

平成22年 5月28日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19790776
 研究課題名 (和文) CD40リガンド発現を指標とした薬疹急性期の原因薬剤診断方法の確立
 研究課題名 (英文) Establishment of diagnostic method of causative drug by detection of CD40 ligand expression in acute stage of drug eruption
 研究代表者
 樋口 哲也 (HIGUCHI TETSUYA)
 東邦大学・医学部・准教授
 研究者番号：00334425

研究成果の概要 (和文) : T リンパ球活性化マーカーである CD40 リガンド分子の発現が、薬疹患者の原因薬剤の診断方法として有効であるかを検討した。臨床的に薬疹と診断された患者を対象とし、既存の薬疹の診断方法であるパッチテスト、リンパ球刺激試験や内服試験などと組み合わせて、末梢血単核球細胞での薬剤添加後の CD40 リガンド発現を検討した。原因薬剤が診断しえた症例中約 2/3 の症例で本試験の陽性例が得られ、臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Upregulation of CD40 ligand, an activated T cell marker, was evaluated to be used as a diagnostic method of causative drug for patients with drug eruption. For patients clinically diagnosed as drug eruption, detection of CD40 ligand on peripheral blood mononuclear was compared with the results of conventional drug tests, such as patch test, lymphocyte transforming test and provocation test. In about two third of patients, whose causative drug was confirmed, CD40 ligand detection test was positive, and this method was suggested to be used clinically.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	540,000	3,440,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：薬疹、CD40 リガンド、CD154、フローサイトメトリー、CD40

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬剤アレルギー反応は臨床現場において、治療の中断のみならず、時には重篤な副作用として生命予後に影響をもたらすこともある。皮膚科領域では薬疹として、皮疹や全身

症状を伴い受診することや、他診療科からも診断を求められることが多い。原因薬剤の同定が早期に必要な場合が多いが、詳細な問診で被疑薬剤を検討するとともに、パッチテスト(PT)、薬剤リンパ球刺激試験(DLST、

欧米ではLTT)、内服テストなどを施行し、原因薬剤を診断する。しかし、PTやDLSTは施行しても結果が出るまでに数日かかり、陽性率は必ずしも高くなく、内服テストも再投与の危険性があるため等の問題がある。個々の症例においても、これらの試験が施行し得ない場合もあり、また施行しても陽性率は高くないため、精度の高い、安全で時間のかからない簡便な検査法が求められている。

(2) CD40 リガンド(CD40L)は、活性化T細胞マーカーであるが、抗原提示細胞上のCD40と反応するとすぐに分解されるため、実際にはその検出は難しいとされてきた。近年、抗原特異的なT細胞を、抗原刺激後数時間という短い時間でフローサイトメトリーを用いて検出できることが報告された。薬疹患者血液中には薬剤と反応するT細胞が多数存在すると考えられており、CD40L発現を指標として、薬疹患者末梢血中に、原因薬剤と反応するT細胞が検出できれば診断に役立つことが期待される。

2. 研究の目的

(1) 薬疹発症の患者において、薬剤抗原特異的なT細胞を、CD40L発現により検出できるかを検討する。現在施行されているDLSTにおいては、培養開始後結果が出るまで1週間程度かかるのに対し、CD40L発現は数時間～一日で検出できると報告されているが、これが薬疹患者でも応用できるか、培養条件の検討・設定を先に行う。

(2) 培養条件が設定できれば、実際に薬疹患者で試験を行い、原因薬剤の種類、薬疹の型、発症時期などと本試験の陽性率を検討し、臨床応用が可能かどうか明らかにする、また他の活性化マーカーや産生サイトカインなどを検討することによって、薬疹の発症機序を明らかにする。

3. 研究の方法

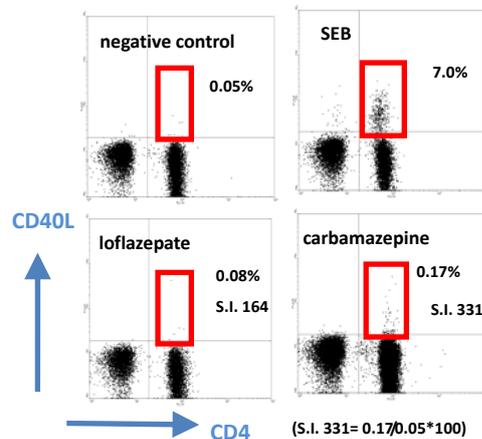
(1) 臨床的に薬疹と診断された患者を対象とし、同意の元に採取された血液から末梢単核球を分離する。分離後に抗CD28抗体と濃度希釈した薬剤で2時間培養後、ゴルジ阻害剤であるBrefeldin Aをさらに添加し6時間から一晩培養する。培養後に細胞を回収し、細胞表面のCD4分子と細胞内のCD40L分子の染色をFITC-CD4抗体と、PE-CD40L抗体を用いて行い、フローサイトメトリー(FACSCalibur, FACScan)にて解析、CD4陽性細胞中に薬剤で刺激されたCD40L陽性細胞が検出できるか解析する。薬剤添加のない状態を陰性コントロール、Staphylococcal Enterotoxin B (SEB)添加した条件を陽性コントロールとし、陽性コントロールに見られるCD4+CD40L+細胞の割合が、被疑薬剤添加条件において、陰性コントロールでの同割合と比べて2倍以上認められた場合、本検出方法での陽性として解析する。

(2) 患者について臨床経過を観察ないし病歴を参照し薬疹との診断を確定することや、既存の薬剤テストである、パッチテスト、DLST、内服テストの結果と比較検討する。

4. 研究成果

陽性・陰性コントロールなどを用いて、培養条件の設定などを行い、陽性コントロールにおいてのみ本検出方法が陽性であると確認した。その後、初診時に薬疹と診断された16名の患者について、本検出法を行うとともに、他の薬剤テストの結果や臨床成績とあわせて解析したところ以下のように3グループに分けられた。

[グループ1]他の既存の検査法で陽性となり、原因薬剤が同定されたと考えられた症例を8例認めた。そのうち2例で本試験が陽性であった。陽性例では、下図のように原因薬剤(carbamazepine)において、陰性コントロールや原因でない薬剤と比較して優位にCD4+CD40L+細胞が検出された。



グループ1の結果を以下の表で示す。

case	age	sex	type	drug	Patch Test	Provocation Test	LTT	CD40L detection
1	72	F	MP	carbamazepine	+	+	-	+
				loflazepate	-	-	+	-
2	72	M	EM	sultamicillin	N. D.	N. D.	+	+
				clindamycin	N. D.	N. D.	-	-
3	64	M	MP	carbamazepine	N. D.	N. D.	+	-
				valsartan	N. D.	N. D.	-	-
4	39	F	EM	amoxicillin	N. D.	N. D.	-	-
				clarithromycin	N. D.	N. D.	-	-
				lansoprazole	N. D.	N. D.	+	-
5	33	M	EM	ceftriaxone	N. D.	N. D.	+	-
6	51	F	MP	carbamazepine	-	N. D.	-	-
				lansoprazole	-	N. D.	-	-
				brotizolam	-	N. D.	+	-

* 薬疹の型(type)

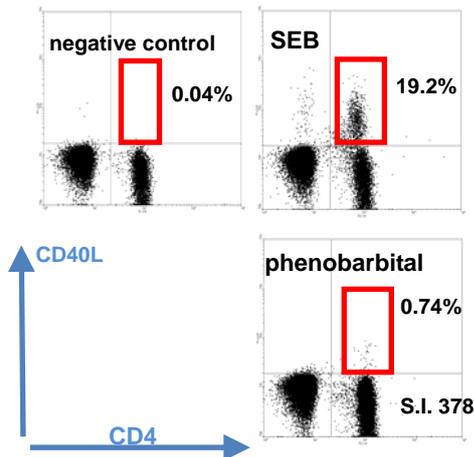
MP: 播種状紅斑丘疹型

EM: 多型紅斑型

SJS: スティーブンスジョンソン症候群

[グループ 2]

また、既存の薬剤検査法では陽性所見が得られなかった患者のうち、臨床経過などから薬疹と診断された6名の患者では、全員本試験が陽性が得られ、本試験において原因薬剤が診断し得たと考えられた。以下の症例では、phenobarbital を内服開始後に皮膚症状が出現、原因薬剤であると考えられた。既存の検査法である DLST は陰性であったが、本試験は陽性であった。

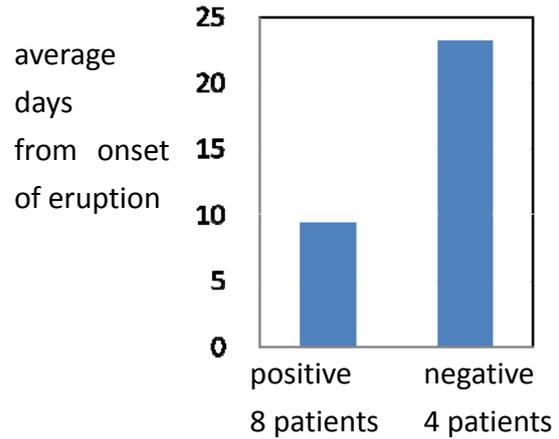


グループ 2 の結果を以下の表で示す。

case	age	sex	type	drug	Patch Test	Provocation Test	LTT	CD40L detection
7	69	M	EM	phenobarbital	N. D.	N. D.	-	+
8	59	M	EM	phenobarbital	-	N. D.	-	+
9	59	F	EM	phenobarbital	-	N. D.	-	+
10	66	M	MP	isoniazid	-	N. D.	-	+
				rifampicin	-	N. D.	-	-
				ethambutol	-	N. D.	-	-
11	27	M	EM	phenytoin	-	N. D.	-	+
12	20	F	EM	lenampicillin	-	N. D.	-	+

残りの4名においては、既存の検査や本試験がすべて陰性ないし偽陽性からなり、原因薬剤の同定ができなかったと考えられた。以上、原因薬剤が同定し得たと考えられた12名の患者において、8名で本試験が陽性で2/3の陽性率であった。また疾患のコントロールとして痒疹患者3名において内服中の薬剤を用いて、本検査を施行したがすべて陰性であった。

原因薬剤が同定し得た12名のうち、本試験が陽性だった症例と陰性だった症例を、皮疹が発症した時期から本試験を行った日数の平均を求めたところ、陽性であった症例群では、皮疹が発症した時期から比較的早期に本試験を施行し得た。



これは薬疹の検査方法として行われてる DLST では、薬疹の多くの臨床病型において皮疹発症後比較的早期に DLST を行うほうが陽性率が高いという報告に一致する。

近年、T細胞活性化マーカーである CD69 分子が、DLST 陽性患者群において、薬剤刺激後 48 時間で発現が上昇することが報告されている。この報告からも、T細胞の活性化分子発現が薬疹の原因薬剤診断に役立つと考えられるが、本研究の成果としては、薬疹の発症の早期に患者末梢血を採取し薬剤刺激後に CD40L 細胞の検出することで、検査開始翌日という従来の薬疹検査法よりも短い時間で、原因薬剤の同定を比較的高い陽性率で施行し得ることが分かり、実際に臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① Tetsuya Higuchi, Takahiro Satoh, Hiroo Yokozeki, An attempt to detect antigen-specific T cells in drug eruption. 9th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, 2010. 6. 17, Weimar

② 樋口哲也, 佐藤貴浩, 横関博雄, CD40L 発現を指標とした薬疹の原因薬剤診断法, 第 58 日本アレルギー学会秋季学術大会, 2008. 11. 28, 東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/med/sakura/dermatology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 哲也 (HIGUCHI TETSUYA)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：00334425

- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし