薬物アレルギー起因薬検出における白血球遊走試験 (ケモタキシス・チャンバー法)の臨床的有用性の検討 - アガロース・プレート法とケモタキシス・ チャンバー法の比較解析 -

齊藤幹央^{*1}, 八木元広², 宇野勝次³

有限会社共栄堂しばたセンター薬局¹, 水原郷病院薬剤科², 福山大学薬学部³

Study on Clinical Usefulness of Chemotaxis Chamber Method in Leukocyte Migration Test for Identification of Allergenic Drugs - Comparison between Chemotaxis Chamber Method and Agarose Plate Method -

Mikio Saito^{*1}, Motohiro Yagi² and Katsuji Uno³

The Shibata Center Pharmacy, Kyoeido Ltd¹, Pharmacy, Suibarago Hospital²
Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University³

[Received June 9, 2008
Accepted November 11, 2008]

We performed a comparison between leukocyte migration tests performed by the chemotaxis chamber method (LMT-chamber) and the agarose plate method (LMT-agarose) to study the usefulness of the LMT-chamber method in the identification of causative drugs in drug allergies.

For LMT-agarose, the positive rate among 210 patients suspected of hypersensitivity to drugs (subject patients) was 67.6 % and for the LMT-chamber the positive rate among 197 subject patients was 81.2%, a significantly higher positive rate for the latter ($p < 0.001$, χ^2 -test). The positive rate for LMT-agarose was 6.9% in 102 patients without hypersensitivity to drugs (control patients) and 9.8% for the LMT-chamber in 82 control patients, but this difference was not significant. In addition, the LMT-chamber produced a higher positive rate than LMT-agarose for all hypersensitivity symptoms and all efficacy categories of the suspected drugs. It also produced a significantly higher positive rate than LMT-agarose in subject patients without addition of self serum ($p < 0.05$, χ^2 -test) and there were no significant differences between males and females or young and old persons, as there were in the case of LMT-agarose.

Our findings indicate that the LMT-chamber may be more sensitive than LMT-agarose in identifying the causative drug in drug allergies and more useful than LMT-agarose for many hypersensitivity symptoms and suspected drugs. In addition, the LMT-chamber is much less influenced than LMT-agarose as regards patient's own serum, or by sex and age.

Key words drug allergy, LMT-chamber, LMT-agarose, hypersensitivity symptoms, suspected drugs, patient self-serum

緒 言

薬剤アレルギーの原因薬剤の検出は, *in vivo* と *in vitro* の試験方法に大別されるが, *in vivo* の検査方法は患者自身にリスクを伴い, 拘束時間などの負担が大きいため, 実際の施行は容易ではない。特に負荷誘発試験(チャレンジテスト)は医の倫理に反するといった観点から, 原則禁忌とする考えが多い^{1,2)}。また, チャレンジテストは薬剤と症状との因果関係が証明できても, 副作用

の発現機序の解明に結びつかないという問題がある。そのため, *in vitro* の試験による検出同定の確立が重要となり, より高感度でかつ信頼性の高い検査方法が求められている。

著者らは, 薬疹をはじめとする薬剤過敏症における起因薬同定試験として, 白血球遊走試験(leukocyte migration test; 以下, LMT と略す)が有用であり, その発現に白血球遊走阻止因子(leukocyte migration inhibitory factor; 以下, LMIF と略す)と白血球遊走促進因子(leukocyte migration activating factor; 以下, LMAF と略す)の2種

* 新潟県新発田市本町1 3 3; 1 3 3, Hon-cho, Shibata-shi, Niigata, 950 0054 Japan

倫理指針」を満たすものであり、LMT は水原郷病院の臨床検査適正審査委員会でも承認を得ている。

2. 被疑薬剤(試験薬剤)

被疑薬剤は、投与あるいは体内残留中に過敏症状の発現を認め、中止により過敏症状が改善した薬剤を対象とした。1 症例で最低 1 剤から最高 8 剤まであり、全症例の試験薬剤数は LMT-agarose で 276 種 865 剤、LMT-chamber で 239 種 727 剤であった。なお、被疑薬剤の投与量が各薬剤の常用量を超える症例はなかった。

LMT-agarose 施行例の被疑薬剤の薬効別分類では、中枢神経用薬が 51 種 248 剤(28.7%)、抗菌薬が 40 種 172 剤(19.9%)、呼吸器官用薬が 15 種 95 剤(11.0%)、代謝性医薬品が 31 種 90 剤(10.4%)、消化器官用薬が 25 種 71 剤(8.2%)、循環器官用薬が 38 種 60 剤(6.9%)、その他の薬剤が 76 種 129 剤(14.9%)であった。また、中枢神経用薬の中で非ステロイド系解熱鎮痛剤(non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)が 27 種 154 剤(17.8%)を占め、抗菌薬の中でラクタム系抗生物質が 24 種 116 剤(13.4%)を占めた。

一方、LMT-chamber 施行例の被疑薬剤の薬効別分類では、中枢神経用薬が 43 種 199 剤(27.4%)、抗菌薬が 33 種 153 剤(21.0%)、呼吸器官用薬が 19 種 81 剤(11.1%)、循環器官用薬が 36 種 66 剤(9.1%)、代謝性医薬品が 25 種 57 剤(7.8%)、消化器官用薬が 19 種 46 剤(6.3%)、その他の薬剤が 64 種 125 剤(17.2%)であった。また、NSAIDs が 20 種 118 剤(16.2%)、ラクタム系抗生物質が 22 種 105 剤(14.4%)を占めた。

薬剤非過敏症患者の試験薬剤(服用薬剤)は LMT-agarose で 190 種 296 剤、LMT-chamber で 140 種 223 剤であった。また、MI 値の control study の健常人 8 例には 12 種 30 剤について試験を行った。

3. LMT

1)抗原調製

薬剤の抗原調製は LMT 実施日に行った。LMT に用いる薬剤抗原液は、患者血清無添加群と添加群の 2 系統に分けて調製した。患者血清無添加群では、各被疑薬剤の原末を Hanks' balanced salt solution(Gibco; 以下、HBSS と略す)に溶解した薬剤溶液 100 μ L に培養液(10 mM Hepes 緩衝液添加の TC 199 medium(Gibco) + 10% ウマ血清(Gibco))100 μ L を加えた溶液とした。なお、この場合の薬剤無添加群は HBSS 100 μ L と培養液 100 μ L の混合液とした。一方、患者血清添加群では、薬剤溶液 100 μ L に患者自身の血清 100 μ L を加えた溶液とし、薬剤無添加群は HBSS 100 μ L と患者血清 100 μ L の混合液とした。また、難溶性の薬剤は Dimethyl-sulfoxide(以下、DMSO と略す)に溶解し、HBSS で希釈して、DMSO の最終濃度が 1% 以下になるように用いた。また、positive control としてマイトジェンの phytohemagglutinin(以下、

PHA と略す)を用い、反応濃度 1 μ g/mL で試験の反応性を確認した。

薬剤の抗原濃度は LMT-agarose の場合、原則として各被疑薬剤の最高血中濃度(Cmax)を用いた。ただし、Cmax の不明な薬剤については、経口剤の場合 1 回投与量の 1/50,000/mL、注射剤の場合 1 回投与量の 1/10,000/mL の濃度を用いた。また、免疫系に影響を及ぼす可能性がある抗がん剤は Cmax の 1/2、ステロイド剤は Cmax の 1/4 の濃度に調製をした。また、LMT-chamber では、従来の LMT-agarose とは遊走白血球数が異なるため、各薬剤の白血球の遊走能に対する影響を随時検討し、適正抗原濃度(白血球の遊走に影響を与えない濃度)を決めた。その結果、LMT-chamber では、原則として Cmax の 1/2、NSAIDs は Cmax の 1/4 ~ 1/2、抗がん剤は Cmax の 1/4、ステロイド剤は Cmax の 1/5、漢方薬・生薬では 1 回投与量の 1/100,000 ~ 1/25,000/mL の濃度で調製した。

また、両試験ともに溶媒と試験薬剤の使用濃度における免疫学的影響については、PHA 刺激による LMT の反応性に影響を与えないことを確認した。

2)反応試験

LMT は、被疑薬剤の服用中止後 7 日以上 3 カ月以内で実施した。患者単核球と被疑薬剤の反応では、患者のヘパリン加末梢血から Ficoll-Paque 液(Pharmacia)を用いた比重遠心法により単核球層(中間層)を採取し、HBSS で洗浄後、培養液に細胞数が 1.25×10^6 cells/mL になるように浮遊した。この単核球浮遊液 800 μ L を抗原液 200 μ L に加え、5% CO₂ インキュベーター(BNA 111, ES-PEC)で 37 $^{\circ}$ C、72 ~ 96 時間反応培養し、上清液を分離保存(-20 $^{\circ}$ C)した。

3)遊走試験

正常人のヘパリン加末梢血を 1/4 容の 5% デキストラン生理食塩水と混合し、37 $^{\circ}$ C、40 ~ 60 分間放置後白血球層(上清液)を採取し、この上清液から Ficoll-Paque 液による比重遠心法で顆粒球層(沈殿層)を採取し、混入した赤血球を lysing shock 法で溶血し、生理食塩水で洗浄後、遊走用白血球とした。

LMT-agarose では、遊走用白血球を先に分離保存した反応上清液に細胞数が 2.5×10^6 cell/mL になるように浮遊し、1% アガロース添加の培養液で作成した平板の各 well(直径 3 mm)に 7 μ L ずつ分注し、5% CO₂ 培養器で 37 $^{\circ}$ C、12 ~ 24 時間遊走後、イムノビューワー(IMMUNO VIEWER-MU; Jokoh)で白血球の遊走野の面積を測定した。

一方、LMT-chamber では、chemotaxis chamber(96-well Chemotaxis Chamber AB 96; Neuro Probe)の下層の well に培養液を 30 μ L ずつ入れ、上層にメンブランフィルター(Polycarbonate Filters PDF 5; Neuro Probe)を張り付けて下層に装着後、遊走用白血球を細胞数 1×10^7 cells/mL に調製して反応上清液に浮遊し、上層に 50 μ L ずつ 1 検体 4 well に分注後、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ インキュベ

ターで 90 分間遊走後、中間のメンブランフィルターに付着した白血球を Diff-Quik 固定液(Sysmex)で固定後、Diff-Quik 染色液(Sysmex)で染色し、生理食塩水で洗浄して乾燥させた後、イムノリーダー(Immuno Mini NJ-2300; Intermed Japan)を用いて、吸光度 490 nm⁽¹²⁾で測定した。

4)判定

LMT-agarose の判定は、正常人に対しても同様の試験を行い、各試験薬剤に対する正常人の遊走指数(migration index; 以下, MI と略す) = 薬剤添加(抗原液)の単核球反応上清液における白血球の遊走面積/薬剤無添加(対照液)の単核球反応上清液における白血球の遊走面積 × 100 を求め、この MI の平均値 ± 2 SD(n = 6)を正常範囲(normal range; 以下, NR と略す)とし、患者の MI 値が NR より高値で 115 以上を LMAF, NR より低値で 85 以下を LMIF の検出とし、両者を陽性とした。

一方、LMT-chamber の LMT の判定では、MI = (薬剤添加群の単核球反応上清液における吸光度の平均/薬剤無添加群の単核球反応上清液における吸光度の平均) × 100 を求めた。Fig. 1 に示すように健康人 8 名の control study において MI 値の平均値 ± 2 SD(n = 4)が 97.4 ± 39.9 であったが、最小値 66.8 から最大値 139.2 までの誤差範囲を認めた。この結果に基づいて、MI 値が 60 以下(LMIF)および 150 以上(LMAF)で、さらに薬剤無添加群および対照群(MI = [薬剤添加群の培養液における吸光度の平均/薬剤無添加群の培養液における吸光度の平均] × 100, n = 4)に対して t-test で p < 0.05 の有意差を認めた場合を陽性とした。

Fig 1 . Controlled Study of the Leukocyte Migration Indices on the LMT-agarose and the LMT-chamber in Volunteers (n = 8, subjects without drug hypersensitivity). *LMT-agarose: the leukocyte migration test by means of agarose plate method, **LMT-chamber: the leukocyte migration test by means of chemotaxis chamber method, ***Migration Indices: mean ± 2 SD.

4. 統計解析

データの統計学的検討は、²-test および Student's t-test により行い、危険率 5% 未満(p < 0.05)を有意差と認めた。

結 果

1. 薬剤過敏症疑診患者および薬剤非過敏症患者の LMT-agarose と LMT-chamber の陽性率

薬剤過敏症疑診患者および薬剤非過敏症患者における LMT-agarose と LMT-chamber の陽性率を Fig. 2 に示した。薬剤過敏症疑診患者では、LMT-agarose は 210 例中 142 例陽性で 67.6% の陽性率であった。一方、LMT-chamber は 197 例中 160 例陽性で 81.2% の陽性率を示した。したがって、LMT-chamber は LMT-agarose より有意(p < 0.001, ²-test)に高い陽性率を示した。

また、薬剤非過敏症患者では、LMT-agarose は 102 例中 7 例陽性で 6.9% の陽性率であった。一方、LMT-chamber は 82 例中 8 例陽性で 9.8% の陽性率を示した。したがって、LMT-chamber が LMT-agarose より高い値を示したが、両者に有意差は認めなかった。

両試験とも薬剤過敏症疑診患者のほうが薬剤非過敏症患者より有意(p < 0.000001, ²-test)に高い陽性率を示した。

Fig 2 . The Positive Proportions of the LMT-agarose and the LMT-chamber in the Subject patients and the Control patients. *LMT-agarose: the leukocyte migration test by agarose plate method, this test was regarded as positive if the migration indices of the subject patients or the control patients were above 115 or below 85. **LMT-chamber: the leukocyte migration test by chemotaxis chamber method, this test was regarded as positive if the migration indices (M.I.) of the subject patients or the control patients were above 150 or below 60 and had a significant difference from the M.I. of 4 negative controls (p < 0.05, t-test). ***Significantly different; ²-test

2. 過敏症状別の LMT-agarose と LMT-chamber の陽性率

過敏症状別の LMT-agarose と LMT-chamber の陽性率を Table 1 に示した。皮疹では LMT-agarose は 65.8%(146 例中 96 例)に陽性, LMT-chamber は 80.9%(115 例中 93 例)に陽性を示し, LMT-chamber が有意($p < 0.01$, χ^2 -test)に高い陽性率を示した。また, 肝障害では LMT-agarose が 71.1%, LMT-chamber が 80.3%, 肺障害では LMT-agarose が 6 例中 4 例, LMT-chamber が 2 例中 2 例, アナフィラキシーショックでは LMT-agarose が 5 例中 3 例, LMT-chamber が 10 例中 8 例, 発熱では LMT-agarose が 4 例中 4 例, LMT-chamber が 2 例中 2 例, 血液障害では LMT-agarose が 2 例中 2 例, LMT-chamber が 3 例中 3 例, その他の過敏症状では LMT-agarose が 4 例中 3 例, LMT-chamber が 1 例中 1 例に陽性を示した。したがって, 皮疹以外の各過敏症状では両試験の陽性率に有意差を認めなかったが, すべての過敏症状で LMT-chamber が LMT-agarose の陽性率を上回った。さらに, 皮疹以外の過敏症状全体では, LMT-agarose は 72.7%(66 例中 48 例)に陽性, LMT-chamber は 82.1%(84 例中 69 例)に陽性を示し, LMT-chamber が LMT-agarose より有意($p < 0.05$, χ^2 -test)に高い陽性率を示した。

3. 薬効分類別の LMT-agarose と LMT-chamber の陽性率

被疑薬剤の薬効分類別の LMT-agarose と LMT-chamber の陽性率を Table 2 に示した。LMT-agarose では, 抗菌剤が 33.1%, 中枢神経用薬が 21.8%, 代謝性医薬品および循環器用薬が 13.3%, 消化器用薬が 12.7%, 呼吸器用薬が 8.4%, その他の薬剤群が 13.2% で, 抗菌剤は他の薬剤群よりすべて有意($p < 0.05 \sim 0.0005$, χ^2 -test)

に高い検出率を示した。

一方, LMT-chamber では, 抗菌剤が 39.9%, 循環器用薬が 37.9%, 代謝性医薬品が 31.6%, 中枢神経用薬が 23.6%, 呼吸器用薬が 14.8%, 消化器用薬が 13.0%, その他の薬剤群が 25.6% で, 抗菌剤は, 中枢神経用薬, 呼吸器用薬, 消化器用薬, その他の薬剤群より有意($p < 0.05 \sim 0.0005$, χ^2 -test)に高い検出率を示した。

LMT-agarose と LMT-chamber の両試験の陽性率では, LMT-chamber はすべての薬剤群において LMT-agarose より高い陽性率を示し, 特に代謝性医薬品($p < 0.05$, χ^2 -test), 循環器用薬($p < 0.005$, χ^2 -test)に対し有意に高い陽性率を示した。

4. 患者血清添加の有無における LMT-agarose と LMT-chamber の陽性率

患者の自己血清添加群と無添加群における LMT-agarose と LMT-chamber の陽性率を Fig. 3 に示した。LMT-agarose では血清添加群単独陽性が 38.6%, 血清無添加群単独陽性が 18.1%, 血清添加群・無添加群両方陽性が 11.0% であった。一方, LMT-chamber では血清添加群単独陽性が 44.7%, 血清無添加群単独陽性が 26.4%, 血清添加群・無添加群両方陽性が 10.2% であった。したがって, 血清添加群単独陽性および血清添加群・無添加群両方陽性では両試験間に有意差を認めなかったが, 患者無添加群単独で LMT-chamber は LMT-agarose に比べ有意($p < 0.05$, χ^2 -test)に高い陽性率を示した。

また, 両試験とも血清添加群単独のほうが血清無添加群単独より有意($p < 0.0005$, χ^2 -test)に高い陽性率を示した。

Table 2 . The Proportions of Positive the LMT-agarose* and the LMT-chamber**, broken down into Drug Efficacy Categories.

Drug efficacy	LMT-agarose*				LMT-chamber**			
	Number of suspected drugs	Incidence (%)	Positive	Rate(%)	Number of suspected drugs	Incidence (%)	Positive	Rate(%)
Central nerves system drugs	248	28.7	54	21.8	199	27.3	47	23.6
Antibacterial drugs	172	19.9	57	33.1	153	21.0	61	39.9
Respiratory organs drugs	95	11.0	8	8.4	81	11.1	12	14.8
Metabolic system drugs	90	10.4	12	13.3	57	7.8	18	31.6
Digestive organ drugs	71	8.2	9	12.7	46	6.3	6	13.0
Cadiovascular drugs	60	6.9	8	13.3	66	9.1	25	37.9
Miscellaneous	129	14.9	17	13.2	125	17.2	32	25.6
Total	865		165	19.1	727		201	27.6

*LMT-agarose : the leukocyte migration test by agarose plate method, **LMT-chamber : the leukocyte migration test by chemotaxis chamber method, Significantly different : χ^2 -test (a : $p < 0.05$, b : $p < 0.005$, c : $p < 0.0005$)

5. 性差および加齢における LMT-agarose と LMT-chamber の陽性率

薬剤過敏症疑診患者の性差における LMT-agarose と LMT-chamber の陽性率を Fig. 4 に示した。LMT-agarose の陽性率は、男性が 66.7%，女性が 68.5% で両者に有意差を認めなかった。一方、LMT-chamber の陽性率は、男性が 80.2%，女性が 81.9% で LMT-agarose と同様に両者に有意差を認めなかった。また、男性および女性ともに LMT-chamber が LMT-agarose より有意($p < 0.05$, χ^2 -test)に高い陽性率を示した。

64 歳未満の患者(若年者)と 65 歳以上の患者(老年者)で両試験の陽性率を検討し、Fig. 5 に示した。LMT-agarose の陽性率は、若年者が 67.9%，老年者が 67.1%

で両者に有意差を認めなかった。一方、LMT-chamber の陽性率は、若年者が 83.6%，老年者が 78.2% で両者に有意差を認めなかった。また、老年者では LMT-agarose と LMT-chamber の間に有意差を認めなかったが、若年者では LMT-chamber が LMT-agarose より有意($p < 0.005$, χ^2 -test)に高い陽性率を示した。

考 察

1. アレルギー起因薬同定試験としての LMT-chamber の有用性

現在 *in vitro* の試験として最も汎用されている DLST と同様に、LMT は薬剤抗原による感作リンパ球の存在

Fig 3 . The Positive Proportions of the LMT-agarose and the LMT-chamber with or without Patient's Serum.

*LMT-agarose: the leukocyte migration test by means of agarose plate method, **LMT-chamber: the leukocyte migration test by means of chemotaxis chamber method, ***Significantly different; χ^2 -test

Fig 4 . The Positive Proportions of the LMT-agarose and the LMT-chamber, broken down into Sex.

*LMT-agarose: the leukocyte migration test by means of agarose plate method, **LMT-chamber: the leukocyte migration test by means of chemotaxis chamber method, ***Significantly different; χ^2 -test

Fig 5 . The Positive Proportions of the LMT-agarose and the LMT-chamber in young persons and aged persons.

*LMT-agarose: the leukocyte migration test by means of agarose plate method, **LMT-chamber: the leukocyte migration test by means of chemotaxis chamber method, ***Significantly different; χ^2 -test

を確認する試験方法であるが、DLSTのように薬剤抗原刺激による感作リンパ球の幼若化や増殖能(DNA合成)を測定する試験ではなく、感作リンパ球から産生されるサイトカインやケモカインなど白血球遊走能に影響を与える因子を検出する試験である。

従来のLMT-agaroseはアガロースプレートのウェルにスポットした白血球の遊走野を測定することにより、その遊走能を解析し、薬物アレルギー反応に関与した起因薬を同定する方法である。著者らの同一薬剤過敏症疑診患者133例の検討¹¹⁾では、LMT-agaroseの陽性率は60.9%であり、DLSTの24.8%に比べて圧倒的に高い陽性率を示しており、*in vitro*のアレルギー起因薬同定試験法としては有効性が高いと考えられる。しかしながら、LMT-agaroseはアガロースプレート上に 2.5×10^8 cells/mLの高濃度の細胞(顆粒球)を12~24時間から遊走させるには、1検体あたり約5 mLと相対的に多量の血液と熟練した手技が必要である。そのため、LMT-agaroseはDLSTより臨床的有用性が高い試験法であるにもかかわらず、一部の施設に限定されていた。したがって、LMT-agaroseと同等以上の感度と信頼性を有し、LMT-agaroseより簡便かつ処理能力の高い試験法の研究開発が求められる。

そこで、今回著者らが考案したLMT-chamberは、反応試験(患者単核球と被疑薬剤の反応)では従来のLMT-agaroseとまったく同じであるが、遊走試験でケモタキシスチャンパーの上層にスポットした白血球が下層へ遊走する際に中間のメンブランフィルターに入り込んで付着した細胞を染色して吸光度計で測定し、白血球遊走能を解析する方法である。LMT-chamberは遊走用白血球(顆粒球)の細胞濃度がLMT-agaroseに比べ $1/25(1 \times 10^7$ cells/mL)であるため、遊走用の血液量が1検体あたり約1 mLと相対的に少量で実施することができる。また、LMT-chamberは遊走時間も90分でLMT-agaroseに比べ $1/8 \sim 1/12$ と短いため、短時間で結果が出せると同時に、遊走の手技が容易である。さらに、LMT-agaroseは事前にアガロースプレートを作成し、適正条件下(温度や湿度)で保管が必要であり、測定も手動で遊走野の直径を測定しなければならないが、LMT-chamberは培養のための事前準備は不要で、測定もイムノリーダーで吸光度を数分で読み取ることが出来る。

水原郷病院では、1990年4月から薬剤科が医薬品副作用管理センターとして薬剤過敏症疑診患者に対して一元管理を実施しており、院内で薬剤過敏症疑診患者を認めた場合は全診療科の医師から薬剤科に「薬剤副作用疑診患者カード」を通じて原因薬剤検出の依頼がくる仕組みが構築されている¹³⁾。そのため、LMT-agaroseとLMT-chamberの両試験とも水原郷病院のルーチンワークにおける医師からのLMT依頼患者(無作為患者)を対象にしており、同一条件(被疑薬剤の服用期間あるいは体内残留期間中に過敏症状を発現し、被疑薬剤中止後改善し、

既存疾患による過敏症状発現の可能性が低い)の対象患者と同一対象期間(3年間)で行っている。また、両試験の対象患者の性別、年齢層および過敏症状の頻度もほぼ同程度であり、さらに、対象患者数や試験薬剤数もほぼ同程度である。したがって、今回の対象患者群は両試験の有用性を評価できる適正な患者群であると考えられる。

結果として、LMT-agaroseは薬剤過敏症疑診患者210例に対して67.6%と高い陽性率を示したが、LMT-chamberは薬剤過敏症疑診患者197例に対して81.2%とさらに高い陽性率を示し、LMT-agaroseと比べ約14%も上回り、有意に高い陽性率を示した。したがって、LMT-chamberは遊走用血液量、遊走時間、手技および感度の点からLMT-agaroseよりも有用性が高いと考えられ、今後、LMT-chamberは*in vitro*のアレルギー起因薬同定試験法として推奨される試験と考える。

同じメカニズムの試験法にもかかわらず、LMT-agaroseとLMT-chamberの感度に差が生じる原因は、遊走細胞(顆粒球)の濃度に起因すると考えられる。上述のように、LMT-agaroseの遊走顆粒球の細胞濃度は 2.5×10^8 cells/mLであるのに対し、LMT-chamberの細胞濃度は 1×10^7 cells/mLでLMT-agaroseの $1/25$ である。すなわち、LMT-chamberではLMT-agaroseに比べてターゲット細胞の濃度が $1/25$ であるため、白血球遊走能に作用するサイトカインやケモカインが $1/25$ 量でも活性を示すことを意味する。

アレルギー起因薬同定試験で問題となるのは、感度(偽陰性の存在)と同じように偽陽性の存在である。DLSTにおいても偽陽性の報告¹⁴⁻²⁰⁾は少なくなく、著者らの検討¹¹⁾でも7日以上試験薬剤を服用した薬剤非過敏症患者に7%に陽性(偽陽性)を認めている。今回の著者らの薬剤非過敏症患者における検討では、LMT-agaroseでは約7%、LMT-chamberでは約10%の偽陽性を認めた。LMT-chamberがLMT-agaroseよりやや高い偽陽性を示したが、これはLMT-chamberの感度の高さに起因しているかも知れない。しかし、両試験の偽陽性のわずかな差は有意な差ではなく、LMT-chamberがLMT-agaroseに比べて特異性が低いとは考えられない。

また、両試験における薬剤過敏症疑診患者と薬剤非過敏症患者のそれぞれの陽性率の差を比較すると、LMT-agaroseは60.7%なのに対し、LMT-chamberは71.4%であり、LMT-chamberが約10%上回っている。したがって、偽陽性を考慮しても、アレルギー起因薬同定試験としてLMT-chamberはLMT-agaroseより優れていると考えられる。ただし、LMT-chamberを臨床診断に用いる場合、10%程度の偽陽性が存在していることを常に考慮しておく必要があると考える。

2. 各過敏症状および各被疑薬剤における LMT-chamber の有効性

薬剤過敏症状は多種多様であるが、最も頻度の高い症状は皮疹であり、次に肝障害が続く、両症状で薬剤過敏症の 9 割を占めることは周知の通りである^{4,13)}。著者らは、LMT が皮疹以外に薬剤性肝障害、薬剤性肺障害、薬剤性血液障害など多くの過敏症状の起因薬検出に有効であることを報告してきた^{9), 21-24)}。LMT-chamber は皮疹および肝障害で 80% 以上の高い陽性を示し、特に皮疹では LMT-agarose の陽性率と有意差を認めている。また、LMT-chamber はすべての過敏症状で 80% 以上の高い陽性率を示し、LMT-agarose を上回っている。したがって、アレルギー反応が関与する薬剤性障害のほとんどに LMT-chamber は高い有効性を示すと考えられる。

1 症例に複数(1~8 剤)の被疑薬剤があり、被疑薬剤のすべてが起因薬剤ではないので、被疑薬剤別の LMT 陽性率が薬剤別の LMT 検出率を示しているとは限らないが、薬剤別のアレルギー性と LMT 感度をあわせた概略的な数値を示していると考えられる。LMT-agarose と LMT-chamber がともに抗菌薬で最も高い陽性率を示したが、これは著者らの検討²⁵⁾ですでに報告したように抗菌薬が他の薬剤群に比べ高いアレルギー性を有していると考えられる。抗菌薬の高アレルギー性は、薬剤の組織への移行性や親和性に加えて、高い蛋白結合能²⁵⁾と感染菌によるアジュバント効果^{26, 27)}に起因するところが多いと考えられる。また、LMT-chamber は全薬剤群で LMT-agarose に比べ高い陽性率を示しているが、特に代謝性医薬品、循環器系用薬、その他の医薬品に有意差を認めている。すなわち、LMT-chamber は薬効別分類上あまりアレルギー性が高くない循環器系用薬や代謝性医薬品など²⁸⁾に検出率を上げており、それが薬剤過敏症患者全体の起因薬の検出率上昇に反映していると考えられる。その要因は LMT-chamber の感度に起因していると考えられる。

なお、薬剤のアレルギー性は薬効より化学構造に起因すると考えられる。そのため、薬効分類上アレルギー性が高くない薬剤群の中にも、抗けいれん薬のカルバマゼピン、尿酸降下薬のアロプリノールや降圧剤のサイアザイド系利尿剤などは薬物過敏症で問題となる薬剤である。そこで、これらの薬剤について LMT-agarose と LMT-chamber の陽性率を検討してみると、LMT-agarose は 7 例中 2 例に陽性を示したのに対し、LMT-chamber は 4 例中 3 例に陽性を示した。したがって、例数が少ないため、LMT-chamber の有用性を評価するには至らず、今後、さらなる研究解析が必要であると考えられる。

3. LMT-chamber における諸因子(患者血清、性差、加齢)の影響

LMT は患者血清添加と無添加の 2 系統の反応系で実施している。LMT-chamber は LMT-agarose と同様に血

清添加群単独が無添加群単独より有意に高い陽性率を示した。著者らは、すでに LMT-agarose において患者血清が免疫反応を亢進する可能性を示唆し、特に皮疹では患者血清添加の意義が高いこと⁹⁾を報告している。その原因として二つのことが考えられる。薬剤の多くは分子量が小さいため生体内でハプテンとしてしかなり得ず、患者血清中の高分子物質であるキャリアーと結合して完全抗原となるためと考えられる。また、著者らは患者血清が TNF- α の産生を亢進することも報告²⁹⁾しているが、患者血清中にはいくつかのサイトカインなどの免疫反応増強因子が含まれている可能性があり³⁰⁻³³⁾、それらが免疫反応を増強させた可能性も考えられる。

上述のように両試験とも患者血清清添加群単独に比べ無添加群単独の陽性率は低くなっているが、患者血清無添加群単独の陽性率で見た場合、LMT-chamber は 26.4% の陽性率を示し、LMT-agarose の 18.1% より有意に高い陽性率を示している。血清無添加で陽性、血清添加で陰性を示す場合は、何が関与しているかが問題である。その原因としては、患者血清中に免疫反応の阻止因子の存在が示唆され、阻止因子として阻止抗体の存在の可能性が考えられる。すなわち、薬剤抗原が感作リンパ球と反応する前に特異抗体(抗薬剤抗体)と反応(中和反応)してしまい、感作リンパ球を刺激できないと考えられる。過敏症状が改善する過程で、このような阻止抗体を産生している薬剤過敏症患者も少なからず存在していると考えられる。また、LMT-chamber が LMT-agarose より高い陽性率を得た理由として、LMT-chamber は増強因子がなく少量しか産生されないサイトカインやケモカインでも反応性を示し得る高い感度を有していることに起因していると考えられる。

男女別の LMT-chamber の陽性率は、LMT-agarose と同様に差は認められず、LMT-chamber は LMT-agarose 同様に差の影響をほとんど受けないものと考えられる。

また、若年者と老年者における LMT-chamber の陽性率でも、LMT-agarose と同様に有意な差は認められず、LMT-chamber は LMT-agarose 同様に加齢の影響もほとんど受けないものと考えられる。著者らはすでに LMT-agarose で加齢により反応性にほとんど影響を受けないことを報告しており³⁴⁾、今回の検討でも LMT-chamber も加齢の影響を受けないことが示唆された。

4. 結語

以上の知見をまとめると、

1) LMT-agarose が薬剤過敏症疑診患者 210 例に対して 67.6% の陽性率を示したが、LMT-chamber は薬剤過敏症疑診患者 197 例に対して 81.2% の陽性率を示し、LMT-agarose より有意に高い陽性率を示した。したがって、LMT-chamber は LMT-agarose よりアレルギー起因薬同定試験として有用性が高いと考えられる。

2) LMT-chamber は皮疹および肝障害で 80% 以上の高

い陽性を示し、特に皮疹では LMT-agarose の陽性率より有意に高かった。また、LMT-chamber はすべての過敏症状で 80% 以上の高い陽性率を示し、LMT-agarose の陽性率を上回った。したがって、薬剤アレルギー性障害のほとんどの症状に LMT-chamber は有用性が高いと考えられる。

3)LMT-chamber は薬効分類上のすべての薬剤群で LMT-agarose に比べ高い陽性率を示し、特に代謝性医薬品、循環器系用薬、その他の医薬品に有意差を認めた。したがって、LMT-chamber は薬効分類上広範囲の薬剤(アレルギー)に対して有用性を示すと考えられる。

4)LMT-chamber は LMT-agarose と同様に性差と加齢の影響を受け難いと考えられる。また、LMT-chamber は LMT-agarose と同様に患者の自己血清の添加で陽性率は高まるが、患者の自己血清の影響は LMT-agarose より受け難いと考えられる。

多様性に富む現代の薬物療法において、薬剤アレルギーの発現は予測が困難であり、かつ原因薬剤の検索に関しては臨床経過からの判断も不可能な場合が大半である。すなわち、临床上、薬剤アレルギー患者における安全かつ確実な原因薬剤の検出同定法の確立は、患者の二次的な事故防止のため必要不可欠である。したがって、著者らが今回行った LMT-chamber は上記の点からも今後、薬剤アレルギーの究明に臨床的価値が高い試験法であると考えられる。

謝辞 本研究は水原郷病院在任中に行ったものであり、ご協力頂いた水原郷病院薬剤科の諸先生方に深謝致します。

引用文献

- 1) 松島敏春, 薬剤誘発性肺臓炎とその類似疾患, 日本内科学会雑誌, **86**, 457 462 (2002).
- 2) 加藤誠一, 川崎寛中, 薬剤性肝障害への検査アプローチ, 内科, **71**, 297 299 (1993).
- 3) 宇野勝次, 山作房之助, 抗菌剤アレルギーにおける LMIT の臨床的応用, *Chemotherapy*, **36**, 522 529 (1986).
- 4) 宇野勝次, 薬剤アレルギー - 臨床解析を中心に -, 日本醫事新報, **4039**, 16 21 (2001).
- 5) 山作房之助, 抗菌剤アレルギーにおける LMIT の臨床的応用, *Chemotherapy*, **36**, 522 529 (1986).
- 6) K. Uno, F. Yamasaku, Application of leucocytes migration tests to detection of allergenic drugs in patients with hypersensitivity to β -lactam antibiotics, *J. Antimicrob. Chemother.*, **24**, 241 250 (1989).
- 7) K. Uno, F. Yamasaku, Structural correlations with cross-reactivity of β -lactam antibiotics in delayed type hypersensitivity. Cross-allergenicity in hypersensitivity to cephem with a tetrazolyl group in the C 3 side chain., *J. Antimicrob. Chemother.*, **24**, 251-264 (1989).
- 8) 宇野勝次, 白血球遊走促進および阻止因子の検出からみたラクタム剤過敏症の発現機構, アレルギー, **39**, 1605 1611 (1990).
- 9) 阿部学, 宇野勝次, 白血球遊走試験による薬疹の検討, アレルギー, **47**, 1264 1272 (1998).
- 10) 齊藤幹央, 宇野勝次, アレルギー性薬疹における掻痒感の検討, 医療薬学, **33**, 416 423 (2007).
- 11) M. Saito, M. Yagi, K. Uno, K. Takanaka, Comparative study of the usefulness of the drug-induced lymphocyte stimulation test and the leukocyte migration test in drug allergies, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 299 304 (2008).
- 12) 塚本芳雄, 福谷幸子, 大浦清, 96 ヶ穴モタキシスチャンバーを用いた白血球走化性試験? マイクロプレートリーダーによる走化性の定量的評価 - 炎症, **13**, 51 54 (1993).
- 13) 宇野勝次, 薬剤アレルギー性副作用の一元管理. ファルマシア, **41**, 741 743 (2005).
- 14) 安井正英, 藤村正樹, 薬剤誘起性呼吸器疾患の臨床 - DLST とチャレンジテストの意義, 日本胸部臨床, **62**, 885 891 (2003).
- 15) N. Mantani, S. Sakai, T. Kogure, H. Goto, N. Shibahara, T. Kita, Y. Shimada, K. Terasawa, Herbal medicine and false-positive results on lymphocyte transformation test, *YAKUGAKU ZASSHI*, **122**, 399 402 (2002).
- 16) 萬谷直樹, 小暮敏明, 貝沼茂三郎, 嶋田豊, 寺澤捷年, 漢方薬による肝障害報告の再検討 - リンパ球幼若化試験偽陽性の問題と関連して -, 肝臓, **43**, 282 287 (2002).
- 17) T. Miyazawa, M. Doi, M. Mineshita, T. Kurata, S. Kitaguchi, N. Furukawa, A comparison of lymphocyte stimulation test results and challenge test results in 19 cases of anti-tuberculous drug-induced allergy., *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*, **31**, 920 923 (1993).
- 18) K. Katagiri, S. Takayasu, Drug induced acute generalized exanthematous pustulosis., *J. Dermatol.*, **23**, 623 627 (1996).
- 19) R. Kawabata, M. Koida, S. Kanie, G. Tanaka, A. Ohuchida, T. Yoshida, DLST as a method for detecting TS-1-induced allergy, *Jpn J. Cancer Chemother.*, **33**, 345 348 (2006).
- 20) 中山雅之, 坂東政司, 細野達也, 山沢英明, 大野彰二, 杉山幸比古, 小柴胡湯における薬剤リンパ球刺激試験 (Drug Lymphocyte Stimulation Test : DLST) の検討, アレルギー, **56**, 1384 1389 (2007).
- 21) 阿部学, 宇野勝次, 白血球遊走試験による薬剤過敏性肝障害の検討. 医療薬学, **27**, 5 14 (2001).
- 22) 齊藤幹央, 宇野勝次, 柳雅彦, 若杉裕, 薬剤性出血性大腸炎におけるアレルギー反応の関与 - 白血球遊走試験による検討 -, 医療薬学, **29**, 581 592 (2003).
- 23) 宇野勝次, 近藤有好, 白血球遊走阻止試験による薬剤過敏性肺炎の検討. アレルギー, **44**, 1401 1409 (1995).
- 24) 阿部学, 栗原敬子, 宇野勝次, 白血球遊走試験による薬剤過敏性血液障害の検討, 医療薬学, **31**, 32 40 (2005).
- 25) 八木元広, 宇野勝次, 栗原敬子, 鈴木康稔, 関根理, 服部浩之, 山口文恵, 抗菌薬のアレルゲン性の検討, 日本化学療法学会雑誌, **47**, 190 195 (1999).
- 26) S. Mohri, T. Watanabe, H. Nariuchi, Studies of the immunological of the outer membrane protein from *Escherichia coli*, *Immunology*, **46**, 271 280 (1982).

- 27) J. Knop, R. Riechmann, E. Macher, Modulation of suppressor mechanisms in allergic contact dermatitis 1. Effect C. parvum on the introduction phase of contact allergy, *J. Invest. Dermatol.*, **76**, 193-196 (1981).
- 28) 宇野勝次, 薬剤師の視点から臨むアレルギー原因薬の検出, *月刊薬事*, **45**, 2371-2378 (2003).
- 29) 佐野直美, 宇野勝次, 薬剤アレルギーにおける白血球遊走促進因子と IL-1 β , IL-1 α および TNF- α の相関性, *アレルギー*, **47**, 1198-1204 (1998).
- 30) 大根田和美, 気管支喘息患者リンパ球に対するデキサメサゾンのアポトーシス誘導, *アレルギー*, **48**, 13-22 (1999).
- 31) 富岡美奈子, 河野陽一, 下条直樹, 新美仁男, 食物アレルギーによるアトピー性皮膚炎の寛解と末梢血単核球のサイトカイン産生能 - サイトカイン Messenger RNA 発現からの解析 -, *アレルギー*, **47**, 511-517 (1998).
- 32) 平野俊夫, “疾患とのかかわりを探る サイトカインの最前線”, 羊土社, 2000, pp.10-29.
- 33) J. Chihara, H. Yamado, E. Takamura, S. Nakajima, Possible presence of RANTES in the tear of patients with allergic conjunctivitis, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **106**, 428-429 (1995).
- 34) 宇野勝次, 八木元広, 鈴木康稔, 関根理, 加齢と薬剤アレルギー, *日本化学療法学会雑誌*, **44**, 641-648 (1996).