

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	黒木 香奈
審査委員	主査 高田 清式
	副査 羽藤 直人
	副査 田内 久道
	副査 原口 竜摩
	副査 日野 聡史

論文名 掌蹠膿疱症の「無菌性膿疱」におけるマイクロバイオームの解析

### 審査結果の要旨

#### 【背景・目的】

掌蹠膿疱症は手掌、足底に多発する膿疱を主徴とする慢性皮膚疾患で、性別、喫煙、病巣感染、金属アレルギーなど様々な悪化因子が報告されており、IL-8やIL-17などのサイトカインとの関連についても報告されているものの、いまだその病態は不明である。掌蹠膿疱症は水疱、膿疱、紅斑、苔癬化などの特徴的な皮疹を認める。掌蹠膿疱症は、その形成過程により、水疱期、水疱内膿疱期、膿疱期の3つのフェーズに分けられる。掌蹠膿疱症で生ずる膿疱は細菌培養検査陰性であり、「無菌性膿疱」と言われている。しかしながら、この場合の「無菌」とは感染によらない膿疱であるということであり、細菌培養検査で検出できるような生きた細菌、培養で増える細菌が存在しないとは言えるが、培養出来ない細菌、死菌が膿疱内に含まれている可能性は残る。この点については細菌培養検査では全ての細菌を培養することは出来ないため、これまで詳細に検討されてこなかった。今回、掌蹠膿疱症の「無菌性膿疱」は実際には無菌ではなく、培養検査で検出しえない細菌が存在するのではないかと仮説をたてて研究を行った。

#### 【方法】

近年次世代型シーケンサーの開発に伴い盛んに行われるようになった、16S ribosomal RNA シーケンス法を用いて、細菌叢解析を網羅的に行った。皮膚領域においては、皮膚表面だけではなく毛包や脂腺の細菌叢解析が行われ、さらには、これまで無菌と考えられてきた真皮内にも細菌が存在するということが報告されている。この技術を用い掌蹠膿疱症の早期病変である水疱内膿

疱の内容液より、サンガーシーケンス法と 16S ribosomal RNA シーケンス法による細菌叢解析を行った。同時に、手掌・足底に水疱の多発を生じる異汗性湿疹についても水疱内容液の細菌叢解析を行った。陰性コントロールとして、掌蹠膿疱症の水疱内膿疱および異汗性湿疹の水疱の皮膚表面をアルコール綿で消毒した後に PBS を滴下し、これを回収したものを解析した。

#### 【結果・考察】

掌蹠膿疱症 43 例と異汗性湿疹 15 例について解析し、サンガーシーケンス法では掌蹠膿疱症の水疱内膿疱より *Staphylococcus* 属や *Propionibacterium* 属、*Streptococcus* 属、*Pyrinomonas* 属の DNA が得られたが、異汗性湿疹の水疱からは細菌の DNA はほとんど得られなかった。

16S ribosomal RNA シーケンス法では、掌蹠膿疱症の水疱内膿疱より多数の細菌 DNA が得られ、門レベルでは *Firmicutes*、*Proteobacteria*、*Actinobacteria*、*Bacteroidetes* が、属レベルでは *Staphylococcus*、*Devosia*、*Streptococcus*、*Flavobacterium*、*Sphingopyxis*、*Ehydrobacter*、*Pseudomonas* の DNA が多くみられた。特に DNA 量の多かった *Staphylococcus* について注目し、掌蹠膿疱症患者の性別、罹病期間、水疱内膿疱採取部位、喫煙歴の有無にわけて、DNA 量に差がないかどうか検討した。すると性別、罹病期間、水疱内膿疱採取部位の違いと *Staphylococcus* 属の DNA 量とに有意な関連は認めなかったが、掌蹠膿疱症の喫煙群では、禁煙群と比較し水疱内膿疱中に含まれる *Staphylococcus* 属の割合が有意に高いという結果が得られた。掌蹠膿疱症の水疱内膿疱内に細菌の DNA が認められる理由については、これまでの報告において、掌蹠膿疱症の膿疱が表皮内汗管部に形成されること、掌蹠膿疱症の水疱内膿疱液では、ヒト汗を比較し抗菌ペプチドである LL-37 の濃度が高いこと、細菌叢は皮膚表面だけでなく、毛包や脂腺、汗腺の深部にも存在するということが明らかとなっていることから、表皮内汗管の常在菌が水疱内膿疱中にみられているのではないかと考察した。さらに、掌蹠膿疱症の喫煙群では非喫煙群と比較し、*Staphylococcus* 属の DNA が含まれている割合が高い理由については、これまでの報告において、喫煙が *Staphylococcus* 属の形質に影響を与え、マクロファージによる殺菌に耐性を得たり、溶菌耐性を得たり、抗菌ペプチドに対する耐性を得たりすることが明らかとなっており、喫煙群では *Staphylococcus* 属のこれらの形質が変化することにより、水疱内膿疱中で他の細菌と比較し増殖している可能性が考えられた。

#### 【結論・意義】

掌蹠膿疱症の「無菌性膿疱」には細菌の DNA が含まれていること、喫煙が *Staphylococcus* 属の増加に影響を及ぼす可能性があることが示された。

公開審査は、平成31年1月16日に開催され、申請者は研究内容を英語で口頭発表した。各審査委員からは、①V1-V2領域が適切として解析を進めた理由、②サンガーシーケンス法で同定したDNAの菌種の性状、③LL-37が高濃度であったことによる影響、④無菌性膿疱に抗菌薬のうちcefcapepe pivoxil hydrochlorideが特に効果的な理由、⑤細菌の存在を最初に仮説をした経緯、⑥喫煙が影響を及ぼす作用機序、⑦検体の必要量とコンタミネーションの有無、⑧手足に疾患・菌が限局する理由、⑨扁桃摘出が有効な理由、⑩女性に多い理由、⑪治療法、等について質問がなされた。これらについて申請者は、質問の意図を十分に理解し明快に答え、本研究に関する領域について学位授与に値する十分な知識と見識を有することを示した。審査委員は全員一致で、本論文を高く評価し、博士（医学）に相応しいと結論した。