

令和元年6月20日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10151

研究課題名(和文) ex vivo培養増殖で得た皮膚浸潤T細胞による薬疹の原因薬剤同定法の確立

研究課題名(英文) Determination of causative drugs using ex-vivo expanded skin infiltrating T cells in drug eruptions

研究代表者

藤山 俊晴 (Fujiyama, Toshiharu)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60402301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：既存の臨床検査で必ずしも容易ではない、薬疹の原因薬剤同定法の開発を試みた。既存のリンパ球刺激試験(DLST)は患者から採血をおこない、そこから得られた単核球に被疑薬を各濃度で添加して³H-チミジンの細胞内取り込みを調べるものであるが、その陽性率は必ずしも高くないことから、我々は薬疹の診断時に行う皮膚生検組織の断片を用いて、皮膚に浸潤したT細胞を培養増幅する技術を確立し、そのT細胞に原因薬剤を添加して刺激し、そのサイトカイン産生や増殖を調べることで、原因薬剤を同定する方法を確立した。この方法では、過半数の症例で原因薬剤が同定可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再発予防の観点から、薬疹の原因薬剤の同定は非常に重要だが、既存の検査方法ではその陽性率が高くないことから、同定できないケースも多数存在する。既存の方法では同定できなくても、今回我々が開発した、皮膚浸潤T細胞を用いた手法により、同定できたケースも存在し、調べた過半数のケースで同定できたことから、有用な手法と考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is not always easy to determine the causative drugs in drug eruption cases. We usually perform DLST, a conventional method to determine the causative drug using peripheral blood mononuclear cells. Suspicious drugs are added to the cells to measure the uptake of ³H-thymidine. However, the detection rate is not satisfactory. Therefore we tried to establish new methods to determine the causative drugs by using ex-vivo expanded skin infiltrating T cells. We successfully determine the causative drugs in more than half of our cases of drug eruption.

研究分野：皮膚科学

キーワード：薬疹 原因薬剤

1. 研究開始当初の背景

薬疹の多くはアレルギー性の機序で発症し、一度ある薬剤に対して感作されアレルギーが成立してしまうと、将来的に同一の薬剤を再投与された場合にも同様に発症してしまう可能性が高く、原因薬剤が特定できた場合には基本的には生涯にわたってその原因薬剤を避ける必要があると考えられている。

重傷薬疹は時に致死的となることから、最も注意すべき皮膚疾患の1つである。通常薬疹では感作に時間を要することから、新規薬剤を内服開始から1週間程度した後に皮疹が出現することが多い。しかし、過去に薬疹の既往があり既に感作されている場合には、内服開始比較的早期から皮疹が出現しやすく、対応が遅れやすい。過去に薬疹を来した薬剤を再投与することで発症する薬疹が、それ以外の薬疹と比べて重症化しやすいという明確なエビデンスは示されていないが、重傷薬疹の症例で過去をさかのぼって問診していくと、過去に同一の原因薬剤による薬疹が疑われるエピソードが聴取されるケースがある。したがって、薬疹における原因薬剤の同定は、再発予防や重症化の予防の観点などから非常に重要であり、原因薬剤の同定方法及び薬疹情報の管理には、いまだ課題が残る。

現時点で原因薬剤の同定方法として可能なものは、薬剤を希釈して皮膚に貼付するパッチテスト、疑われる薬剤を実際に投与してみるチャレンジテスト、試験管内で患者血液の単核球と疑われる薬剤を混合して単核球の増殖を調べるいわゆる薬剤リンパ球刺激試験(DLST)のみが日常診療では可能である。薬疹におけるパッチテストは一部の刺激性薬剤では偽陽性を示してしまうこと、パッチテスト自体で経皮的に感作させてしまう可能性を指摘する専門家もあり、また薬剤を貼付した48時間経過後に判定するといった検査を受ける側の生活への影響もあり、薬疹患者の全例で行われているわけではない。チャレンジテストは高い再現性と同定率が見込めると考えられるが、原因薬剤の再投与によって薬疹の再発・重症化のリスクがあり、入院管理が必要な場面も多く安易には行えない。DLSTは採血をおこない被疑薬とともに検査会社に提出すれば結果が得られるため、簡便で普及してきているが、その陽性率は必ずしも高くなく原因薬剤を同定できるケースは半数に満たないと推測される。また、採血時の治療の影響などを受けやすく、さらなる改良が求められる。

したがって、安全でより確実に原因薬剤の同定が行える方法の確立が求められている。T細胞は抗原特異性を持ち、薬疹などの遅延型のアレルギー反応においては重要な役割を担っているとされている。多くの薬疹における炎症反応の主な標的臓器が皮膚であることから、薬剤により活性化された薬剤抗原特異的なT細胞が皮膚に高率に浸潤していると考えられ、実際過去の報告でも皮疹内に薬剤抗原特異的T細胞が浸潤していることが示されている。

これまでに私たちの教室では、皮膚生検の微細な皮膚組織中から皮膚に浸潤したT細胞を培養増幅する技術を確立し、その機能や形質を複数の疾患で調べてきた。皮膚組織から培養増幅することで、十分な数のT細胞を得ることができ、ここで得られたT細胞は、他の疾患においても、疾患に関連する性質を持ち続けており、治療をした場合には治療効果を反映した変化を示していることから、皮膚のT細胞免疫の状態をよく表していると考えられる。

そこで私たちは、薬疹の病変部生検組織から培養増幅したT細胞を原因薬剤の同定に使用できないかと考え研究を開始した。

2. 研究の目的

重傷薬疹の皮膚生検組織より培養増幅した皮膚浸潤T細胞を用いてそれぞれのケースで原因薬剤の同定を試み、新しく安全で高確率に原因薬剤を同定できる方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本学附属病院を受診した薬疹患者さんで、その一般診療において診断目的で行った皮膚生検組織の一部(4mmパンチ生検の半分)を、患者さんの同意を得たうえでT細胞の培養増幅に用いた。

培養にはヒトAB型血清を添加したcRPMI培地にヒトリコンビナントIL-2と抗CD3/CD28抗体付着ビーズを添加したものをを用いた。全てのケースで約2週間の培養増幅にて 10^6 個以上の培養T細胞を得ることができた。

培養で得られたT細胞はそのまま、あるいは抗原提示細胞とともに各種濃度の被疑薬とともに培養し、その増殖を直接カウント、BrdU取り込みCFSEおよびフローサイトメトリーなどの

方法で確認した。また、薬剤刺激によるインターフェロン をはじめとするサイトカイン産生を ELISpot 法や CBA (Cytometric Bead Array) などによって確認した。被疑薬剤を添加した場合の細胞増殖及びサイトカイン産生を添加しなかった場合と比較することで、原因薬剤の同定を試みた。なお、添加する薬剤の濃度は、各薬剤の添付文書に記載された、最高血中濃度を参考として、それを挟む形で 4 から 5 種類の濃度を作成して添加した。薬剤の溶解方法は添付文書に記載された情報をもとにそれぞれの薬剤ごとに決定した。

4 . 研究成果

検討したうちの約半数の患者で、皮膚より培養増幅した T 細胞が原因薬剤に反応して増殖またはインターフェロン 産生を示した。

増殖は CFSE を用いた方法でより正確に同定可能であった。この方法では、細胞内サイトカイン染色を追加することで増殖した細胞のサイトカイン産生能も評価可能であった。サイトカイン産生は、ELISpot では同定可能であったが、培養上清を用いた CBA による濃度測定ではいずれも検出困難であった。

抗原提示細胞は添加しなくては反応しない症例と、培養増幅した T 細胞に薬剤を添加するだけで反応するケースとがあり、どのような場合に抗原提示細胞が必要となるのかまだわかっていない。これは、T 細胞に対する薬剤の抗原提示様式が、ハプテンコンセプト、p-i コンセプト、altered self 仮説など複数存在していることと関連している可能性が高い。どのような薬剤・薬疹の場合には抗原提示細胞の添加が必要になるのか今後の課題として残ったが、逆にこれを確定することでそれぞれの薬剤の抗原提示のされ方が解明される可能性がでてきた。少なくとも、抗原提示細胞を添加することで、陽性化しなかったケースはなかったことから、手技を一般化して確立するためには、添加することが望ましいと考える。

被疑薬剤を添加する際には、様々な特性を持つ薬剤を溶解し細胞毒性を持たない状態にする必要があるが、非水溶性の薬剤の場合にどのように溶解するかが最後まで課題として残った。懸濁液として、添加して抗原として確実に認識される保証はなく、アルカリやエタノールなどのアルコール類、DMSO にのみ解ける薬剤も存在することから、少なくとも高頻度に薬疹を来す薬剤については、その溶解方法を各薬剤で個別に決定しておく必要があった。これらに対応するためには、今後さらなる症例の積み重ねと手技の確立が望まれる。

残念ながら、本研究では当初予定していた十分な患者数が得られず、正確な同定率を出すには至っていない。本研究に参加してくださった方のほとんどは、一般診療の一環として既存の DLST などの検査を行っているが、既存の検査では原因薬剤が同定できず、皮膚培養 T 細胞を用いた本方法で初めて原因薬剤を同定できた症例もあり、一定の成果が上げられた。手技の簡便化と一般化が今後の一般臨床応用への課題として残る。

先述のように研究機関中、当院を受診された重傷薬疹の患者は少なく、十分な数の検討が行えなかったが、T 細胞のステロイド抵抗性についても検討を行った。一般的に、薬疹の発症時にすでにステロイドを投与されていた患者では、通常よりも多い量のステロイドによる治療を要するケースが多い。しかし、その理由は直感的には理解可能だが、分子生物学的に説明することは難しかった。そこで今回、我々は T 細胞において、多剤耐性に関連する分子である MDR1 (multidrug resistance protein 1 または ATP-binding cassette sub-family B member 1 (ABCB1)、cluster of differentiation 243 (CD243)) 発現を調べたところ、一部の T 細胞において MDR1 が発現していた。それに加えて、MDR1 陰性の細胞は *in vitro* でステロイドによる抑制を受けやすいことが示され、MDR1 陽性の細胞はこれに対して抵抗性を示すという知見が得られた。

したがって、すでにステロイドで加療を受けている患者では、MDR1 陽性細胞の割合がステロイド未治療の場合と比べて高くなっており、これがステロイド投与中に発症した患者ではより治療に多くのステロイドを必要とするメカニズムの一つと考えられた。

しかし、実際の症例でステロイド投与中の患者と非投与中の患者で T 細胞の MDR1 発現を比較し、投与中の患者の方が MDR1 を発現する細胞が多いといった、確定的な知見までは得ることができなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Novel lymphocyte stimulation tests using ex-vivo expanded skin-infiltrating T cells from severe drug eruptions. 藤山俊晴 46th Annual ESDR Meeting. 2016 年

皮膚湿潤T細胞を用いた ELISpot 法で原因薬剤同定を試みた SJS/TEN 藤山俊晴 第46回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2016 年

Skin-Infiltrating MDR1-Expressing T Cells Are Associated With Therapeutic Responsiveness To Corticosteroids In Severe Cutaneous Adverse Reactions Of Drugs. EAACI 8th Drug Hypersensitivity Meeting. 藤山俊晴 2018 年

〔図書〕(計 3 件):

皮膚科エキスパートナーシング 改訂第2版 瀧川雅浩、白濱茂穂編集
紅斑症 P208-218

皮膚免疫アレルギーハンドブック 戸倉新樹ほか編集
Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死症 P274-280 2018 年

ここが大事 高齢者の皮膚診療のコツとピットフォール
高齢者の薬疹の特徴を知る P79-85 2019 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件): 該当なし

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 0 件): 該当なし

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者: 該当なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者: 該当なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：