

# 乾癬無疹部表皮に対するテープストリッピングの表皮増殖における作用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9133">http://hdl.handle.net/2297/9133</a>

## 乾癬無疹部表皮に対するテープストリッピングの 表皮増殖における作用

金沢大学医学部皮膚科学講座 (主任: 竹原和彦教授)

八 田 尚 人

乾癬20例の無疹部皮膚および非乾癬患者18例の正常皮膚にテープストリッピングを行い48時間後の細胞動態学的変化を検討した。細胞動態学的変化の指標としてフローサイトメトリーにより測定されたS期細胞の分画およびG2+M期細胞の分画, 組織学的・組織化学的手法により算定されたプロモデオキシウリジン標識指数, 核分裂指数, Ki-67 抗原陽性率, DNAポリメラーゼ $\alpha$  (DNA polymerase  $\alpha$ , Pol $\alpha$ ) 陽性率を用いた。さらに形質転換増殖因子 (transforming growth factor  $\alpha$ , TGF $\alpha$ ), 表皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFr) の発現についても組織化学的に観察した。非刺激部においては乾癬患者と非乾癬患者との間で各指標の値に有意な差は認められなかった。テープストリッピングによる刺激部では乾癬患者における各指標の値はいずれも非乾癬患者の値に比べ高値を示した。Ki-67 および Pol $\alpha$  陽性細胞は乾癬・非乾癬患者とも非刺激部では表皮基底層のみに, 刺激部では基底層に加え基底層の2から3層上層まで認められた。刺激部の Ki-67 および Pol $\alpha$  陽性率は乾癬患者の方が非乾癬患者に比べて高値を示した。全表皮細胞に対する TGF $\alpha$  陽性細胞の占める割合は乾癬患者の刺激部において非乾癬患者の刺激部に比較し, より高率であったが, EGFr 陽性細胞に関しては両者の間に差はみられなかった。得られた成績から, 非乾癬患者に比べて乾癬患者ではストリッピング刺激により顕著な増殖活性の亢進と細胞周期を回転している細胞の増加, および TGF $\alpha$  の過剰発現が惹起されることが示された。

**Key words** epidermal cell kinetics, psoriasis, tape stripping

尋常性乾癬は厚い鱗屑を伴う紅斑が全身に多発する慢性的の皮膚疾患であるが, その発症機序についてはいまだに不明な点が多い。その病態として表皮細胞の増殖亢進のほかに表皮細胞のターンオーバー時間の短縮<sup>1)</sup>, 角化異常<sup>2)</sup>, Tリンパ球および好中球の活性化<sup>3)</sup>などが示されており, 上記の異常が表皮肥厚や錯角化などの特徴的な組織像を形成する機序となっていると考えられる。

また, 乾癬患者では一見正常にみえる無疹部皮膚に刺激が加わることで乾癬の皮疹が誘発される Koebner 現象<sup>4)</sup>がしばしば観察される。この現象を利用してテープストリッピングによる角層除去刺激により乾癬皮疹の形成機序を解明しようとする試みが諸家によりなされており, 乾癬患者ではテープストリッピング後に正常人に比べて真皮中のブドウ糖-6-リン酸脱水酵素およびアルカリリン酸化酵素値が高値を示すこと<sup>5)</sup>, ランゲルハンス細胞の活動性が亢進すること<sup>6)</sup>, 血清中のフィブリノーゲンなどの表皮内への漏出が亢進すること<sup>7)</sup>などが報告されている。このように刺激に対する反応性の亢進が乾癬皮疹の形成に関与していることが示されてきたが, テープストリッピング後の表皮細胞の増殖活性については, 乾癬患者では刺激後に正常表皮に比べ増殖活性が亢進するとする報告<sup>8)</sup>と, 差がないとする報告<sup>9)</sup>がありいまだ明確な結論が得られていない。

そこで著者は乾癬における機械的刺激的の表皮細胞増殖に対す

る影響を明らかにすることを目的とし, 以下の実験を行った。すなわち, 乾癬患者の無疹部にテープストリッピングを行い, フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) により測定されるSおよびG2+M期細胞分画の値, 組織学的・免疫組織化学的手法により算定されたプロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) 標識指数 (labeling index, LI), 核分裂指数 (mitotic index, MI), Ki-67 抗原陽性率, DNAポリメラーゼ $\alpha$  (DNA polymerase  $\alpha$ , Pol $\alpha$ ) 陽性率を指標とし, テープストリッピングによる刺激が表皮細胞動態に及ぼす影響について検討した。また, 同時に免疫組織化学的手法により表皮増殖に関連したサイトカインである表皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFr) および形質転換増殖因子 $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ , TGF $\alpha$ ) の発現についても検討した。

### 対象および方法

#### 1. 対 象

金沢大学医学部附属病院皮膚科を受診した尋常性乾癬患者20例 (男14例, 女6例, 平均年齢55.8歳) および当科で皮膚良性腫瘍の切除を受けた非乾癬患者18例 (男10例, 女8例, 平均年齢56.6歳) を対象とした。患者には予め, 研究の意義と方法を説明し同意を得た。乾癬患者は原則として未治療のものを選び, 既治療例においても被検2カ月以内に紫外線療法およびエトレ

平成7年1月25日受付, 平成7年2月28日受理

Abbreviations: BrdU, bromodeoxyuridine; DAB, diaminobenzidin; EGFr, epidermal growth factor receptor; FCM, flow cytometry; LI, labeling index; MI, mitotic index; PAP, peroxidase-anti-peroxidase; PBS, phosphate buffered saline; Pol $\alpha$ , DNA polymerase  $\alpha$ ; TGF $\alpha$ , transforming growth factor  $\alpha$

チネート, メソトレキセートの内服治療を受けた者は除外した。なお, コルチコステロイドの外用治療中の患者は2週間外用を中止した後にテープストリッピング処置を行った。

II. テープストリッピング

被検部位は紫外線曝露による影響を避けるため非露出部から選び, 乾癬の皮疹から最低5cm以上離れた腰臀部, 鼠径部, あるいは前胸部とした。テープストリッピングはPinkusの方法<sup>10)</sup>に従って行った。すなわち被検部の皮膚に長さ約30mmのセロハンテープ(ニチバン, 東京, 幅24mm)を密着させたのち, それを迅速にはがすことにより角質を除去した。この操作を同一部位で繰り返し, 角質が完全に除去され皮膚に光沢が得られるまで行った。角質が完全に除去されるまで通常20から30回の操作を必要とした。48時間後にストリッピング刺激部とストリッピング刺激を加えていない無疹部を0.5%塩酸リドカインによる局所麻酔下に生検した。非乾癬患者についても乾癬患者と同様の処置を行い, ストリッピング刺激部と非刺激部の2カ所を生検した。生検皮膚はすみやかに4分割し, FCM測定, MIの算定, BrdU標識および, Ki-67, Polα, EGFR, TGFαの免疫染色に供した。

III. FCM測定

FCM測定は川原<sup>11)</sup>の方法に準じて行った。略述すると, テープストリッピング処置皮膚と対照とした未処置皮膚をそれぞれ0.5%と1%酢酸に4℃で24時間浸漬して表皮を真皮から剝離し, 次いで表皮を0.3%ジチオスレイトール(半井化学, 京都)を含む0.01Mリン酸緩衝食塩水(phosphate-buffered saline, PBS)にテープストリッピング刺激部皮膚は室温で, 非刺激部皮膚は37℃で15分間浸漬後超音波処理し, 濾過後遠心して単核浮遊液を採取した。さらに, 単核液を0.1%RNA分解酵素(type II-A, Sigma Chemical, St. Louis, U.S.A.)含有PBSに37℃で30分間浸漬, 沃化プロピジウム(Sigma Chemical)50μg/ml含有トリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)で1時間染色し, 20μmナイロンメッシュで濾過してFCM測定に供した。単離

核のDNA量の測定には日本分光FCM-1S型フローサイトメーターを使用した。S期細胞分画(S分画)およびG2+M期細胞の分画(G2+M分画)の値はフローサイトメーターに直結したコンピューターを用いてDNAヒストグラムから算定し, いずれも表皮の全有核細胞数に対する百分率で表した。

IV. BrdULIの算定

BrdULI算定のための試験管内(in vitro)BrdU取り込みはSasakiら<sup>12)</sup>の方法に従って行った。略述すると, 生検した組織片の一部を3気圧のカルボゲン(95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>の混合ガス)で加圧した200μM BrdU(Sigma Chemical)含有ダルベッコ変法イーグル培地(ニッスイ, 東京)中に37℃で1時間浸漬後, 70%エタノール中に室温で24時間固定し, 54℃でパラフィンに包埋した。4μm切片を脱パラフィン後0.3%過酸化水素添加メタノールに室温で20分間浸漬, 2M塩酸に室温で1時間浸漬, 引き続き10%ウサギ正常血清(ヒストファインSAB-POキット, ニチレイ, 東京)に室温で10分浸漬後, 抗BrdU単クローン抗体(希釈度1:25, Becton-Dickinson Co., Mountain-view, U.S.A.)に4℃で18時間浸漬した。次いで切片をビオチン化抗マウス免疫グロブリン抗体とペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ヒストファインSAB-POキット, ニチレイ)を用いるストレプトアビジン-ビオチン法により処理し, ジアミノベンジジン(diaminobenzidin, DAB)反応により発色後, ヘマトキシリンで対比染色した。同一細胞の観察を避けるために3枚目ごとの切片を光学顕微鏡で観察した。LIの算定には, 毛包間表皮基底細胞を2000個数え, その間における基底層および基底層直上層の標識細胞数を求め, LIを全標識細胞の基底細胞数に対する百分率で表した。

V. MIの算定

生検皮膚片の一部を10%緩衝ホルマリン液で固定後パラフィンに包埋した。4μm切片を脱パラフィン後ヘマトキシリン・エオジン染色し, 3枚目ごとの切片を鏡検した。MIの算定には基底細胞を2000個数え, またその間における基底層および基底

Table 1. Comparison of cell cycle parameters from the normal skin of the controls and non-lesional skin of psoriasis

Group	Number of subjects	Percentage of cells in		BrdU labeling index (%)	Mitotic index (%)	Percentage of	
		S phase	G2+M phase			Ki-67-positive cells	Polα-positive cells
Control	18	2.05±0.70 <sup>a)</sup>	1.50±0.63	3.1±2.1	0.1±0.1	103.6±2.5	104.2±4.4
Psoriasis	20	2.28±0.76	1.54±1.02	4.2±2.4	0.2±0.3	104.1±3.6	106.3±3.6

BrdU, bromodeoxyuridine; Polα, DNA polymerase α.  
a)  $\bar{x} \pm SEM$ .

Table 2. Comparison of cell cycle parameters of psoriasis and the controls 48 hr after stripping

Group	Number of subjects	Percentage of cells in		BrdU labeling index (%)	Mitotic index (%)	Percentage of	
		S phase	G2+M phase			Ki-67-positive cells	Polα-positive cells
Control	18	6.24±2.40 <sup>a)</sup>	4.71±2.17	10.1±4.3	0.6±0.3	130.7±13.9	129.8±9.2
Psoriasis	20	9.35±3.47*	6.93±3.64*	16.2±5.6*	1.5±0.9*	155.6±17.8*	146.7±17.9*

BrdU, bromodeoxyuridine; Polα, DNA polymerase α.  
a)  $\bar{x} \pm SEM$ .  
\*p<0.05 vs. control.

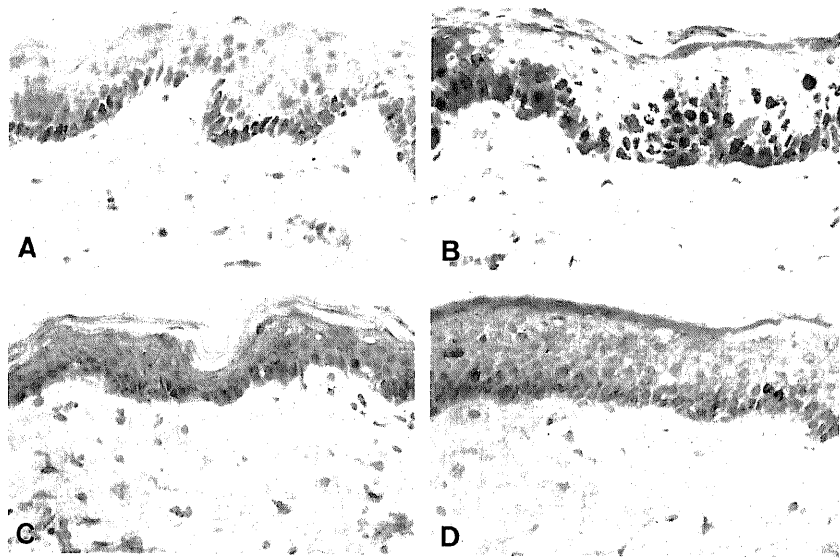


Fig. 1.

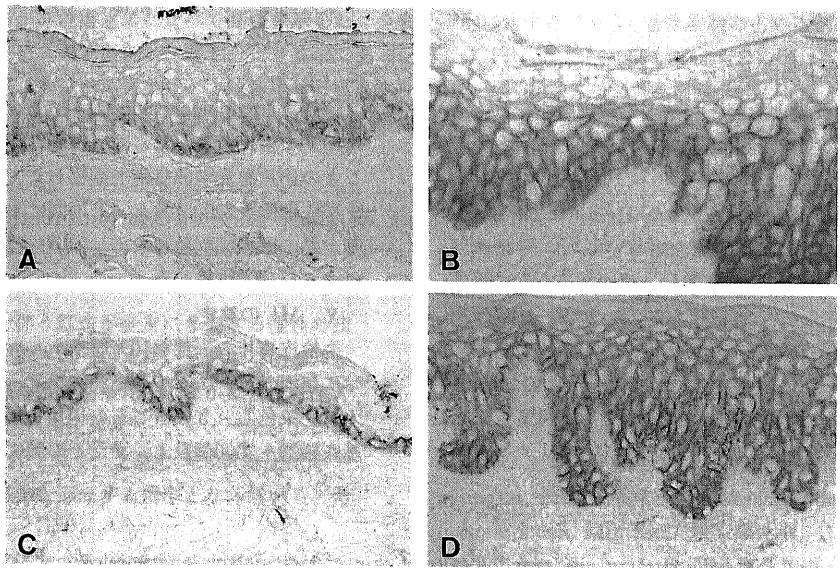


Fig. 2.

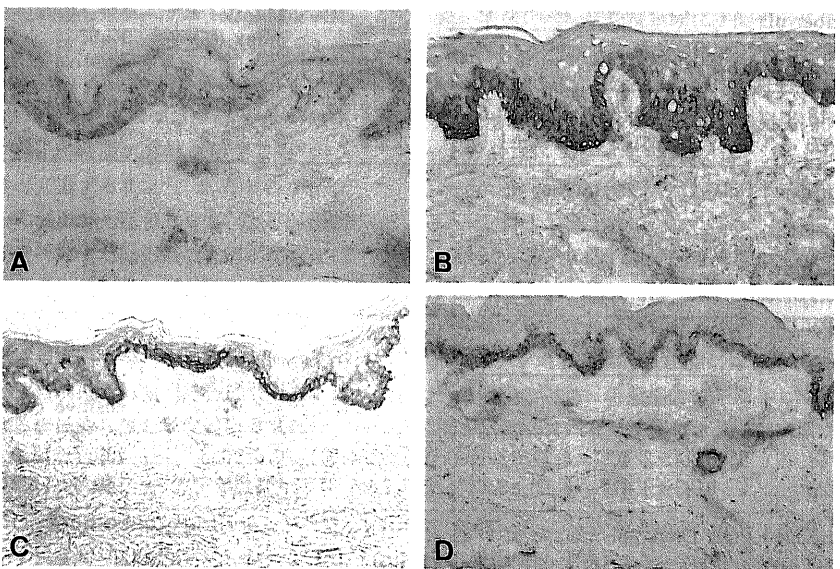


Fig. 3.

層上層に存する分裂前期から分裂後期間での核分裂像を示す細胞数を求め、MI を全分裂細胞数の基底細胞数に対する百分率で表した。

#### VI. Ki-67 陽性率の算定

Ki-67 免疫染色は Raymond ら<sup>13)</sup>の方法に従った。略述すると、生検組織の 4 $\mu$ m 凍結切片を冷アセトンで20分間固定し、3%過酸化水素水に室温で5分間浸漬、引き続き10%ウサギ正常血清(ヒストファイン SAB-PO キット, ニチレイ)に室温で10分浸漬後、抗 Ki-67 単クローン抗体(希釈度 1:10, Dakopatts, Copenhagen, Denmark)に室温で90分間浸漬した。次いで BrdU 染色の場合と同様にストレプトアビジン-ビオチン法により処理し、DAB を用いて発色させ、ヘマトキシリンで対比染色した。なお、メラニン色素が DAB 反応産物と判別し難い標本では発色試薬にアミノエチルカルバゾールを用いた。対照標本の作製には一次抗体の代りに PBS を用いた。Ki-67 陽性率の算定には、毛包間表皮基底細胞を1000個数え、その間における基底層および基底層上層の陽性細胞数を求め、Ki-67 陽性細胞数を全陽性細胞の基底細胞数に対する百分率で表した。

#### VII. Pol $\alpha$ 陽性率の算定

Pol $\alpha$  免疫染色は Tsutsumi ら<sup>14)</sup>の方法に従った。すなわち、生検組織の 4 $\mu$ m 凍結切片を4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液(pH 7.4)に4℃で30分間固定後、3%過酸化水素水に室温で5分間浸漬、引き続き正常ヤギ血清に室温で5分間浸漬後、抗 Pol $\alpha$  マウス単クローン抗体(希釈度 1:1, MBL, 名古屋)に室温で18時間浸漬した。次いでヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体(MBL)とペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ(peroxidase-anti-peroxidase, PAP)複合体試薬(MBL)を用いた PAP 法により処理し、DAB を用いて発色させ、ヘマトキシリンで対比染色した。Pol $\alpha$  陽性率の算定は Ki-67 陽性率算定の場合と同様の方法で行い、Pol $\alpha$  陽性率を全陽性細胞の基底細胞数に対する百分率で表した。

#### VI. EGFr および TGF $\alpha$ 免疫染色

EGFr および TGF $\alpha$  免疫染色は一次抗体として抗 EGFr マウス単クローン抗体(希釈度 1:40, Oncogene Science, New York, U.S.A.) および抗 TGF $\alpha$  マウス単クローン抗体(希釈度 1:40, 湧永製薬, 広島)を用い、以下の操作は Ki-67 免疫染色と同様の方法で行った。

#### VIII. 統計学的処理

各群の S 分画, G2+M 分画, BrdULI, MI, Ki-67 陽性率, および Pol $\alpha$  陽性率はいずれも平均値土標準誤差( $\bar{x}$   $\pm$  SEM)で表した。多群間の平均値の差は一元配置分散分析後, Scheffe 法による多重比較により検定した。p < 0.05 を有意とした。

#### 成 績

I. テープストリッピング非刺激部における表皮細胞動態  
非刺激部では乾癬と非乾癬の間で S 分画, G2+M 分画, BrdU Li, MI Ki-67 陽性率, および Pol $\alpha$  陽性率の値に有意の差は認められなかった(表 1)。

II. テープストリッピング刺激48時間後の各細胞分画の変動  
テープストリッピング刺激後各細胞分画の指標は乾癬, 非乾癬のいずれにおいても非刺激部に比べて有意の上昇を示した。すなわち乾癬患者では S 分画の値は 2.28  $\pm$  0.76% から刺激後には 9.35  $\pm$  3.47% へと 4.1 倍の増加を示した。G2+M 分画, BrdULI も S 分画と同様に刺激後にそれぞれ 4.5 倍, 3.9 倍に増加した。MI は増加率が最も高く, 刺激前の 0.2  $\pm$  0.3% から刺激後は 1.5  $\pm$  0.9% へと 7.5 倍に増加した。非乾癬患者の刺激後の S 分画, G2+M 分画, BrdULI 値は 3.0 ~ 3.3 倍, MI は 6 倍と乾癬患者に比べて低い増加率を示した。いずれの指標も乾癬患者では非乾癬患者に比べて刺激後の値は有意に高値を示した(表 2)。

#### III. テープストリッピング刺激48時間後の Ki-67 および Pol $\alpha$ 陽性細胞の変動

いずれの標本においても Ki-67 と Pol $\alpha$  免疫染色はほぼ同様の所見を示した。すなわち, Ki-67 および Pol $\alpha$  陽性細胞は乾癬, 非乾癬とも非刺激部では基底層に局限していたが, テープストリッピング刺激後, 非乾癬では基底層およびその直上層に, 乾癬ではさらにその 1 ~ 2 層上層まで認められた(図 1)。Ki-67 および Pol $\alpha$  陽性率は刺激前は乾癬, 非乾癬ともほぼ 100% を示したが, 刺激後は基底層上層の陽性細胞の増加により乾癬患者で 38%, 非乾癬患者で 25% の増加を示した。

Ki-67 および Pol $\alpha$  陽性率はいずれも乾癬患者では非乾癬患者に比べて刺激後有意に高値を示した(表 2)。

#### IV. テープストリッピング刺激48時間後の EGFr 免疫染色所見

EGFr は乾癬, 非乾癬とも非刺激部では主に基底層の細胞膜

Fig. 1. Immunohistochemical staining of Ki-67-positive cells. (A) Non-lesional skin from a psoriatic patient. Ki-67-positive cells were localized exclusively in the basal layer. (B) Non-lesional skin from a psoriatic patient 48 hr after tape stripping. Ki-67-positive cells were also seen in suprabasal and prickle cell layer. (C) Normal skin from a control subject. Ki-67-positive cells were localized exclusively in the basal layer. (D) Normal skin from a control subject 48 hr after tape stripping. Ki-67-positive cells were also seen in suprabasal and prickle cell layer. Original  $\times$ 200.

Fig. 2. Immunohistochemical staining of EGF receptor-positive cells. (A) Non-lesional skin from a psoriatic patient. EGF receptor expression was mostly in the basal and suprabasal cell layer. (B) Non-lesional skin from a psoriatic patient 48 hr after tape stripping. EGF receptors were detected not only in the basal cell layer, but also in the upper prickle cell layer. (C) Normal skin from a control subject. EGF receptor expression was mostly in the basal and suprabasal cell layer. (D) Normal skin from a control subject 48 hr after tape stripping. EGF receptors were detected not only in the basal cell layer, but also in the upper prickle cell layer. Original  $\times$ 200.

Fig. 3. Immunohistochemical staining of TGF- $\alpha$  positive cells. (A) Non-lesional skin from a psoriatic patient. TGF- $\alpha$  expression was mostly in the basal and suprabasal cell layer. (B) Non-lesional skin from a psoriatic patient 48 hr after tape stripping. TGF- $\alpha$  positive cells were also seen in suprabasal and prickle cell layer. (C) Normal skin from a control subject. TGF- $\alpha$  expression was mostly in the basal cell layer and a part of suprabasal cell layer. (D) Normal skin from a control subject 48 hr after tape stripping. TGF- $\alpha$  expression was exclusively in the basal cell layer and a part of suprabasal cell layer. Original  $\times$ 125.

に弱く陽性を示したのに対し、ストリッピング刺激後は両者とも表皮のはぼ全層の細胞膜に陽性を示した。ストリッピング刺激後の所見は乾癬と非乾癬の間で明らかな差異は認められなかった(図2)。

#### V. テープストリッピング刺激48時間後の TGF $\alpha$ 免疫染色所見

TGF $\alpha$  は乾癬、非乾癬とも非刺激部では表皮基底層の細胞質に陽性であった。しかし、ストリッピング刺激後の TGF $\alpha$  の発現は両者の間で明らかな差異がみられ、非乾癬では依然基底層に限局していたが、乾癬では基底層だけでなくその2~3層上層まで TGF $\alpha$  の発現が認められた(図3)。

### 考 察

Pinkus<sup>10)</sup> は正常ヒト表皮におけるテープストリッピング刺激後の細胞動態を組織学的に検討し、刺激後48から72時間後に核分裂像は最大値を示すこと、表皮細胞数は24時間後まで若干の減少を示すがその後基底層の核分裂により増加し48時間後に処置前のレベルに戻り72時間後には処置前より増加すること、基底細胞は刺激により核が増大しそのため刺激直後より表皮肥厚がおきることなどを示した。その後 FCM の利用によりテープストリッピングの作用はより明らかになってきた。ヘアレスマウスでは刺激により細胞周期を回転している細胞は部分的に同調し、同調した細胞集団によりS期細胞が増加することや、細胞周期時間が著明に短縮することが示された<sup>15)</sup>。また、ヒト表皮ではテープストリッピングにより同調した細胞の集団は刺激の36~40時間後までにS期に流入し、44~48時間後にG2+M期を通過する<sup>16)</sup>。このように表皮におけるテープストリッピングの影響は細胞周期を回転している細胞の部分的同調と細胞周期時間の短縮であり、それによってもたらされるS期細胞やG2+M期の細胞の増加はヒトではほぼ48時間後にピークを示し、72時間以後に表皮細胞数の増加がみられることが明らかになっている。

一方、乾癬患者の無疹部に対するテープストリッピングの細胞動態学的作用の報告は未だ少ない。van de Kerkhof ら<sup>9)</sup> は FCM を用いてテープストリッピングの細胞動態学的作用について経時的に検討し、S期の割合は乾癬患者の無疹部も正常対照と同様に48時間後にピークを示し、また、乾癬患者ではテープストリッピング48時間後の値は対照に比べて高値を示したが(17%, 対照13%) 統計的に有意差はなかったと報告した。これに対して Rico ら<sup>8)</sup> はテープストリッピング48時間後の MI が対照に比べ有意に高いこと示し、乾癬患者では無疹部における刺激に対する反応性が亢進していると報告した。また、Wiley ら<sup>9)</sup> は乾癬患者では生理食塩水またはプロプラノロールの皮内注射後の表皮増殖が亢進していることを<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みによる LI を用いて示しているが、テープストリッピングによる刺激では有意差はなかったと報告している。このように乾癬無疹部のテープストリッピング後の表皮細胞動態の変化については従来の報告における FCM や MI, LI による検討では一定の結果とならず統一的な結論は未だ得られていない。

そこで著書は従来から用いられてきた FCM や MI, LI などの方法に加え、細胞周期を回転している細胞のマーカーとして Ki-67 および Pola の免疫染色による検出法を用いた。LI はチミジンのかわりにS期細胞にのみ取り込まれる BrdU を用いた試験管内取り込み法により算定した。Ki-67 抗原は細胞周期上

の G1, S, G2 およびM期細胞ではすべて陽性であるが G0 期細胞では陰性であること<sup>17)</sup> から細胞周期を回転している細胞のマーカーとして用いることができる。また、Pola も Ki-67 と生物学的意義は異なるものの、Ki-67 抗原と同様に細胞周期を回転している細胞に発現することが示されている<sup>14)</sup>。さらに表皮細胞の増殖に密接に関連したサイトカインである TGF $\alpha$  とその受容体である EGFR の発現を免疫染色により組織切片上で観察し、その差異について検討した。ヒトにおける表皮細胞動態の経時的変動の検討は困難なため、テープストリッピングにより増加したS期やG2M期細胞の割合がピークを示す48時間後の時点を選び、乾癬無疹部における表皮細胞動態の変化を対照と比較検討した。

著者の実験では乾癬患者の非刺激部におけるSおよびG2+M期細胞分画の値、BrdULI, MI, Ki-67 抗原陽性率、Pola 陽性率はいずれも非乾癬患者の非刺激部における値より若干高値を示したものの有意差は認められなかった。この点に関しては van de Kerkhof ら<sup>9)</sup> の報告と一致している。乾癬患者の無疹部の表皮細胞動態については従来から LI や MI が正常よりも高いという報告もみられるが<sup>10)19)</sup>、これらの報告における乾癬患者の無疹部皮膚は一見正常にみえるものの軽微な刺激を受けて既に増殖活性が亢進していたという可能性は否定できない。しかしながら著者の実験ではすべての指標において両者の増殖活性の間に差が認められなかったことから乾癬患者の無疹部と正常皮膚との間に表皮細胞動態における差はないと考えられた。

テープストリッピング刺激後、各指標の値は乾癬患者、対照とも非刺激部に比べて高値を示し、テープストリッピング刺激後の増殖活性は FCM により算定されたSおよびG2+M分画、MI, BrdULI により算定されたS期およびM期細胞の比率、Pola および Ki-67 陽性率により算定された細胞周期を回転している細胞の割合のいずれにおいても亢進することが示された。また、刺激後の各指標の値はいずれも乾癬患者では非乾癬患者よりも高値を示しており、この点で著者の実験結果は Rico ら<sup>8)</sup> の報告と一致した。

さらに今回著者が用いた Pola および Ki-67 抗原のテープストリッピング後の変動は若干の新知見を提供した。著者の実験結果では正常ヒト表皮では基底層の細胞のほとんどが Ki-67 および Pola 陽性であり細胞周期を回転している細胞と考えられた。また、刺激前の Ki-67 および Pola 陽性率から、乾癬無疹部と正常皮膚の間では細胞周期を回転している細胞の比率に差がないことが明らかにされた。テープストリッピングにより基底細胞の2から3層上層の細胞まで Ki-67 および Pola が陽性になり、細胞周期を回転している細胞が増加することが観察されたが、これは細胞周期を回転していないが増殖能を有する細胞である G0 期の細胞が刺激により細胞周期に参入してきたものと考えられた。Boezeman ら<sup>18)</sup> は FCM を用いた実験結果から、理論上テープストリッピング後の DNA 合成に際しては G1 期細胞のS期への流入だけでなく、G0 期細胞からの動員があるはずであると推測しているが、著者の実験結果はこの考えを支持するものである。さらに、テープストリッピング刺激部の Ki-67 および Pola 陽性率は乾癬患者において有意に高値を示し、乾癬無疹部においてはより多くの G0 期から細胞周期への動員が起こっていることが示唆された。Bauer ら<sup>20)</sup> は単クローン抗体を用いた分化細胞の定量により乾癬無疹部では増殖

能を有する細胞(胚芽細胞, germinative cell)の割合が正常表皮に比べ高いことを示しているが、このことは乾癬無疹部ではテープストリッピング後により多くの細胞周期を回転している細胞の増加がもたらされるという著者の成績と一致する。

Weinstein ら<sup>21)</sup>は胚芽細胞のうち実際に細胞周期を回転している割合は正常表皮では60%であるのに対して、乾癬皮膚疹部ではほぼ100%であると報告している。著者の実験から、乾癬の無疹部では刺激により細胞周期を回転している細胞が増加し、乾癬皮膚疹部の細胞動態に近くなることが示唆された。このような乾癬無疹部表皮の刺激に対する過剰増殖反応が乾癬皮膚疹形成のひとつの機序であると考えられる。

テープストリッピング後の細胞周期を回転している細胞の増加をきたすもう一つの可能性として、増殖活性の亢進により分裂した娘細胞の増加によるものも考えられる。しかし、少なくとも正常ヒト表皮では前述のごとく表皮細胞の増加は48時間以後に起こることが示されていること、また、乾癬無疹部についてもテープストリッピング後のS期細胞比率の経時変化は正常表皮とほぼ同様の動態を示すことなどから48時間後の時点では娘細胞やさらにその娘細胞により細胞周期を回転している細胞が増加しているとは考えにくい。今回の実験系では経時的な変化は確認できないが以上の理由からテープストリッピング後の細胞周期を回転している細胞の増加は主にG0期の細胞が細胞周期に参入してきたものと考えた。

一方、乾癬の発症機序に関連して、このような細胞周期の異常に加え、細胞増殖を制御するサイトカインの異常も指摘されている<sup>22)</sup>。今回著者は表皮の刺激に対する反応の指標として、表皮増殖を促進するサイトカインであるTGF $\alpha$ と、その受容体であるEGFrの発現について検討した。TGF $\alpha$ は近年乾癬皮膚疹部では過剰に発現されていることが明らかになっており<sup>23)</sup>、それが乾癬の皮膚疹における表皮の過増殖の一因であると考えられている。TGF $\alpha$ はEGFrに結合して作用を発現するが、EGFrもTGF $\alpha$ と同様に乾癬表皮において増加していることが示されている<sup>24)</sup>。著者の実験ではEGFrとTGF $\alpha$ の発現は乾癬無疹部では正常人との間に差は認められなかった。ストリッピング刺激により乾癬および非乾癬患者の無疹部ではEGFr免疫染色において顕著な染色性の亢進がみられたが、両者の間に明らかな差は認められなかった。一方、表皮細胞におけるTGF $\alpha$ の発現は乾癬患者ではストリッピング刺激後に亢進がみられ、それは非乾癬患者の刺激後に比べ、明らかに過剰に起こっていることが示された。これらの結果からテープストリッピング刺激により48時間後の時点で乾癬患者の無疹部の表皮細胞にはより顕著な増殖亢進がおこるが、このことには表皮細胞の細胞周期への参入といった細胞周期の異常に加え、表皮の発現するTGF $\alpha$ といったサイトカインによる増殖制御の異常が関与していることが示唆された。この両者がどのように関連しているのか、あるいはまったく独立した反応であるのかは不明であるが、乾癬の皮膚疹の形成には刺激に対するこれらのいくつかの異常反応が関与しているものと思われる。

## 結 論

テープストリッピング刺激が乾癬無疹部皮膚の表皮細胞動態に及ぼす影響をFCMにより得られたSおよびG2+M期細胞の分画、組織学的・組織化学的手法により得られたBrdU、MI、Ki-67陽性率、Pola陽性率、EGFrおよびTGF $\alpha$ 免疫染色

の所見を指標とし検討した。得られた成績は次のようである。

1. 非刺激部では乾癬と非乾癬の間でS分画、G2+M分画、BrdU、MI、Ki-67陽性率、およびPola陽性率の値に有意の差は認められなかった。
2. テープストリッピング刺激後上記の各指標は乾癬においても非乾癬においてもいずれも非刺激部に比べて有意の上昇を示した。
3. 非乾癬に比べて乾癬ではテープストリッピング刺激後の各指標の値はいずれも有意に高かった。
4. Ki-67およびPola陽性細胞は乾癬、非乾癬とも非刺激部では基底層に限局していたが、テープストリッピング刺激後、非乾癬では基底層およびその直上層に、乾癬ではさらにその1~2層上層まで認められた。
5. EGFrは乾癬、非乾癬とも非刺激部では基底層に、テープストリッピング刺激後は表皮のほぼ全層に陽性を示し、乾癬と非乾癬の間でその発現に明らかな差異は認められなかった。
6. TGF $\alpha$ は乾癬、非乾癬とも非刺激部では表皮基底層の細胞質に陽性であった。しかし、テープストリッピング刺激後のTGF $\alpha$ の発現は両者の間で明らかな差異がみられ、非乾癬では依然基底層に限局していたが、乾癬では基底層だけでなくその2~3層上層までTGF $\alpha$ の発現が認められた。

得られた結果から、乾癬患者では非乾癬患者に比べてテープストリッピング刺激により表皮細胞の顕著な増殖活性の亢進と細胞周期を回転している細胞の増加が惹起されることが示唆された。また、乾癬患者の表皮においてテープストリッピング刺激後のTGF $\alpha$ の異常発現が起こっていることが示された。乾癬の皮膚疹の形成にはこれらの異常反応が関与していることが推測された。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導および御校閲いただきました広根孝衛名譽教授、竹原和彦教授ならびに御助言いただきました高田実助教授、川原繁講師に深甚の謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第93回日本皮膚科学会総会・学術大会(福岡市、1994)において発表された。

## 文 献

- 1) Weinstein, G. D. & Frost, P.: Abnormal cell proliferation in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, **50**, 254-259 (1968).
- 2) De Mare, S., De Jong, E., Van Erp, P. E. J. & Van de Kerkhof, P. C. M.: Markers for proliferation and keratinization in the margin of the active psoriatic lesion. *Br. J. Dermatol.*, **122**, 469-475 (1990).
- 3) Valdimarsson, H., Baker, B. S., Jonsdottir, I. & Fly, L.: Psoriasis: a disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. *Immunol Today*, **7**, 256-259 (1986).
- 4) Koebner, H.: Zur aetiologie der psoriasis. *Vrtljscher. f. Dermat. Syph.*, **8**, 559-561 (1876).
- 5) Van de Kerkhof, P. C. M., Van Rennes, H., De Grood, R. M., De Jongh, G. J., Bauer, F. W. & Mier, P. D.: Response of the clinically uninvolved skin of psoriatic patients to standardized injury. *Br. J. Dermatol.*, **109**, 287-294 (1983).

- 6) Heng, M. C. Y., Kloss, S. G., Kuehn, C. S. & Chase, D. G.: The sequence of events in psoriatic plaque formation after tape-stripping. *Br. J. Dermatol.*, **112**, 517-532 (1985).
- 7) Verschoore, M., Kowalewski, C., Chorzelska, M. J., Bernard, B. A. & Darmon, Y. M.: Intraepidermal leakage of plasma proteins after stripping of normal skin and uninvolved psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.*, **122**, 391-397 (1990).
- 8) Rico, M. J., Halprin, K. M., Baker, L., Cayer, M. & Taylor, J. R.: Stimulated mitotic counts in the non-lesional skin of patients with psoriasis and controls. *Br. J. Dermatol.*, **113**, 185-188 (1985).
- 9) Wiley III, H. E. & Weinstein, G. D.: Abnormal proliferation of uninvolved psoriatic epidermis: Differential induction by saline, propranolol, and tape stripping in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, **73**, 545-547 (1979).
- 10) Pinkus, H.: Examination of the epidermis by the strip method. II. biometric data on regeneration of the human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **19**, 431-447 (1952).
- 11) 川原 繁: 中波長紫外線1回照射後のモルモット皮膚における表皮細胞動態の変動. *日皮会誌*, **96**, 1109-1116 (1986).
- 12) Sasaki, K. & Takahashi, M.: Preservation of cell cycle characteristics in solid tumor in vitro. *Cancer Res.*, **40**, 4810-4812 (1980).
- 13) Raymond, W. A., Leong, A. S-Y., Bolt, J. W., Milios, J. & Jose, J. S.: Growth fractions in human prostatic carcinoma determined by Ki-67 immunostaining. *J. Pathol.*, **156**, 161-167 (1988).
- 14) Tsutsumi, Y., Hori, S. & Onoda, N.: DNA polymerase  $\alpha$ : An immunohistochemical marker for proliferating cells in normal and neoplastic human tissues. *Am. J. Clin. Pathol.*, **93**, 643-650 (1990).
- 15) Clausen, O. P. F. & Lindmo, T.: Regenerative proliferation of mouse epidermal cells following adhesive tape stripping. *Cell Tissue Kinet.*, **9**, 573-587 (1976).
- 16) Boezeman, J. B. M., Bauer, F. W. & De Grood, R. M.: Flow cytometric analysis of the recruitment of G0 cells in human epidermis in vivo following tape stripping. *Cell Tissue Kinet.*, **20**, 99-107 (1987).
- 17) Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U. & Stein, H.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.*, **133**, 1710-1715 (1984).
- 18) Goodwin, P., Hamilton, S. & Fry, L.: A comparison between DNA synthesis and mitosis in uninvolved and involved psoriatic epidermis and normal epidermis. *Br. J. Dermatol.*, **89**, 613-618 (1973).
- 19) Weinstein, G. D., McCullough, J. L. & Ross, P.: Cell proliferation in normal epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **82**, 623-628 (1984).
- 20) Bauer, F. W., Boezeman, J. B. M., Engelen, L. V., De Grood, R. M. & Ramaekers, F. C. S.: Monoclonal antibodies for epidermal population analysis. *J. Invest. Dermatol.*, **87**, 72-75 (1986).
- 21) Weinstein, G. D., Colton, A. & McCullough, J. L.: Fraction of labelled mitoses studies in normal and psoriatic skin. *In* N. A. Wright & R. S. Camplejohn (eds.), *Psoriasis: Cell Proliferation*, 1st ed., p34-44, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne & New York, 1983.
- 22) Nickoloff, B. J.: The cytokine network in psoriasis. *Arch. Dermatol.*, **127**, 871-884 (1991).
- 23) Elder, J. T., Fisher, G. J., Lindquist, P. B., Bennett, G. L., Pittelkow, M. R., Coffey Jr, R. J., Ellingsworth, L., Derynck, R. & Voorheers, J. J.: Overexpression of transforming growth factor  $\alpha$  in psoriatic epidermis. *Science*, **243**, 811-813 (1989).
- 24) Nanney, L. B., Stoscheck, C. M., Magid, M. & King Jr. L. E.: Altered [ $^{125}$ I] epidermal growth factor binding and receptor distribution in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, **86**, 260-265 (1986).



**The Effect of Tape Stripping on Epidermal Proliferation in Non-lesional Psoriatic Skin** Naohito Hatta,  
Department of Dermatology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **104**, 294—301  
(1995)

**Key words** epidermal cell kinetics, psoriasis, tape stripping

**Abstract**

Cell kinetic changes 48 hr after tape stripping on non-lesional skin were studied in 20 psoriatic patients and 18 normal control individuals. The proportion of cells in S phase and G2+M phase were measured by flow cytometry. Bromodeoxyuridine labeling index, mitotic index, and percentages of cycling cells obtained from Ki-67 and DNA polymerase  $\alpha$  (pol  $\alpha$ ) immunostaining were also studied as the parameters for cell kinetic analyses. In addition, the expression of epidermal growth factor receptor (EGFr) and transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) in the epidermis was observed by immunohistochemical techniques. No significant difference in any cell kinetic parameter was observed between the normal and non-lesional skin of the psoriatic patients. In contrast, 48 hr after the tape stripping, all parameters showed an increased proliferative response compared to those before stripping, and the values were higher in psoriatic patients than in the controls. In the non-lesional skin of psoriatic patients and normal skin, Ki67 and Pol  $\alpha$  positive cells were localized exclusively in the basal layer before tape stripping, although they were seen not only in the basal layer but in the suprabasal and prickle cell layer 48 hr after tape stripping. The percentage of TGF- $\alpha$  positive keratinocytes in the psoriatic patients after tape stripping was higher than that in the controls, while there were no significant differences in the EGFr expression between the psoriatic and non-psoriatic patients. These findings demonstrate that elevated proliferating activity, increased proportion of cycling cells and over expression of TGF- $\alpha$  are induced by the stimulus of tape stripping in psoriasis.