

白血球遊走阻止試験による抗結核剤過敏症の検討

宇野 勝次¹⁾・八木 元広¹⁾・関 根 理²⁾・山作房之輔³⁾¹⁾水原郷病院薬剤科*²⁾水原郷病院内科³⁾新潟西保健所

(平成3年7月10日受付・平成3年8月21日受理)

抗結核剤過敏症疑診患者を対象に、白血球遊走阻止試験(LMIT)による原因薬剤の検出同定を試み、抗結核剤過敏症におけるLMITの有用性、ならびに遅延型過敏反応(DTH)の関与について検討した。過敏症疑診患者は、男性11例、女性6例の計17例で、全例50歳以上であり、過敏症状は、皮膚症状9例、肝機能障害5例、発熱5例、肺臓炎1例、PIE症候群1例、血小板減少1例(各症状は重複)であった。LMITは、アガロース平板法の間接法を用い、各薬剤の抗原濃度はisoniazide(INH)とethambutol(EB)が50 μ g/ml、rifampicin(RFP)が10 μ g/mlに調製した。LMITは、88%の高い陽性率を得、白血球遊走促進因子(LMAF)を71%、白血球遊走阻止因子(LMIF)を29%検出し、LMIFに比べLMAFを有意($p<0.01$)に高く検出した。各薬剤のLMIT陽性率は、INHが12%、RFPが65%、EBが31%で、RFPが他の2剤に比べて有意に高い陽性率を示した。また、RFPはLMIF6%に対してLMAFを59%検出し、LMAFを有意($p<0.0005$)に高く検出した。以上の結果から、抗結核剤過敏症の原因薬剤検出にLMITは有用であり、その発現にDTHが主要な役割を演じていると考えられる。また、抗結核剤の中でRFPが最もアレルギー原性が高く、RFPによるDTHにLMAFの関与が高いことが示された。

Key words: 抗結核剤, 遅延型過敏反応, 白血球遊走促進因子, 白血球遊走阻止因子, 薬剤アレルギー

現在、結核の化学療法は、軽症例がisoniazide(INH)とrifampicin(RFP)の2剤併用、重症例がINH、RFPとethambutol(EB)の3剤併用療法が大勢を占めている。ここで、軽視できない問題が抗結核剤の過敏症であり、その原因薬剤の検出ならびに発現機構の解明は適正な化学療法にとって重要な課題である。

著者らは、 β -ラクタム剤過敏症の原因薬剤検出同定に白血球遊走阻止試験(leucocyte migration inhibition test, LMIT)が有効であり、その発現に遅延型過敏反応(delayed-type hypersensitivity, DTH)が主要な役割を演じ、白血球遊走促進因子(leucocyte migration activating factor, LMAF)および阻止因子(leucocyte migration inhibitory factor, LMIF)の両因子が関与していることを明らかにした¹⁻³⁾。

そこで、抗結核剤過敏症疑診患者を対象にLMITによる原因薬剤の検出を試み、抗結核剤過敏症におけるLMITの有用性と、その発現におけるDTHならびにLMAFと

LMIFの両因子の関与について検討し、さらに各抗結核剤のアレルギー原性について検討した。

I. 材料と方法

1. 対象患者および被疑薬剤

抗結核剤過敏症疑診患者は、Table 1に示すように、男性11例、女性6例の計17例で、年齢では全例が50歳以上であった。

被疑薬剤は、Table 1に示すように、INHとRFPが17症例全例に関与し、EBが13症例に関与した。なお、Table 1に示す17例の患者は、抗結核剤以外の薬剤も投与されていた症例もあるが、臨床経過(数年来服用している薬剤や過敏症発現後に服用しても異状を認めなかった薬剤など)から、抗結核剤以外が被疑薬剤と考えられない症例である。

2. LMIT

LMITは β -ラクタム剤過敏症の原因薬剤検出に応用した方法¹⁾に従い、アガロース平板法の間接法を用

* 新潟県北蒲原郡水原町岡山町13-23

Table 1. Patients with suspected hypersensitivity to antituberculous agents

Case no.	Age	Sex	Suspected drugs & daily dose	Duration (days)	Allergic symptom
1	63	M*	INH 300mg, RFP 450mg	24	eruption (urticaria)
2	64	F ^b	INH 300mg, RFP 450mg	21	hepatopathy (GOT↑, GPT↑, LDH↑), thrombocytopenia
3	66	F	INH 400mg, RFP 450mg	48	pulmonary infiltration with eosinophilia syndrome
4	67	M	INH 400mg, RFP 450mg	16	pneumonitis
5	63	F	INH 400mg, RFP 450mg, EB 500mg	42	eruption (erythema)
6	52	M	INH 300mg, RFP 450mg, EB 500mg	25	fever, hepatopathy (GOT↑, GPT↑)
7	58	M	INH 300mg, RFP 450mg, EB 750mg	117	hepatopathy (GOT↑, GPT↑), eosinophilia
8	62	F	INH 400mg, RFP 450mg, EB 500mg	34	eruption (erythema)
9	59	M	INH 300mg, RFP 450mg, EB 750mg	12	eruption (erythema), fever
10	50	M	INH 400mg, RFP 450mg, EB 500mg	47	eruption (erythema), fever
11	58	M	INH 400mg, RFP 450mg, EB 500mg	11	eruption (erythema)
12	62	F	INH 400mg, RFP 450mg, EB 1000mg	25	eruption (erythema)
13	78	M	INH 400mg, RFP 450mg, EB 500mg	10	hepatopathy (GOT↑, GPT↑, LDH↑)
14	71	M	INH 400mg, RFP 450mg, EB 500mg	13	eruption (erythema), fever
15	86	M	INH 400mg, RFP 450mg, EB 500mg	22	hepatopathy (bilirubin↑, GOT↑, GPT↑, LDH↑)
16	77	M	INH 400mg, RFP 450mg, EB 500mg	33	fever
17	64	M	INH 300mg, RFP 450mg, EB 750mg	14	eruption (erythema)

*M: male, *F: female.

INH, isoniazid; RFP, rifampicin; EB, ethambutol.

いた。すなわち、被験者のヘパリン加末梢血を Ficoll-Paque 液 (Pharmacia) を用いた比重遠心法によりリンパ球を採取し、Hanks' balanced salt solution (HBSS) で洗浄後、細胞数を 1.25×10^6 cells/ml に調製して培養液 (10% 馬血清と 10 mM HEPES-buffer 添加の TC-199 medium, Gibco) に浮遊した。このリンパ球浮遊液 800 μ l に抗原液 200 μ l (非動化した被験者血清 100 μ l と試験薬剤溶液 100 μ l の混合液) を加え、回転培養器で 37°C, 72 時間培養後、上清液を採取し、-20°C に凍結保存した。次に、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°C, 約 1 時間放置後、白血球層の上清液を採取して、Ficoll-Paque 液により顆粒球を採取し、赤血球の溶血および洗浄を行い、遊走用白血球とした。この遊走用白血球をさきに分離保存した上清液に細胞数が 2.5×10^5 cells/ μ l 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アガロース平板の各ウェル (直径 3 mm) に 7 μ l ずつ分注し、37°C, 湿度 100% で 24~48 時間培養後、イミノビューワで白血球の遊走野の面積を測定した。

判定に関しては、各薬剤を溶解した培養液に浮遊した正常人白血球について上記の方法で遊走試験を行い、各薬剤に対する正常人白血球の遊走指数 (migra-

tion index, MI) 値を (1) 式より求め、この平均値 ± 2 SD (n=6) を正常範囲 (normal range, NR) とし、(2) 式より求めた被験者の MI 値が NR より高値を LMAF, NR よりも低値を LMIF の検出とし、両者とも陽性とした¹⁻³⁾。

MI of leucocytes from normal human (%):

$$= \frac{\text{migration area in medium with drug}}{\text{migration area in medium without drug}} \times 100 \quad (1)$$

MI of leucocytes from patient (%):

$$= \frac{\text{migration area in supernate with drug}}{\text{migration area in supernate without drug}} \times 100 \quad (2)$$

被疑薬剤の抗原調製では、INH および EB は原末を HBSS に溶解し、RFP は原末を ethanol に溶解し HBSS で希釈して抗原濃度に調製した。各薬剤の抗原濃度は、亀谷の 1 回投与量の 1/5,000/ml⁴⁾ を指標として、3 種類の抗結核剤の 1 回投与量は約 100~750 mg であるから、各薬剤の 3 段階濃度 (10, 50, 250 μ g/ml) における白血球の遊走指数を検討し、Table 2 に示すように白血球の遊走に影響を与えない (MI の平均値が 95~105 の範囲内である) 最高濃度、すなわち INH および EB は 50 μ g/ml, RFP は

Table 2. Migration indices of normal humans at various concentrations of antituberculous agents

Tuberculous agents	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	10	50	250
INH	102 \pm 13*	102 \pm 12	117 \pm 14
RFP	101 \pm 12	107 \pm 10	94 \pm 14
EB	102 \pm 12	102 \pm 12	110 \pm 13

*indicates mean \pm 2 SD (n=6) of leucocyte migration indices in normal humans.

INH, isoniazid; RFP, rifampicin; EB, ethambutol.

10 $\mu\text{g/ml}$ とした。

II. 結 果

抗結核剤過敏症疑診患者17例の過敏症状は、Table 1に示すように、皮膚症状が9例(紅斑型8例, 蕁麻疹型1例), 肝機能障害が5例, 発熱5例, 肺臓炎1例, PIE症候群1例, 血小板減少1例(各症状は重複している)であった。

疑診患者17例の潜伏期間は、Table 1に示すように、9日間以内が無く、10~14日が5例(29%), 15~28日が6例(35%), 29~56日が5例(29%), 57日以上が1例(6%)で、15日以上が70%以上を占めた。

疑診患者17例のLMITの結果をTable 3に示した。なお、医の倫理上の問題から疑診患者17例に対して負荷試験は実施していないが、LMIT陰性薬剤については再投与をしている。その結果、LMIT陽性薬剤を検出した15例の患者ではLMIT陰性薬剤の再投与を開始しても過敏症状は呈しなかった。また、LMIT陽性薬剤を検出しなかった症例6と9の2例の患者では、抗結核剤3薬剤を再投与し、INHによる発熱を認め、他の薬剤による異常は認めなかった。

次に、17例の過敏症疑診患者のLMITの陽性率およびLMAFとLMIFの検出率をTable 4に示した。Table 4に示すように、LMITの陽性率は88%と高く、LMAFは71%、LMIFは29%検出し(ただし、Table 3に示すように症例8は2剤にLMAFを検出し、症例16は1剤にLMAF、他の1剤にLMIFを検出した)、LMAFを有意($p<0.01$)に高く検出した。

過敏症疑診患者17例における各被疑薬剤のLMIT陽性率をTable 5に示した。INHは12%、RFPは65%、EBは31%の陽性率(ただし、Table 3に示すように症例8はRFPとEBの2剤にLMAFを検出し、症例16はRFPにLMAF、EBにLMIFを検

Table 3. LMIT in patients with suspected hypersensitivity to antituberculous agents

Case no.	INH	RFP	EB
1	102 (N*)	123 (LMAF ^b)	
2	103 (N)	126 (LMAF)	
3	85 (LMIF ^c)	100 (N)	
4	92 (N)	116 (LMAF)	
5	93 (N)	115 (LMAF)	98 (N)
6	96 (N)	105 (N)	100 (N)
7	91 (N)	160 (LMAF)	110 (N)
8	94 (N)	126 (LMAF)	120 (LMAF)
9	101 (N)	101 (N)	101 (N)
10	96 (N)	115 (LMAF)	104 (N)
11	103 (N)	103 (N)	85 (LMIF)
12	106 (N)	125 (LMAF)	110 (N)
13	95 (N)	76 (LMIF)	91 (N)
14	98 (N)	116 (LMAF)	100 (N)
15	114 (LMAF)	106 (N)	104 (N)
16	100 (N)	154 (LMAF)	78 (LMIF)
17	94 (N)	92 (N)	85 (LMIF)

Normal range^d 102 \pm 12 101 \pm 12 102 \pm 12

*N: negative, ^bLMAF: leucocyte migration activating factor, ^cLMIF: leucocyte migration inhibitory factor, ^dNormal range: mean \pm 2 SD (n=6) of migration indices in normal humans.

INH, isoniazid; RFP, rifampicin; EB, ethambutol.

Table 4. Proportion of positive LMIT in 17 patients with suspected hypersensitivity to antituberculous agents

Tested no.	LMIT		
	Positive (%)	LMAF ^a (%)	LMIF ^b (%)
17	15 (88)	12 (71)	5 (29) ^a

a: significantly different ($p<0.01$).

^aLMAF: leucocyte migration activating factor,

^bLMIF: leucocyte migration inhibitory factor.

*LMAF was detected with both RFP and EB in one case, and LMAF was detected with RFP and LMIF with EB in another case.

出した)を示し、RFPはINHと比べて($p<0.0001$)も、EBと比べて($p<0.05$)も有意に高い陽性率を得た。また、RFPは、LMIF6%に対してLMAFを59%検出し、LMAFを有意($p<0.0005$)

Table 5. LMIT-positive rates with three antituberculous agents

Agent	Tested no.	LMIT		
		Positive (%)	LMAF ^a (%)	LMIF ^b (%)
INH	17	2 (12) ^b	1 (6) ^b	1 (6)
RFP	17	11 (65) ^a	10 (59) ^a	1 (6)
EB	13	4 (31) ^a	1 (8) ^b	3 (23)

a: significantly different ($p < 0.05$), b: significantly different ($p < 0.0005$).

^aLMAF: leucocyte migration activating factor, ^bLMIF: leucocyte migration inhibitory factor.

^aLMAF was detected with both RFP and EB in one case, and LMAF was detected with RFP and LMIF with EB in another case.

INH, isoniazid; RFP, rifampicin; EB, ethambutol.

に高く検出した。さらに、RFPは、INHやEBに比べても有意 ($p < 0.0005$) に高くLMAFを検出した。

III. 考 察

著者らは、 β -ラクタム剤過敏症疑診患者90例に対してLMITによる原因薬剤の検出を試み、76% (68例) にLMIT陽性薬剤を検出し、31% (28例) にLMAF、44% (40例) にLMIFを検出した¹⁾。今回の抗結核剤過敏症疑診患者17例では、88% (15例) にLMIT陽性薬剤を検出し、LMAFを71%、LMIFを29%検出した。したがって、 β -ラクタム剤過敏症以上に抗結核剤過敏症の原因薬剤検出にLMITは有効であり、その発現にDTHが主要な役割を演じていると考えられる。また、抗結核剤過敏症疑診患者は、LMIFに比べLMAFの検出率が有意 ($p < 0.01$) に高く、 β -ラクタム剤過敏症疑診患者と比べても有意 ($p < 0.001$) にLMAFの検出率が高い。これは、抗結核剤過敏症にLMAFの関与が高いことを示唆している。

17例の過敏症疑診患者は、潜伏期間(薬剤投与開始から過敏症発現までの期間)が全例10日以上であり(以前に感作が成立していれば3日以内に過敏症状を呈すると考えられる)、以前に抗結核剤の投与を受けたことがないことから、今回の抗結核剤の服用により感作が成立したものと考えられる。また、LMIT陽性薬剤を検出した、すなわち抗結核剤によりDTHが成立した15例の患者の潜伏期間は、平均31.8日で、15日未満が27%と少なく、15日以上30日未満が33%で、30日以上も33%を占めた。一方、LMIT陽性薬剤を検出した β -ラクタム剤過敏症患者68例の潜伏期間は、平均11.0日で、15日未満が85%と大半を占め、15日以上30日未満が14%と少な

く、30日以上がわずか1%であった(ただし、複数の過敏症状を発現した症例は重複している。たとえば、同一症例で、発熱の潜伏期間が10日で、肝機能障害の潜伏期間が14日のような場合がある)¹⁾。したがって、抗結核剤過敏症の潜伏期間は、 β -ラクタム剤過敏症に比べかなり長いことが示唆される。

この理由には、二つの要因が考えられる。LMITにより原因薬剤を検出した15例の抗結核剤過敏症患者は、平均年齢が62.9歳で、しかも全例が50歳以上、60歳以上が80%も占めている高齢者である。したがって、患者自身の免疫能が低下していると考えられる。すなわち、抗結核剤過敏症患者の潜伏期間の長い要因の一つは、過敏症患者自身が高齢で免疫能が低下しており、容易に感作が成立しないためと考えられる。他の一つは、抗結核剤自体の免疫原性あるいはアレルギー原性が、 β -ラクタム剤に比べ低いと言う点である。しかしながら、抗結核剤(特にRFPによる)過敏症の発現率は、 β -ラクタム剤過敏症に比べて決して低くはない。この点については、今後動物実験等でさらに検討する必要があるが、結核菌自体がDTHの高い免疫原性とアジュバント作用を持っていることから、結核菌感染症が高齢者(免疫能の低下した生体)における抗結核剤(免疫原性のあまり高くない抗原)のDTHの誘発を高めている可能性も考えられる。

各結核剤のLMITの陽性率は、INHが12%、RFPが65%、EBが31%で、RFPが他の2剤より有意に高い陽性率を示した。したがって、RFPが3剤の中で最もアレルギー原性が高いと考えられる。また、RFPはLMAFを59%も検出し、LMIFをわずか6%しか検出してない。すなわち、RFPによるDTHはLMAFの関与がきわめて高く、抗結核剤過

敏症における LMAF の関与の高さは RFP に起因している。著者らは、LMAF は DTH の前期 (感作程度が弱い抗原の感作期間が短い場合) に産生され、LMIF は DTH の後期 (感作程度が強い抗原の感作期間が長い場合) に産生されることをすでに明らかにしている^{2,3)}。したがって、RFP は DTH の免疫原性が低いのか、あるいは DTH の過程をどこかでブロックするのかが示唆される。この点も興味ある問題であり、動物実験等で更に検討する必要があると考える。

INH の LMIT 陽性率は 12% で、INH による DTH は RFP に比べきわめて低率と考えられる。しかしながら、LMIT 陽性薬剤を検出できなかった症例 6 と 9 は、INH の再投与による発熱を認め、他の薬剤による異常は認めなかったことから、INH による過敏症状が DTH 以外の発現機序もある可能性が示唆される。また、INH は、生体内でアセチル化酵素による acetylisoniazide となり、さらに酸アミダーゼにより isonicotinic acid と acetylhydrazine になり、この acetylhydrazine が生体内高分子と共有結合を作り易く、肝細胞障害を発現することが報告されている^{5,6)}。したがって、INH の代謝産物によるアレルギー原性も充分考えられ、INH 過敏症が INH そのものによる DTH だけではないと考えられる。

文 献

- 1) Uno K, Yamasaku F: Application of leucocyte migration tests to detection of allergenic drugs in patients with hypersensitivity to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 241 ~ 250, 1989
- 2) Uno K, Yamasaku F: Structural correlation with cross-reactivity of β -lactam antibiotics in delayed type hypersensitivity. - Cross-allergenicity in hypersensitivity to cepheims with a tetrazolyl group in the C-3 side chain. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 251 ~ 264, 1989
- 3) 宇野勝次: 白血球遊走促進及び阻止因子の検出からみた β -ラクタム剤過敏症の発現機構の検討。アレルギー 39: 1605 ~ 1611, 1990
- 4) 亀谷麒与隆: 薬物による肝炎, 肝炎をめぐる諸問題。第 19 回日本医学会総会会誌 S 53: 1157 ~ 1160, 1975
- 5) Mitchell J R, Thorgeirsson U P, Black M, Timbrell J A, Snodgrass W R, Potter W Z, Jollow D J, Keiser H R: Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylator: possible relation to hydrazine metabolites. *Clin. Pharmacol. Ther.* 18: 70 ~ 79, 1975
- 6) Timbrell J A, Wrigth J M, Baillie T A: Monoacetylhydrazine as a metabolite of isoniazide in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 22: 602 ~ 608, 1978

STUDIES ON ANTITUBERCULOUS AGENT-INDUCED HYPERSENSITIVITY BY LEUCOCYTE MIGRATION INHIBITION TEST

Katsuji Uno, Motohiro Yagi

Pharmacy, Suibarago Hospital, Okayama-cho 13-23, Suibara-machi,
Kitakanbara-gun, Niigata 959-21, Japan

Osamu Sekine

Department of Internal Medicine, Suibarago Hospital

Fusanosuke Yamasaku

Niigata-nishi Health Center

In 17 patients suspected of hypersensitivity to antituberculous agents, the identities of the allergic drugs were determined by leucocyte migration inhibition test (LMIT). The evaluation of LMIT and the involvement of delayed-type hypersensitivity (DTH) were investigated for hypersensitivity induced by antituberculous agents. The overall sex distribution was 11 males and 9 females, and all cases were over 50 years old. These consisted of 9 cases of skin eruptions, 5 of hepatopathy, 5 of pyrexia, 1 of pneumonitis, 1 of pulmonary infiltration with eosinophilia syndrome and 1 of thrombocytopenia. Also, the categories of allergic symptoms overlapped to some extent in the cases with concomitant symptoms. An LMIT was performed using an indirect agarose-plate method. The antigen concentration was 50 $\mu\text{g/ml}$ for isoniazide (INH) or ethambutol (EB), and 10 $\mu\text{g/ml}$ for rifampicin (RFP). The LMIT-positive rate was 88 % for all 17 cases. Leucocyte migration activating factor (LMAF) and leucocyte migration inhibitory factor (LMIF) were detected in 71 % and 29 %, LMAF being found significantly ($p < 0.01$) more often than LMIF. The LMIT-positive rate for each antituberculous agent was 12 % for INH, 65 % for RFP and 31 % for EB, (RFP having the highest rate of the three drugs). LMAF and LMIF were detected at 59 % and 6 %, with RFP, LMAF being found significantly ($p < 0.0005$) more often than LMIF. Our findings indicate that LMIT is valuable in detecting the causative drugs in antituberculous-agent-hypersensitive patients, and DTH plays a major role in the pathogenesis of this hypersensitivity. RFP has the highest allergenicity in antituberculous agents, while LMAF is highly involved in DTH induced by RFP.