

令和元年6月6日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10134

研究課題名(和文)次世代の薬剤誘発リンパ球刺激試験の開発

研究課題名(英文)Development of a Novel Drug-induced Lymphocyte Stimulation Test.

研究代表者

小豆澤 宏明(Azukizawa, Hiroaki)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10379240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：薬疹患者の診療において、原因薬剤の特定は重要であるが、危険を伴う薬剤再投与試験以外には、十分に感度が高く簡便な検査法がない。薬剤特異的T細胞の頻度は、患者の末梢血液中にわずかであり、その細胞分裂やサイトカイン産生を検出することは、困難な場合が多い。本研究は、T細胞をあらかじめ活性化・増殖させてから、薬剤に対する反応をみることで、従来の薬剤誘発リンパ球刺激試験にかわる、次世代のリンパ球刺激試験を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

あらかじめ活性化・増殖した薬剤特異的T細胞によるIFN- γ の産生や活性化を検出することで、より感度の高いin vitroの検査法が確立できたことにより、薬疹の原因薬剤特定の検査法としての臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The drug-induced lymphocyte stimulation test (DLST), also referred to as lymphocyte transformation test (LTT), is used to identify the culprit drug in cases of cutaneous adverse drug reactions (cADR). Although DLST is a widely used in vitro test, its sensitivity and specificity are unsatisfactory. Recent reports suggest that the detection of drug-induced interferon (IFN)- γ production using enzyme-linked immunoSpot (ELISpot) assay (conventional IFN- γ ELISpot) is useful for identifying culprit drugs in cADR cases. The modified IFN- γ ELISpot using activated PBMCs was more sensitive than the conventional IFN- γ ELISpot was for detecting drug-induced IFN- γ production, which could be a useful in vitro tool for identifying culprit drugs in cADR cases.

研究分野：皮膚科学

キーワード：薬疹 検査法 免疫学 Stevens-Johnson症候群 中毒性表皮壊死症

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、フローサイトメトリーを用いて DLST を可視化することで、従来の DLST が薬剤に特異的な T 細胞の分裂を検出していることを確認した。そして、重症薬疹では、急性期に行った DLST で CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の分裂がみられ、それ以外の薬疹では主に CD4 陽性 T 細胞の分裂をとらえている事を報告した。さらに、ヒトヘルペスウイルス 6 型の再活性化を伴うことが多い重症薬疹である薬剤性過敏症症候群 (DIHS) の回復期では、CD4 陽性 T 細胞の中でも、アレルギーや炎症を抑制する働きを持つ FOXP3 陽性の制御性 T 細胞の分裂増殖していることを報告した。(Hanafusa T. Azukizawa H. et al The predominant drug-specific T-cell population may switch from cytotoxic T cells to regulatory T cells during the course of anticonvulsant-induced hypersensitivity. J Dermatol. Sci 2012 65(3) 213-9 より)。このように DLST は薬疹の病態に重要な免疫反応を反映した有用な検査であることが明らかである一方、臨床的に明らかな原因薬剤を検査しても、陽性となる症例は決して多くはないため、DLST でとらえている免疫反応の検出感度を上げることは大変重要な課題である。

近年、結核感染の体外診断として、結核菌特異抗原のペプチドを血液に添加培養することで、インターフェロン γ (IFN- γ) の産生をみる検査法であるクオンティフェロンが行われている。最近では、血液からリンパ球を分離して、数を調整した上で、結核菌特異抗原を添加し、IFN- γ 産生細胞の数を数える T-spot が普及しており、皮膚反応を判定するツベルクリンよりも有用性が高まっている。薬疹における薬剤特異的な T 細胞の反応の検出においても、IFN- γ 産生細胞数を検討する IFN- γ 遊離試験や ELISpot 法の有用性が報告されるようになった。

2. 研究の目的

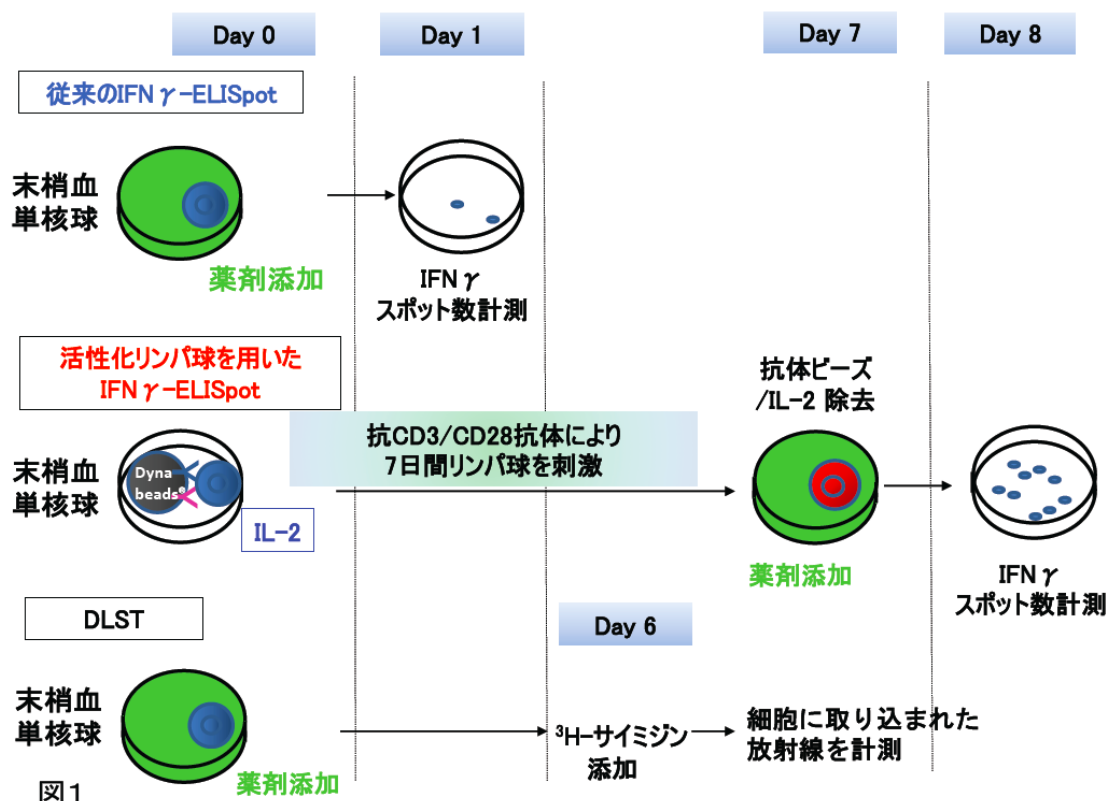
従来の DLST にかわる検査法として、T 細胞をあらかじめ活性化増殖させることで IFN- γ 産生検出の感度を飛躍的に上げた次世代の DLST 開発を目的とする。薬疹患者では採取した末梢血において T リンパ球が少ない事が多々ある。また大量のステロイド治療後の検査においては、患者の免疫は抑制状態が残存しており、従来の DLST で薬剤反応性 T 細胞を検出することは困難な場合がある。本研究により、薬剤特異的な T 細胞をあらかじめ活性化増殖させることで、その検出感度を向上させることが期待できる。

3. 研究の方法

患者末梢血単核球に、抗体やサイトカインを添加後して、1 週間程度の培養で、T 細胞の活性化・増殖し、次世代の DLST の確立に適した条件を検討する。薬剤特異的な T 細胞の活性化・増殖を検出する方法として、IFN- γ の産生を ELISA 法、ELISpot 法で検出する方法や、カルシウムの細胞内流入など、薬剤を添加してから比較的短時間で反応を見ることができする方法を検討する。また、IFN- γ 以外にも測定が有用と考えられるサイトカインや細胞傷害性顆粒などの測定も検討する。薬剤特異的な T 細胞へのカルシウムの細胞内流入は、蛍光顕微鏡下での観察から始めフローサイトメトリーによる定量的な測定を目指す。

薬剤特異的な T 細胞の解析、ならびに IFN- γ などのサイトカインの検出は、薬疹患者からヘパリン採血により得た検体を用いる。薬疹の急性期の患者の末梢血単核球には、薬剤特異的な T 細胞が含まれている。通常診療の血液検査として DLST を提出する薬疹患者から、同意書により同意を得た上で、本研究のために、診療用とは別に約 20ml の採血を行う。この血液を Ficoll-Paque を用いて遠心分離を行い、患者末梢血単核球を分離する。患者末梢血単核球を AB 型血清添加した RPMI1640 細胞培養液にて、細胞浮遊液を作成する。1 週間程度の T 細胞の活性化・増殖させるため、抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体結合磁気ビーズや、recombinant IL-2 を添加する。活性化した細胞を前後で、T 細胞、B 細胞、単球などの細胞分画の変化を確認する。

1 週間培養にて活性化した細胞から、磁気ビーズや抗体・サイトカインなどを洗浄などで除去した上で、細胞数を調整したのち、その患者の薬疹の原因となった薬剤を添加と非添加の細胞浮遊液を作成する。数時間培養し、IFN- γ 遊離試験、ELISpot 法を行う。IFN- γ 遊離試験は培養上清を用いて ELISA 法により計測する。ELISpot 法を用いてより感度を高めるため、IFN- γ 産生細胞をドットの数として検出する。通常診療の血液検査として行った DLST の結果と比較して陽性となる薬剤の相関性と、陽性率を検討する。



T細胞が、抗原をT細胞受容体で認識すると、早期に細胞内へのカルシウム流入がおこることが知られるが、蛍光Ca⁺⁺インジケータをもちいることで、カルシウムの流入を可視したり、フローサイトメトリーで検出できる。蛍光Ca⁺⁺インジケータを用いた実験では、薬剤添加後数分以内に細胞内へのカルシウムの流入が検出されると考えられるため、まず蛍光顕微鏡下での観察で、検出感度を検討した上で、フローサイトメトリーを用いた検出に適した条件を検討する。

4. 研究成果

薬疹において原因薬剤を特定する最も信頼性が高い方法は内服誘発試験であるが、施行できる症例は限られるため、重症薬疹を起こすことが知られる代表的な原因薬剤が被疑薬で、発症までの投与歴が矛盾しない症例に限定して比較を行った。カルバマゼピン、ラモトリギン、フェニトインといった抗けいれん薬とアロプリノール、スルファメトキサゾール/トリメトプリム(S T合剤)、セフェコキシブなどは、重症薬疹の原因薬として頻度が高いため、これらの薬剤による臨床的に原因薬剤が明白な薬疹患者16症例から得た20検体を用いて、従来の薬剤添加IFN- γ ELISpot、活性化リンパ球を用いた薬剤誘発IFN- γ ELISpot、DLSTを同時に施行することで比較を行った。薬剤の特異性を確認するために陰性対照は、発症後に皮疹の再燃なく安全に投与できた薬剤を用いた。

セレコキシブによるEMの症例を例にあげると、従来のIFN γ -ELISpotでは1個のみスポットが検出されたが、活性化リンパ球を用いたIFN γ -ELISpotではラモトリギン添加で17個のスポットを検出した(図2)。これは20万個の細胞中に17個のIFN- γ 産生細胞を検出したと解釈できる。

T-SPOT, TBでは判定基準としてスポット数が6以上であれば陽性となる。しかし、活性化リンパ球を用いた場合、図2のように薬剤を添加していない場合でも抗原非特異的にスポットが形成されることがあったため、我々は薬剤無添加のウェルと原因薬剤添加のウェルとのスポット

数の差が6以上であれば陽性とした。

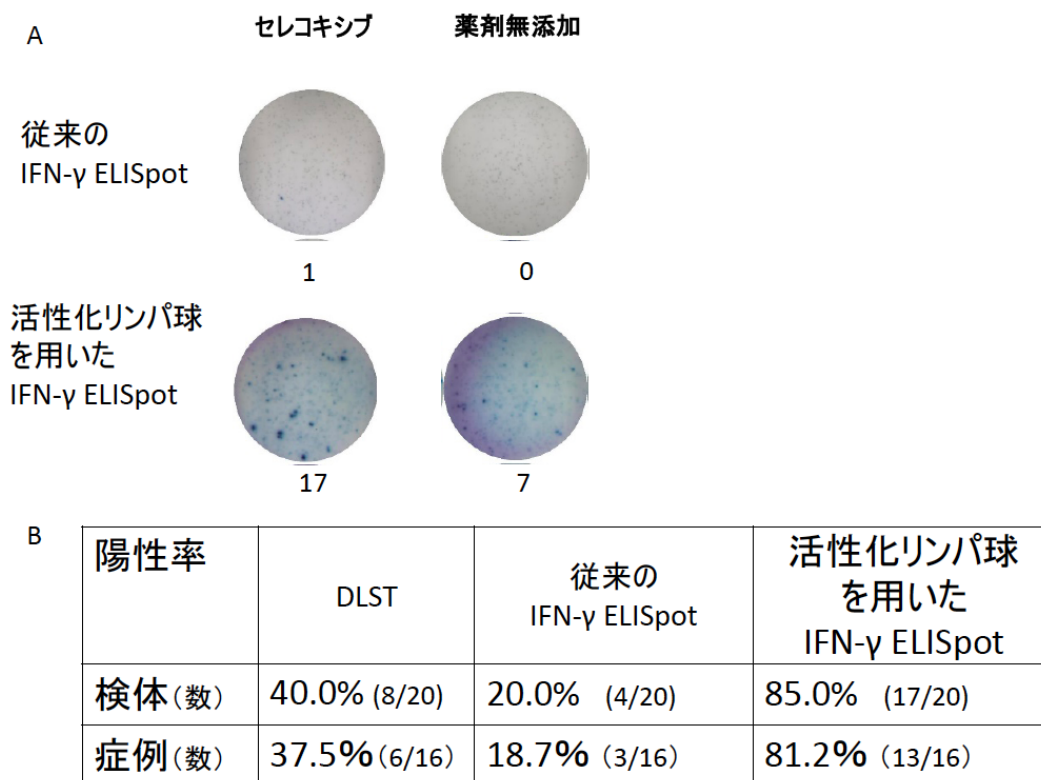


図2

DLSTは20検体中8検体が陽性であったのに対して、従来のIFN γ -ELISpotでは20検体中4検体でしか陽性とならなかった。一方、活性化リンパ球を用いたIFN γ -ELISpotでは20検体中17検体で陽性となった(図2)。

症例ごとに比較しても、DLSTの陽性率は37.5%であったのに対して、従来のIFN γ -ELISpotでは18.7%とむしろDLSTより低い結果となった。一方、活性化リンパ球を用いたIFN γ -ELISpotでは81.2%と飛躍的に高い感度を示した。

抗CD3/CD28抗体とIL-2によるT細胞活性化により非特異的なIFN γ 産生が起きている可能性を否定するため、陰性対照として発症後に再燃なく安全に投与できた薬剤についても同様の検討を行ったが、従来のIFN γ -ELISpot、活性化リンパ球を用いたIFN γ -ELISpotともにすべて陰性であり、偽陽性はなく特異度が高いことが示唆された。一方でDLSTは発症後に再燃なく安全に投与できた薬剤についても、偽陽性がいくつかの検体でみられており、特異度に問題があると考えられた。

さらに健常人3名の検体を用いて今回原因薬剤となった全ての薬剤を検査したが活性化リンパ球を用いたELISpotはいずれも陰性であった。健常人については、従来のELISpot、DLSTも全て陰性であったことから、DLSTは薬疹患者のような炎症状態では偽陽性が起きやすいのではないかと考えられる。

薬剤添加による細胞内カルシウム流入をフローサイトメトリーで計測する方法として、末梢血単核球を用いてFluo-3-AMとFura-Redを用いて、T細胞の活性化を検討をおこなった。またT細胞表面マーカーを染色した細胞において細胞内カルシウム流入をフローサイトメトリーで計測できるか検討を行った。T細胞を非特異的に活性化することで細胞内カルシウム流入を計測することはできたが、薬剤特異的なT細胞は細胞数が極めて少ないため、非特異的な細胞内カルシウム流入と区別して検出するための技術的な改良が必要である。

<引用文献>

Hanafusa T, Azukizawa H, et al The predominant drug-specific T-cell population may switch from cytotoxic T cells to regulatory T cells during the course of anticonvulsant-induced hypersensitivity. J Dermatol. Sci 2012 65(3) 213-9

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kato K, Kawase A, Azukizawa H, Hanafusa T, Nakagawa Y, Murota H, Sakaguchi S, Asada H, Katayama I. Novel interferon- γ enzyme-linked immunoSpot assay using activated cells for identifying hypersensitivity-inducing drug culprits. J Dermatol Sci. 査読有 2017 Jun;86(3):222-229.
- ② 小豆澤 宏明【必読!皮膚疾患に潜む pitfall】 ペニシリンで皮疹が誘発された伝染性単核球症 Derma. 査読無 274号 2018 Page15-18
- ③ 小豆澤 宏明【いま注目の薬疹トピックス】 (Part1)総説:薬疹の診断と治療(総説 3) 薬疹の検査法 Visual Dermatology 査読無 17巻9号 2018 Page832-836
- ④ 小豆澤 宏明【最近のトピックス 2018】 新しい検査法と診断法 新しい薬疹原因薬検出法 活性化リンパ球を用いた薬剤添加 IFN- γ ELISpot 臨床皮膚科 査読無 72巻5号 2018 Page77-81

[学会発表] (計 7 件)

- ① 加藤 健一、小豆澤 宏明、花房 崇明、中川 幸延、片山 一朗 薬剤遅延型アレルギーにおける in vitro での原因薬剤の特定方法の検討 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11月5日～6日
- ② 加藤 健一、小豆澤 宏明、花房 崇明、片山 一朗、薬剤遅延型アレルギーにおける in vitro での原因薬剤の特定方法の検討 第115回 日本皮膚科学会総会 ウィリアム・エプシュタイン記念賞受賞 2016年6月3日～5日
- ③ Kenichi Kato, Hiroaki Azukizawa, Takaaki Hanafusa, Ichiro Katayama, Evaluation of In-Vitro Diagnostic Methods For Identifying The Culprit Drug In Drug Hypersensitivity. 7th Drug Hypersensitivity Meeting, Malaga, Spain 2016. April 21th-23rd
- ④ 河瀬 安紗美、小豆澤 宏明、加藤 健一、片山 一朗、浅田 秀夫 薬剤誘発 IFN- γ ELISpot における抗 PD-L1 抗体の有用性検討 第47回 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2017年
- ⑤ 小豆澤 宏明 新しい薬疹原因薬検出法～活性化リンパ球を用いた薬剤添加 IFN γ -ELISpot～ 第116回 日本皮膚科学会総会 2017年
- ⑥ Asami Kawase, Hiroaki Azukizawa, Kenichi Kato, Ichiro Katayama, Hideo Asada, Utility of IFN- γ ELISpot assay using anti-PD-L1 antibodies for identifying hypersensitivity-inducing drug culprits. 42th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
- ⑦ Hiroaki Azukizawa, Asami Kawase, Kenichi Kato, Hideo Asada Comparison Among Three Methods Of Interferon-Gamma Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay For Identifying Hypersensitivity-Inducing Drug Culprits. Drug Hypersensitivity meeting 2018, Amsterdam Netherland

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者
研究協力者氏名：加藤 健一、河瀬 安紗美
ローマ字氏名： Kenichi Kato, Asami Kawase

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。