratinocytes (NHKs) とした。また human squamous cell carcinoma HSC-5 細胞 (山形大学、近藤滋夫教授提供) は、5%ウシ胎児血清 (+) ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM; ニッスイ) で培養した。

### 方法 (蛋白・mRNA の解析、および免疫組織学的検討)

NHKs と PLKs は増殖因子 (+) Keratinocyte-SFM で  $5 \times 10^4$  個に調節し、6 cm 径シャーレに subconfluent になるまで 37°C、5%CO<sub>2</sub>環境下で培養した。増殖因子 (-) 培地で 24 時間培養した後、recombinant human interleukin (rhIL) -6 (Genzyme) を最終濃度 0、0.1、1、10ng/ml になるように添加した。サンプルは 3 つに分離して回収され、1 つは Gilbertson らの方法<sup>9)</sup> によって蛋白を核および細胞質分画とに分別、他方は細胞膜分画として回収して、抗ヒト EGFR 抗体 (Transduction Laboratory) と protein G sepharose beads (Zymed) で免疫沈降した後、各々ウエスタンブロット法に用いた。残りの細胞は mRNA の抽出に使用した。上述のごとく抽出した各蛋白分画を、7.5~12%アクリルアミドゲルの標準的な SDS-PAGE で分離した。これを PVDF 膜に転写し、抗ヒト AP-2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗ヒト EGFR 抗体を 1 次抗体、および HRP2 次抗体 (DAKO) を用いてイムノブロットを行った。

mRNA を ISOGEN<sup>®</sup> (日本ジーン) で抽出した後、これを鋳型として M-MLV reverse transcriptase (Superscript II<sup>®</sup>; Gibco BRL) で cDNA を合成し、Daftarian らの方法<sup>10)</sup> を用いて半定量的に PCR 反応を行った。使用した primer は AP-2  $\alpha$ 、 $\beta$ -actin に特異的であり、それらの発現レベルは専用の解析ソフト (NIH image) を用いて検討した。

健常人、乾癬、およびその他の皮膚疾患の病変部から採取した生検組織を用いて、10%ホルマリンにて固定したパラフィン切片 (各 6  $\mu$ ) を作製した。10%正常ヤギ血清で非特異的結合をブロックした後、各々 1 次抗体 (抗ヒト AP-2、EGFR 抗体) と 4°C で 1 晩、さらに HRP 2 次抗体と室温で 30 分間反応させた。発色は DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液、核染色はメチルグリーンにて行った。

## 結果と考察

乾癬病変部では、湿潤した CD4 (+) T 細胞、単核球、マクロファージから分泌される炎症性サイトカインが、表皮角化細胞の増殖を亢進していると考えられている。このため創傷治癒の機転と照らし合わせて論じられることが多いが、実際は以下の点で大きく異なる。すなわちケブネル現象に反映されるような、細胞学的特性を保持した効率的な増殖システム (efficiency) と、皮疹の高い再現性 (reproducibility) をもつことである。このような観点から我々は、表皮増殖因子の受容体である EGFR の発現に注目した<sup>5)</sup>。その理由として、EGFR が直接結合できる多くの ligand をもつ分子であり、その幾つかは乾癬の病変部表皮での発現が亢進していることが挙げられる。このように ligand と結合する機会が増えることは、前述したケブネル現象に見られるような増殖効率の良さを反映している。一方、アトピー性皮膚炎の皮疹部における



EGFR 発現が基底層から傍基底層までなのに対し、乾癬表皮では基底層から有棘層上層まで認められることから (図 1)、炎症を伴う表皮増殖性疾患であっても、乾癬特異的な EGFR 発現が存在することも着目すべき点である。

そこで炎症刺激に伴う EGFR の発現を検討したところ、rhIL-6 (10ng/ml) の添加により、NHKs の細胞膜分画での蛋白発現が亢進した。その発現は刺激後 2 時間以内から認められ、6 時間程で一定に達した (図 2 A)。蛋白合成の kinetics から初期におけるこの発現は、IL-6 の直接作用によるものと考えられた。一方、PLKs は無刺激の状態でも若干の発現が認められる上に、IL-6 刺激に対する発現の変化は乏しかった (図 2 B)。PLKs の EGFR 発現レベルが NHKs と比較して低いことから (図 2)、PLKs では EGFR 発現が最大限に達しないうちに、既に IL-6 不応状態である事が予想される。これは PLKs から自己分泌されている IL-6 や他の IL-6-inducible cytokines が、EGFR の定常的発現を誘導しているためと思われたが、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  に対する中和抗体を添加しても、その発現に変化は認められなかった<sup>5)</sup>。また、乾癬の無疹部や治療により改善してきた部位の EGFR 発現レベルは、健常人と変わらないことから、PLKs における EGFR の定常的発現や IL-6 への不応性は乾癬皮膚で恒常的なものではなく、細胞を *in vitro* に持って来る段階で生じた変化である可能性が高い。しかしながら健常人はもとより、アトピー性皮膚炎の病変部から採取した表皮細胞でもこれらの反応は見られなかったことから (未発表)、いずれにせよこれらは乾癬の表皮細胞において特異的な反応であることを示唆している。

乾癬の病変部皮膚では増殖・分化に関わる様々な分子の発現異常が指摘されているため、上述した EGFR 発現の異常のみではその病態を統合的に説明することは不可能である。また、単一遺伝子を target とした動物モデル作製の現状からも、多因子による総合的な異常が乾癬皮膚の形成に重要であることが示唆されている。そこで次に、炎症刺激に伴う転写因子 AP-2 の挙動について検討した。AP-2 は、乾癬皮膚で異常発現している多くの遺伝子を転写レベルで調節しており<sup>1)</sup>、これらの発現を一括して制御している可能性を考えたためである。

rhIL-6 (10ng/ml) 刺激により、NHKs の核分画における AP-2 蛋白の発現が亢進した。その発現は刺激後 2 時間以内から認められ、4 時間程で一定に達した (図 3)。同様に mRNA の発現も rhIL-6 刺激依存的に亢進した。この発現の亢進は刺激後 30 分以内で生じ、2 時間程で一定に達したが、24 時間では元のレベルにまで戻った (図 4)。一方、*de novo* の RNA 合成を抑制する actinomycin D で処理した NHKs は、rhIL-6 刺激に対して AP-2 mRNA の発現が亢進しなかったことから (図 5)、この誘導は転写に直接影響することが推察された。これらの結果は、IL-6 による EGFR 発現誘導に直接的、ならびに転写因子 AP-2 の誘導を介した間接的な作用が存在することを示している。

さらに NHKs、PLKs、HSC-5 において、rhIL-6 に対する AP-2 発現の相違を検討した (図 6)。NHKs と PLKs は無刺激状態での発現はほとんど認められなかったが、HSC-5 では既に検出可能なレベルにまで亢進していた。また NHKs におけるこの誘導は IL-6 の濃度依存的であったが、この発現形式は他の細胞では異なっていた。PLKs と HSC-5 では 1 ng/ml で一定に達し、それ以降 IL-6 の最終濃度を 10ng/ml に増加しても発現レベルは不変であった。これは PLKs の炎症刺激に対する AP-2 発現の感受性が高いこと、ひいては低レベルの炎症刺激であっても効率よく AP-2 を発現できることを意味している。しかしながら、AP-2 の最大発現量は 3 種類の細胞間で変化がないことから (図 6)、炎症時における AP-2 発現量の相違そのものよりは、むしろ

AP-2 を転写調節領域にもつような遺伝子に、疾患特異性を決定する要因があるのではないかと考えられる。つまり炎症刺激に対して、増殖・分化に関わる AP-2-inducible gene (EGFR, EGF ligand family、transglutaminase など) が一括して発現調節を受けるが、各々遺伝子ごとの AP-2 感受性に違いがあり、それらが乾癬特異的に定められた各遺伝子ごとの閾値を越えることが、発症するために最低限必要なのではないかと想定している。これらの観点から、発現異常の ON/OFF に加えて、発現の質的な解析を行い、その閾値設定がどのようにして行われているかを genome レベルで検討することが今後重要な課題である。

#### 参考文献

- 1) Eckert RL et al. *J Invest Dermatol* 109 : 501-9, 1997
- 2) Leask A et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 7948-52, 1991
- 3) Boshier JM et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 744-47, 1995
- 4) Talbot D et al. *J Invest Dermatol* 113 : 816-20, 1999
- 5) Oyama N et al. *J Dermatol Sci* 16 : 120-8, 1998
- 6) Oyama N et al. *J Invest Dermatol* 113 : 600-6, 1999
- 7) Maruyama K et al. *Skin Pharmacol* 8 : 41-48, 1995
- 8) 金子 史男ほか : 厚生省稀少難治性疾患調査研究班 平成 7 年度報告書、191-6
- 9) Gilbertson RJ et al. *Cancer Res* 57 : 3272-80, 1997
- 10) Daftarian P et al. *J Immunol* 157 : 12-20, 1996

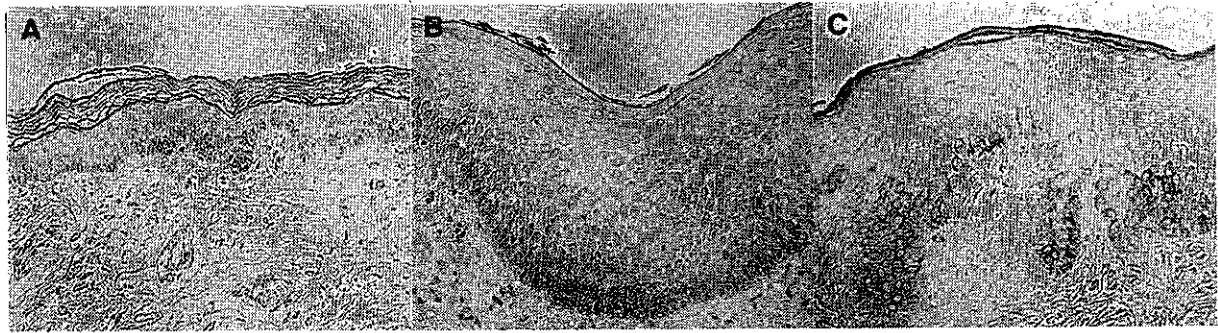


図1 EGFRの免疫組織染色。健常人皮膚（A）、アトピー性皮膚炎の慢性苔癬化局面（B）、尋常性乾癬の典型的な皮疹部（C）におけるEGFR蛋白の局在。

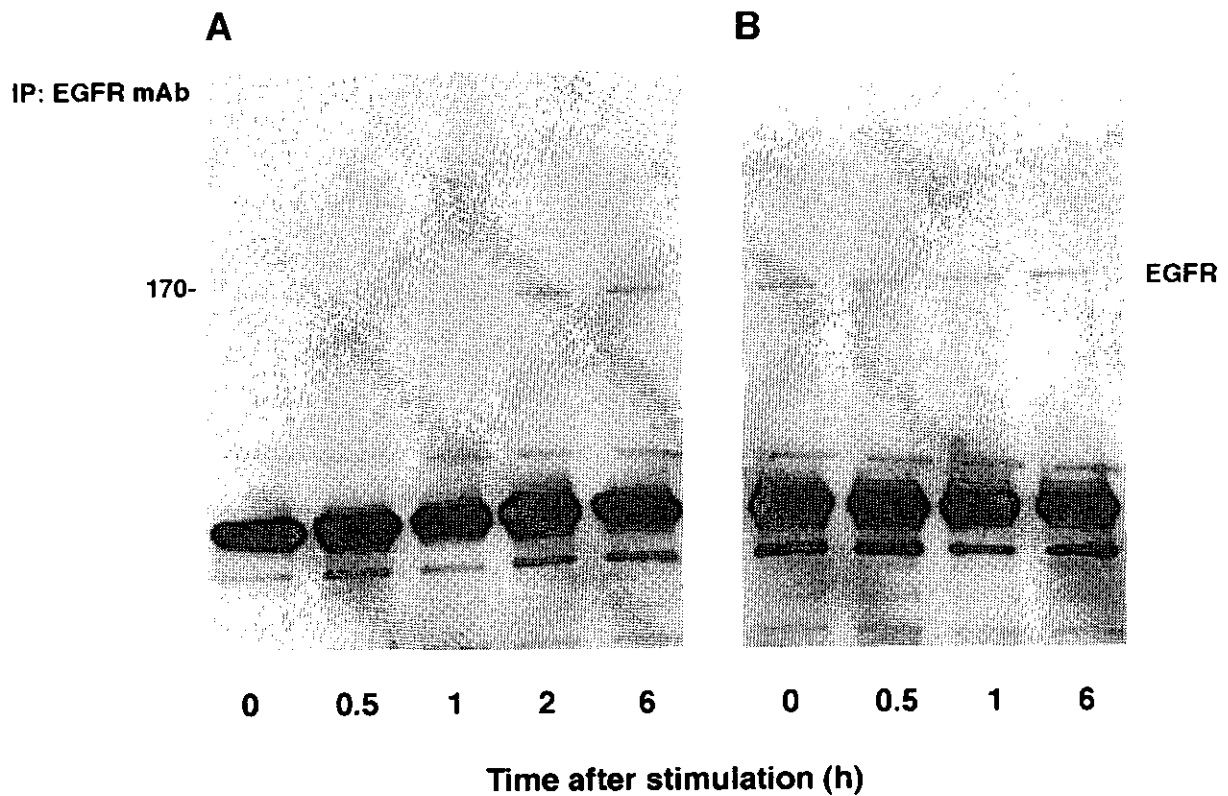


図2 EGFRの蛋白の発現。rIL-6 (10ng/ml) でNHKs (A) とPLKs (B) とを刺激した時のEGFR蛋白発現の経時的变化をウエスタンブロット法で解析した。いずれの細胞も刺激後に、抗ヒトマウスEGFRモノクローナル抗体で免疫沈降したものをSDS-PAGEで分離した。

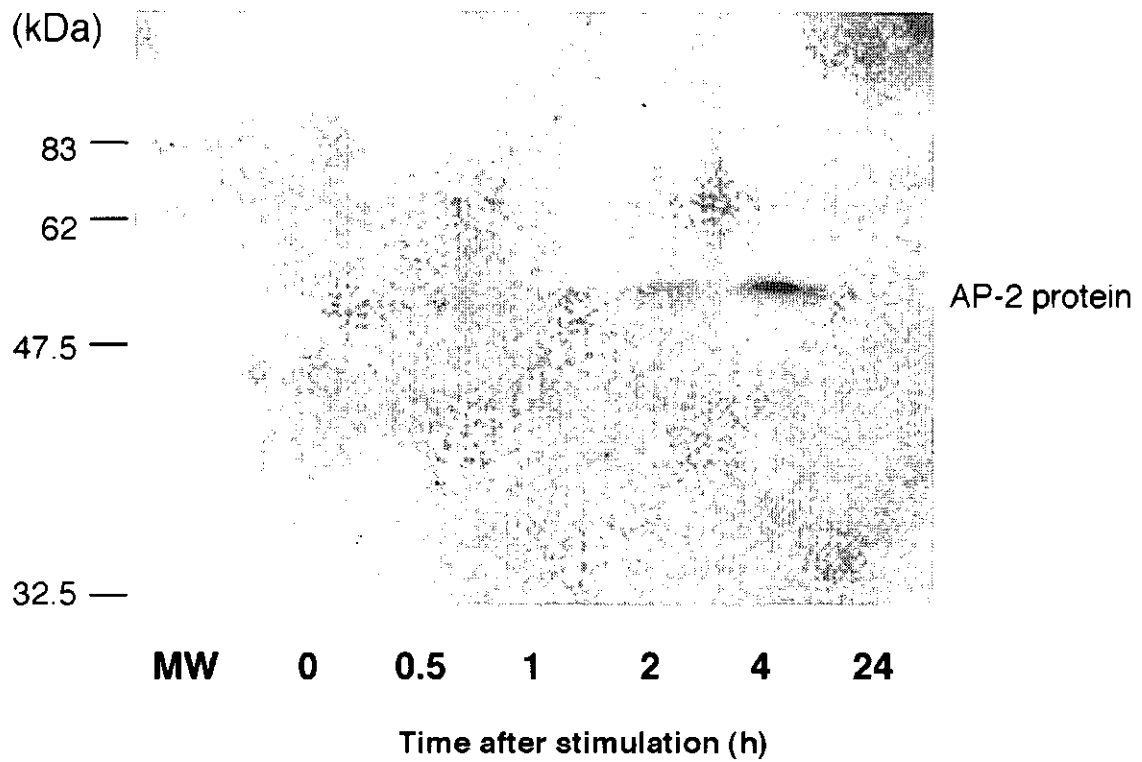


図3 AP-2 蛋白の発現。rIL-6 (10ng/ml) でNHKsを刺激した後の、核における AP-2 蛋白発現の経時的変化をウエスタンブロット法で解析した。細胞は刺激後の抗ヒトウサギ AP-2 ポリクローナル抗体で免疫沈降したものを SDS-PAGE で分離した。

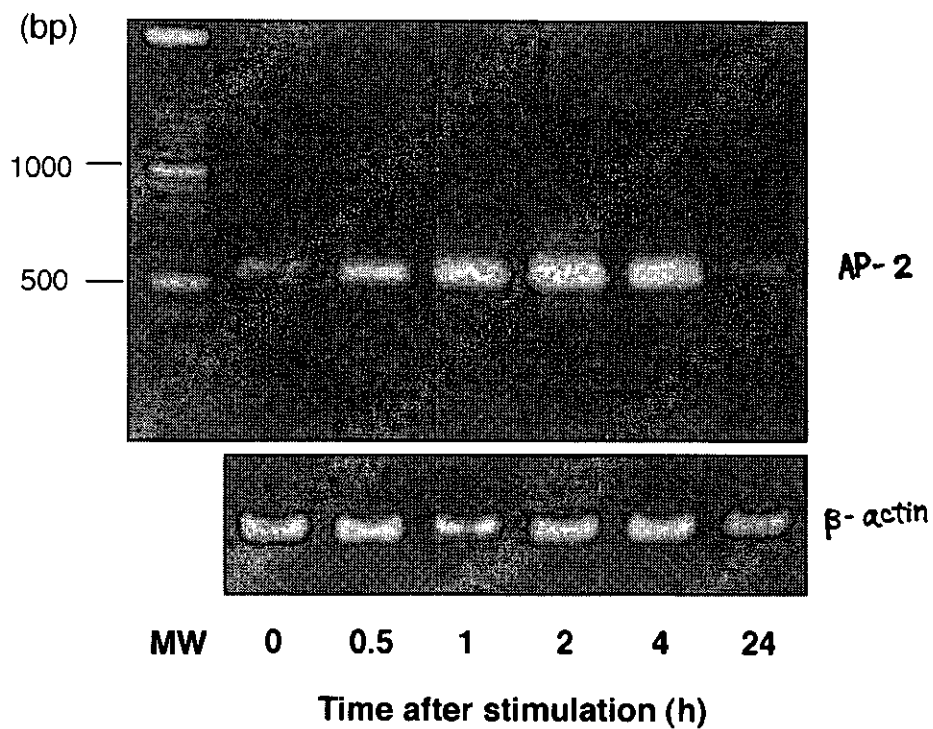


図4 AP-2 mRNA の発現。rIL-6 (10ng/ml) でNHKsを刺激した時の、AP-2 mRNA 発現の経時的変化を半定量的 RT-PCR 法で解析した。

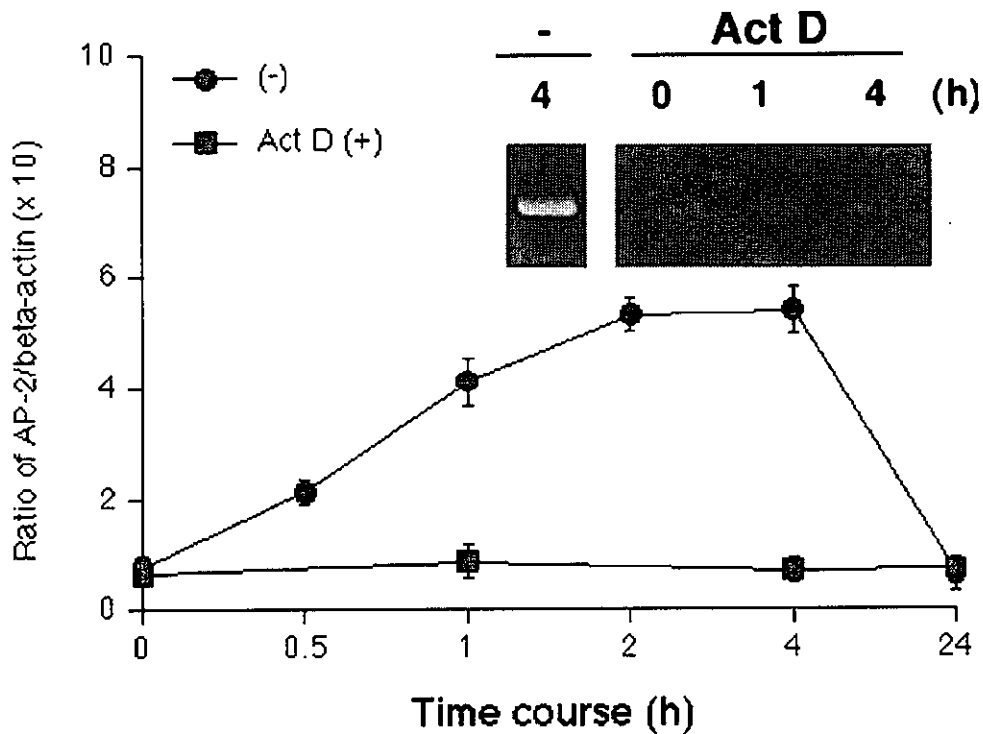


図5 AP-2 mRNA 発現亢進の機序。rIL-6 (10ng/ml) でNHKs を刺激すると同時に、actinomycin D を添加して AP-2 mRNA 発現の経時的变化を半定量的 RT-PCR 法で解析した。 $\beta$ -actin mRNA (内在性コントロール) で補正したものをグラフ化した。

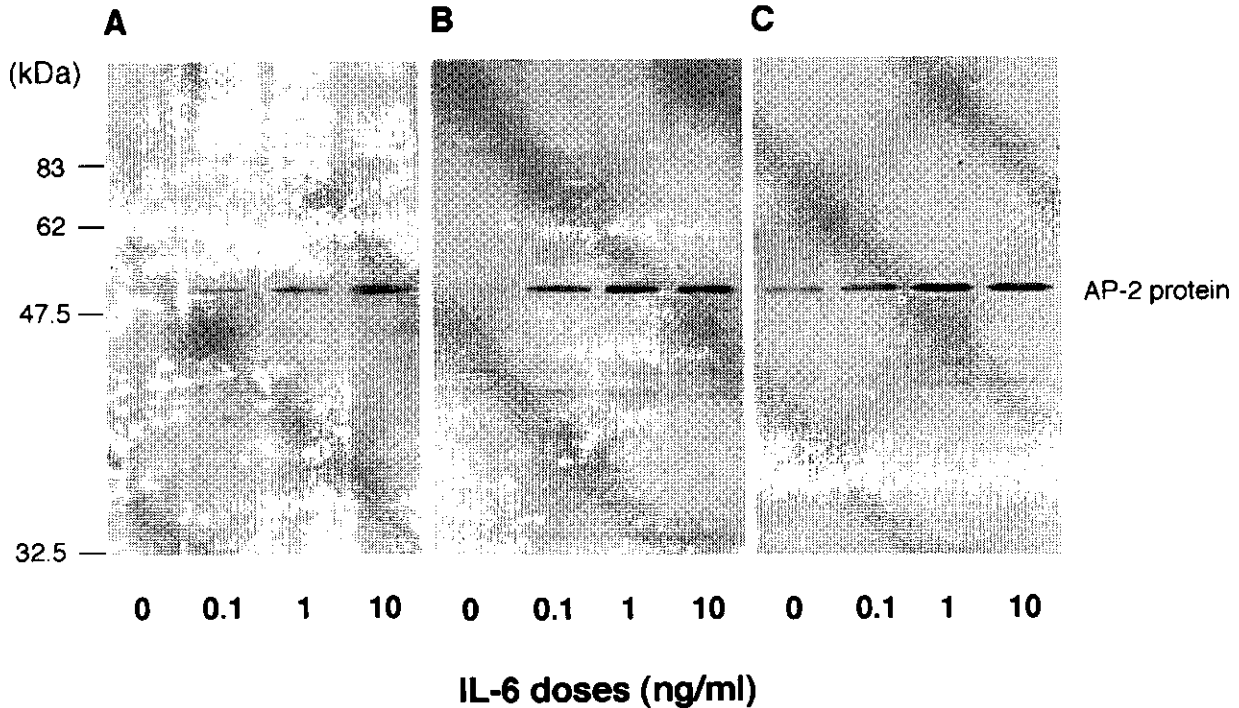


図6 細胞種による AP-2 蛋白発現の相違。rIL-6 (0-10ng/ml) でNHKs (A)、PLKs (B)、および HSC-5 (C) を各々刺激した時の、核における AP-2 蛋白発現をウエスタンブロット法で解析した。

## 6) 薬剤を契機として発症した膿疱性乾癬の発症機序の解析

研究協力者：清水 宏（北海道大学皮膚科）

### 抄 録

汎発性膿疱性乾癬は、強い全身症状とともに、全身の皮膚に潮紅、膿疱形成を認める原因不明の難治性皮膚疾患である。発症の誘因として、上気道感染、妊娠、薬剤などの関与が想定されているが、その発症機序の詳細は不明である。今回尋常性乾癬の経過中に、薬剤の摂取を契機として、発熱とともに全身の皮膚の潮紅および膿疱化をきたした2例の症例を経験した。患者末梢血を試験管内で原因薬剤と反応させ、免疫学的な解析を行った。その結果、薬剤により誘発された膿疱性乾癬においても、通常 of 膿疱性乾癬と類似の免疫学的な反応がおこなっていることが示唆され、同様のメカニズムにより発症する可能性が考えられた。

### はじめに

膿疱性乾癬の発症原因は不明であるが、臨床的に上気道感染を契機として発症する症例が多いことなどから、免疫学的な機序などが想定されており、細菌由来のスーパー抗原に対するリンパ球の反応亢進、あるいはサイトカイン産生の異常などの病態が考えられている。しかし、臨床的には妊娠あるいは薬剤の摂取なども発症のきっかけとなることは明らかであるが、これらが免疫学的に類似の反応によるものか否かについての報告はなされていない。今回、尋常性乾癬の経過中に薬剤の摂取を契機として膿疱化をきたした2例を経験したので、患者末梢血を用いて、*in-vitro*での免疫学的な解析を試みた。

### 症 例

症例1は45歳の男性で、25歳時に尋常性乾癬と診断され、外用療法を始めとして種々の治療を行っていた。1998年11月28日に、感冒症状に対して市販の総合感冒薬を内服したところ、数時間後に全身の皮膚に潮紅、さらには小膿疱を形成し、37℃台の発熱も出現した。その後の検索の結果、総合感冒薬に含まれている塩酸ジヒドロコデインでパッチテストが陽性であったが、DLSTは陰性だった。

症例2は43歳の女性で、24歳の時に尋常性乾癬と診断され、ステロイド剤の外用、エトレチナート内服などの治療を行っていた。1999年4月9日にカタル症状を自覚し、臭化水素酸デキストロメトルファンとリン酸コデインを内服したところ、数時間後に全身の皮膚に潮紅、小膿疱形成を認め、39℃台の発熱も出現した。検索の結果、リン酸コデインによりパッチテスト、DLSTの両者とも陽性であった。

以上の2例とも、臨床経過、パッチテストおよびDLSTの結果から、薬剤摂取を契機として、膿疱性乾癬の臨床症状を示したケースと考えた。膿疱性乾癬の発症メカニズムの詳細は不明であるが、近年の報告では、免疫学的機序が発症に関与していると報告されている。川嶋は、膿疱性乾癬の患者末梢血では炎症性サイトカインの濃度が上昇しており、末梢血単核球の細菌由来のスーパー抗原による増殖反応の亢進およびサイトカイン産生能の増強などが発症に関与している可能

性を報告している<sup>1)</sup>。そこで、今回の2症例について、患者末梢血の原因薬剤に対する反応性を、免疫学的側面から検討を加えた。

## 方 法

今回の2例の患者および対照の尋常性乾癬患者から、末梢血をヘパリン採血し、ファイコールによる密度勾配遠心法により、単核球分画を精製した。細胞表面マーカーの検索には、この単核球分画を抗CD14、抗CD16抗体(Becton Dickinson)と反応させ、洗浄後、FACSscanにより解析を行った。残りの細胞は10%FCS添加RPMI培養液に浮遊し、 $10^6$ mlの濃度で24-well培養プレートで培養を行った。コントロール以外のサンプルには、2段階に希釈した塩酸ジヒドロコデインおよびリン酸コデインを加えた。加える薬剤は、100mgを乳鉢ですりつぶし、5ccのRPMI培養液で溶解し、さらに1分間sonicationを行った後、遠心し上清を薬剤の原液とした。この原液を最終濃度が、50倍(高濃度)、1250倍(低濃度)になるように希釈し、培養細胞に加えた。細胞は、5%CO<sub>2</sub>、37°Cの条件で7日間培養した。7日後に、培養上清と細胞をそれぞれ回収し実験に用いた。培養上清中のIL-8、TNF- $\alpha$ の測定は、R&D社のサイトカイン測定キットを用いて行った。一方、培養細胞は、抗ヒトICAM-1抗体、さらにFITC-conjugated抗マウスIg-G抗体と順に反応させ、FACSscanにより解析を行った。

## 結 果

### 1. ICAM-1の発現

7日間の培養後、単核球細胞表面のICAM-1の発現をFACSscanにより検討した。図1に示すように、症例1、2ともに薬剤を添加したサンプルでは、薬剤を添加していないコントロールのサンプルと比較して、単核球の細胞表面のICAM-1の発現が約10倍亢進していた。

### 2) 培養上清中のTNF- $\alpha$ 、IL-8濃度の測定

7日間薬剤存在下で培養した後の上清中のTNF- $\alpha$ 、IL-8の濃度をELISA法で測定した結果を図2に示す。培養上清中のTNF- $\alpha$ 濃度は、症例1、2ともに薬剤の濃度依存性に産生増強が認められ、症例2では、高濃度の薬剤の存在下では、コントロールの約3倍のTNF- $\alpha$ が培養上清中に認められた。同様にIL-8に関しても、薬剤の添加により、症例1、2ともに約50%のIL-8の産生増加を観察した。

### 2. CD14陽性細胞の表面マーカーの解析

今回の症例1に加えて、対照として2例の尋常性乾癬患者の末梢血から、単核球分画を分離し、CD14とCD16に対する抗体を用いて、二重染色を行い、FACSscanで解析を行った。図3に示すように、尋常性乾癬の患者末梢血では、CD14陽性細胞のうち、CD16を発現している細胞は約15%であったが、今回の症例1の患者末梢血においてはCD14陽性細胞は全体的にCD16の発現が増強しており、45%がCD14とCD16を共発現していた。

## 考 察

ICAM-1はリンパ球が種々の刺激により活性化されると、その発現が亢進することが知られている。今回の結果も、2症例において原因薬剤により試験管内でリンパ球の活性化が起きたことを示しており、それぞれの薬剤が、膿疱化の原因であったことを示唆していると考えた。また、

症例1に関しては、DLSTは陰性であり、薬剤によるリンパ球の活性化を観察する場合、細胞増殖反応よりも、リンパ球活性化のマーカーの発現の変化のほうが、より鋭敏であるケースもある可能性を示唆している結果と考えられた。また、薬剤の存在下での培養により、TNF- $\alpha$ 、IL-8の産生増強が観察された。川嶋によると<sup>1)</sup>、膿疱性乾癬の患者末梢血において、血清中のTNF- $\alpha$ 、IL-8の濃度の著明な上昇および、患者末梢血の細菌由来のmitogenによるIL-8の酸性増強が報告されており（TNF- $\alpha$ では有意な差は認めなかったとされている）、今回の薬剤誘発性の膿疱性乾癬においても、やはり同様の免疫学的反応が起きている可能性を示唆するものと考えた。また、TNF- $\alpha$ に関する結果の相違に関しては、抗原刺激の違いによる可能性が考えられるが、この事は、薬剤の方がスーパー抗原と比較して、より特異的な抗原であり、その結果感度が高かったとも考えられる。ただし今回の実験に関しては、乾癬に罹患していない健常人で、同一の薬剤により膿疱以外のタイプの薬疹を生じたケースをコントロールとして用いることが必要と考えられ、今後の検討が必要と思われた。

膿疱性乾癬および尋常性乾癬の発症に関する免疫学的反応異常に関しては、サイトカインの異常、CD4陽性Tリンパ球の異常を始め多くの報告があるが、どの免疫担当細胞の量的あるいは質的異常がprimaryな変化であるかという点に関しては、未だ見解は統一していない。膿疱性乾癬に関する川嶋の報告では、IL-1の産生に関する結果から、単球の機能異常が主たる変化ではないかと考察している<sup>1)</sup>。今回の症例1において観察された、CD14陽性細胞のCD16の細胞表面における発現の亢進も、単球の機能異常が膿疱性乾癬の発症において、重要な役割を担っていることを示唆していると考えられた。しかし、この点に関しては、CD16を強発現している単球と、CD16を発現していない単球に関して、免疫学的機能の差異の点から、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

## ま と め

尋常性乾癬の経過中に薬剤の摂取により、膿疱性乾癬の臨床症状を呈した20例の症例を経験した。末梢血単核球を試験管内で、原因と考えられる薬剤と反応させ、免疫学的な検討を行った。2例ともに、薬剤の存在下での培養により、細胞表面のICAM-1の発現の増強を認め、また培養上清中のTNF- $\alpha$ とIL-8の産生増強が観察された。以前に報告されている膿疱性乾癬における免疫学的反応と類似の点が認められ、薬剤誘発性の膿疱性乾癬においても、通常の膿疱性乾癬と類似の免疫学的反応が発症に関与していることが示唆された。また、1例においては、末梢血CD14陽性細胞のCD16抗原の発現増強が観察され、膿疱性乾癬の発症に単球の機能異常が関与している可能性も示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるに当たり、今回の研究の大部分を行って頂きました北海道大学医学部皮膚科学講座、川嶋利端先生に深謝致します。

## 参考文献

1. 川嶋利端  
汎発性膿疱性乾癬発症における免疫学的メカニズムの解析



- 北海道医学雑誌 74 : 67-76, 1999
2. Baker H, Ryan TJ  
Gneralized pustular psoriasis: a clinical and epidemiologic study of 104 cases.  
Br J Dermatol 80 : 771-793, 1968
  3. 安田秀美、小林 仁、大河原 章、今村貞夫、北村清隆、稲葉 裕  
本邦における膿疱性乾癬の疫学  
日皮会誌 102 : 971-976, 1992
  4. 川嶋利端、小林 仁、大河原 章  
汎発性膿疱性乾癬  
皮膚病診察 20 : 543-546, 1998

# ICAM-1 Expression

Pt. 1

Pt. 2

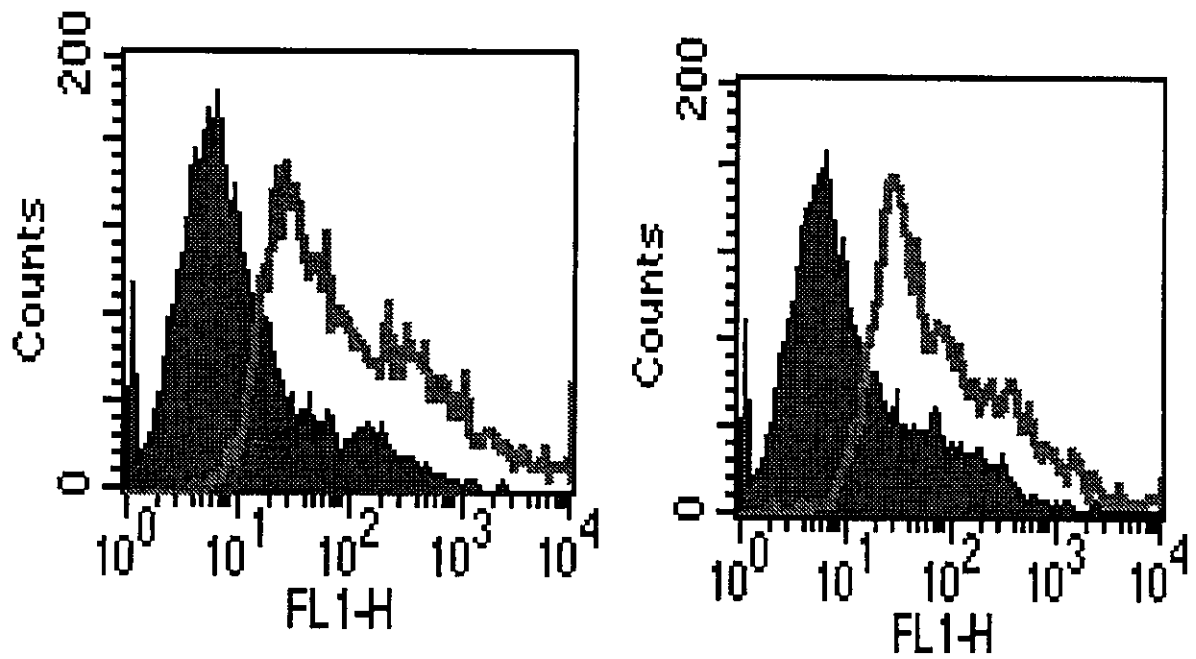


図1 患者末梢血単核球を薬剤の存在下で7日間培養後のICAM-1の発現。実線は薬剤の非存在下で培養したコントロール、薄線は薬剤の存在下で培養したサンプルを示す。

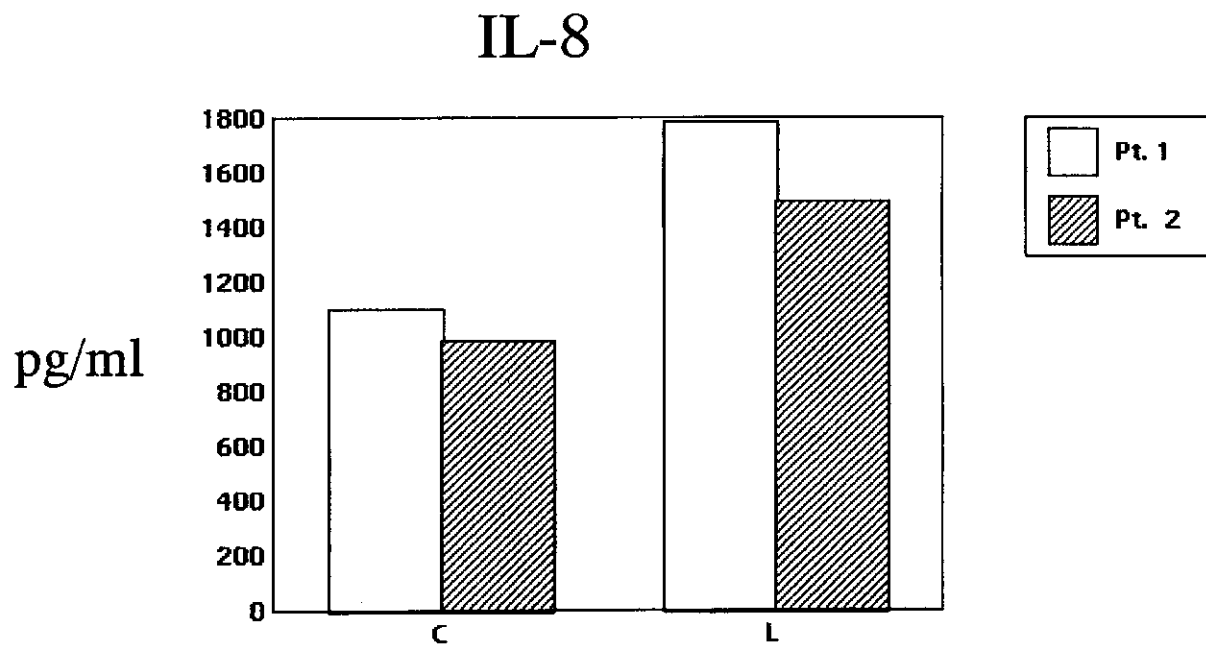
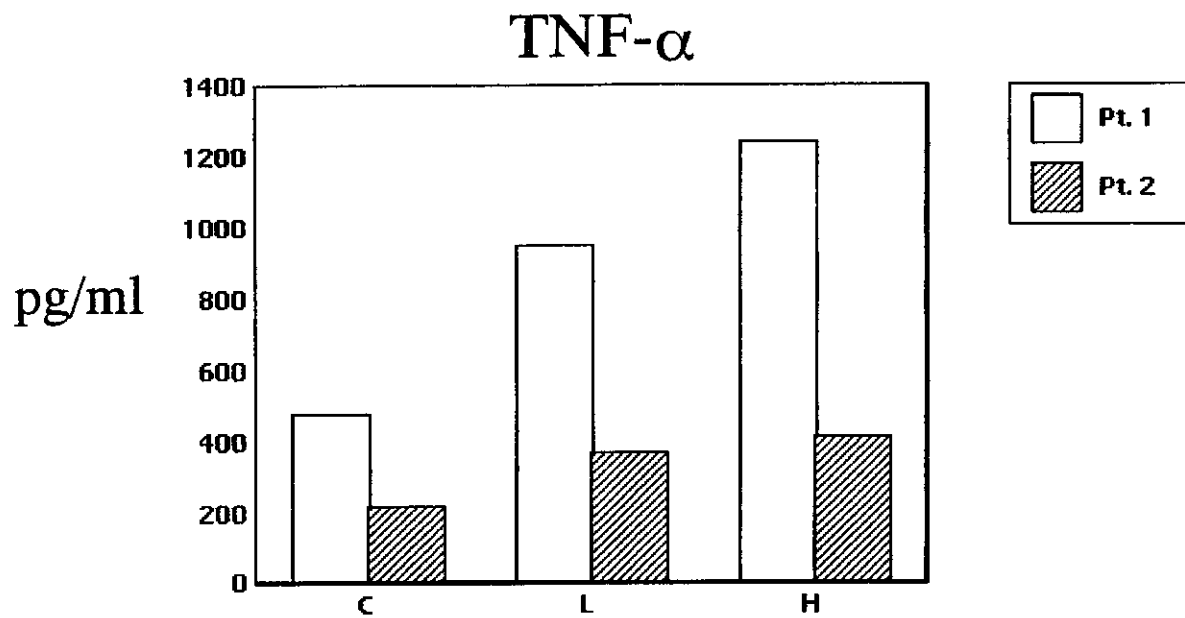
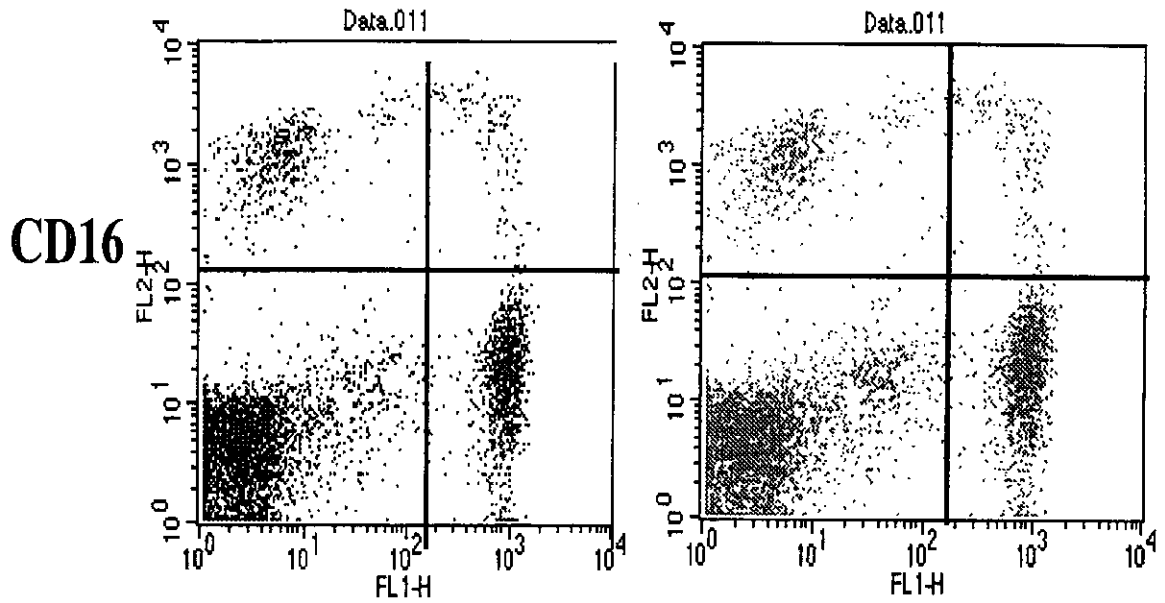


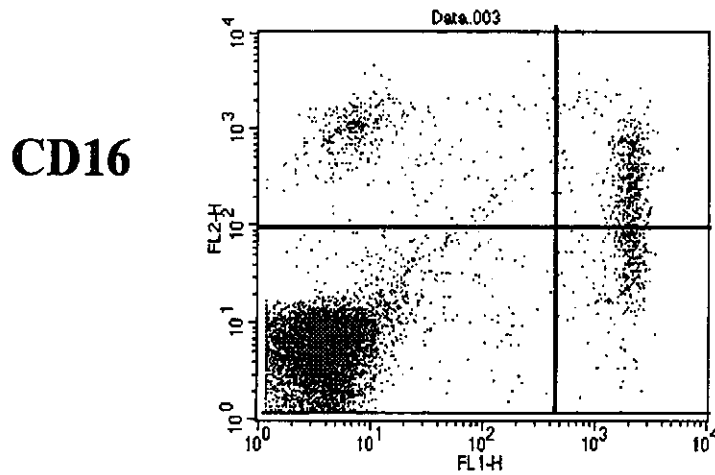
図2 患者末梢血単核球を、薬剤の存在下で7日間培養後の、上清中のTNF- $\alpha$ とIL-8の濃度。Cは薬剤を入れずに培養したコントロールを、Lは1250倍希釈、Hは50倍希釈の薬剤の存在下で培養したサンプルを示す。

# Psoriasis Vulgaris



CD14

Pt. 1



CD14

図3 今回の症例1 および尋常性乾癬患者末梢血単核球の、CD14 と CD16 の細胞表面での発現。横軸に CD14、縦軸に CD16 の発現を示す。