

『中山人間科学振興財団活動報告書 2024』

研究助成

シングルセル解析を用いた薬剤アナフィラキシー病態の解明

足立剛也

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

研究の目的

即時型アレルギーの最重症型、アナフィラキシーの原因として、過去 20 年間で最も多いのが、医薬品である。特に、複数薬剤を使用し、迅速に診断・治療しなければ時に致死性的となり得る周術期のアナフィラキシーは大きな問題となる。その被疑薬として我が国で最も多かったのが、非脱分極性麻酔用筋弛緩剤のロクロニウム、ついで同拮抗薬のスガマデクス、抗菌薬のセファゾリンだった (Takazawa et al. *Br J Anaesth* 2023)。

しかし、薬剤によるアナフィラキシーを予測する手法は未だ確立されておらず、実際の診断も困難である。セファゾリン等抗菌薬による即時型反応では、 β ラクタム特異的 IgE の同定検査が報告されているが、感度は 0-85% と多岐に渡る (Brockow: *J Immunol Methods* 2021)。ロクロニウム・スガマデクスによるアナフィラキシーは、IgE の上昇が見ら

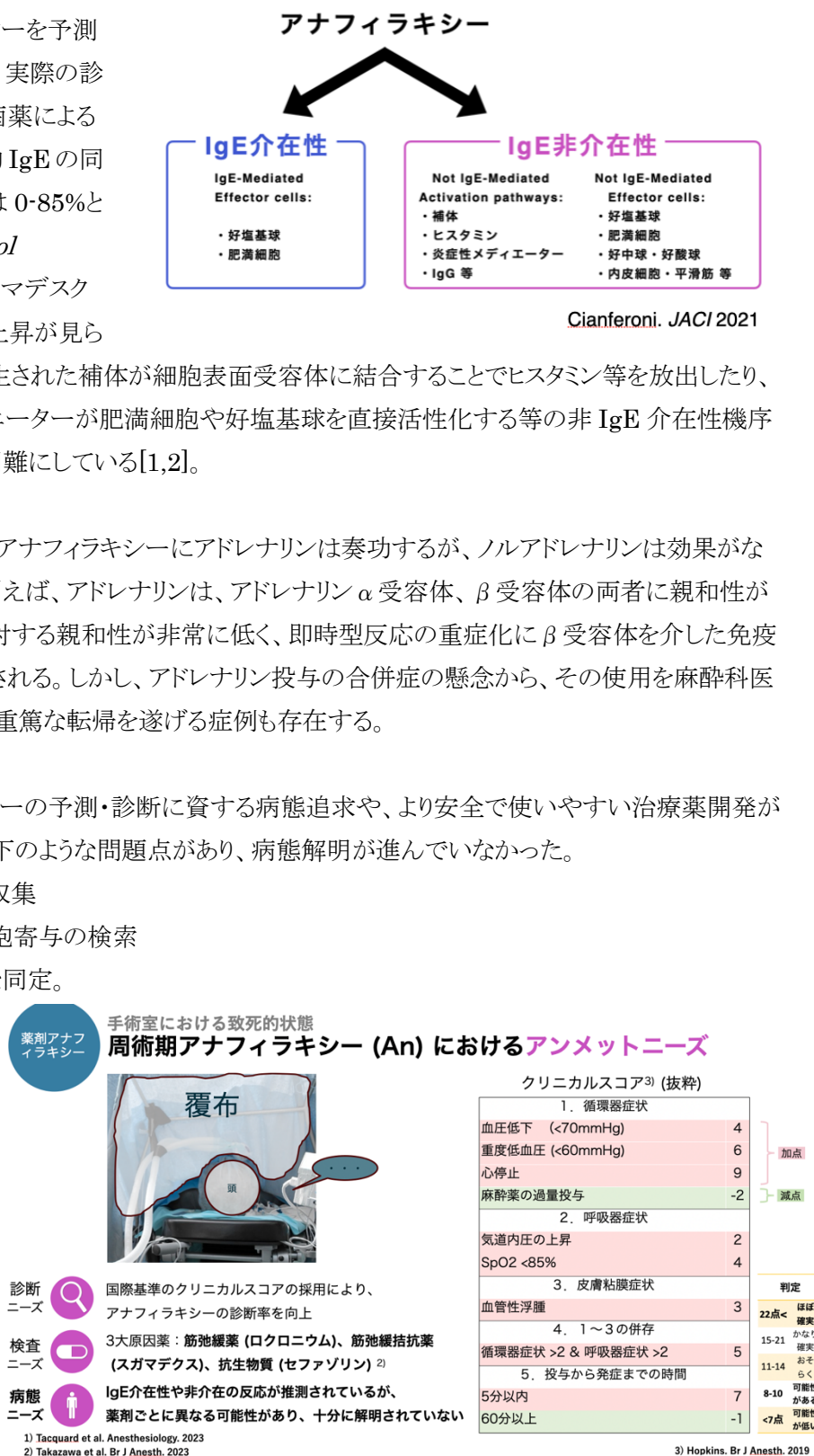
れないことから、抗原刺激により産生された補体が細胞表面受容体に結合することでヒスタミン等を放出したり、補体を介さず様々な炎症性メディエーターが肥満細胞や好塩基球を直接活性化等の非 IgE 介在性機序が想定されており、病態の理解を困難にしている[1,2]。

また、長年麻酔科医の間では、「アナフィラキシーにアドレナリンは奏功するが、ノルアドレナリンは効果がない」という経験が共有されてきた。例えば、アドレナリンは、アドレナリン α 受容体、 β 受容体の両者に親和性が高いが、ノルアドレナリンは後者に対する親和性が非常に低く、即時型反応の重症化に β 受容体を介した免疫反応が寄与している可能性も推測される。しかし、アドレナリン投与の合併症の懸念から、その使用を麻酔科医が躊躇するといった報告もあり[3]、重篤な転帰を遂げる症例も存在する。

以上より、薬剤によるアナフィラキシーの予測・診断に資する病態追求や、より安全で使いやすい治療薬開発が求められている。一方、これまで以下のような問題点があり、病態解明が進んでいなかった。

- ①救命治療時におけるサンプル収集
- ②好塩基球・肥満細胞以外の細胞寄与の検索
- ③アレルゲン（原因薬）の正確な同定。

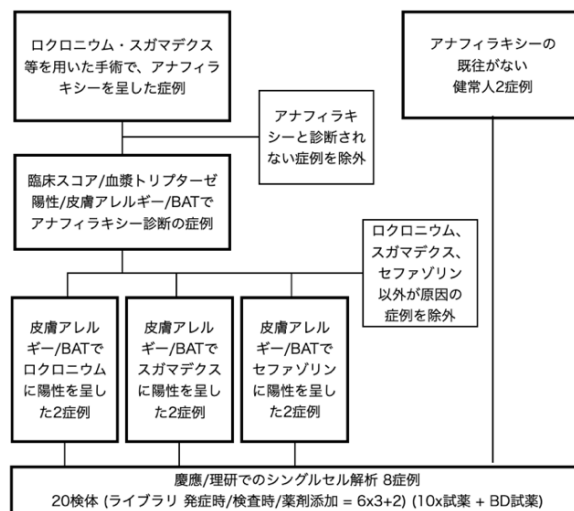
そこで、本研究では、周術期アナフィラキシー症例および感受作アレルギー症例の発症時・1 ヶ月後の採血、好塩基球活性化試験 (BAT)・皮膚アレルギー検査時の試料を用いてシングルセル解析等精査を行うことで病態を明らかにし、得られた知見を新規予防・診断及び治療開発につなげることを目指す。



研究の計画

周術期にアナフィラキシーを呈した症例に対して、発症時、1ヶ月後の血球・血漿の採取、薬剤アレルギー（原因薬）同定のためのBAT、および必要に応じて皮膚アレルギー検査（プリック/皮内テスト）を行う。

アナフィラキシー発症時の臨床スコア（NAP6 grade）、血漿トリプターゼ、BAT、皮膚アレルギー検査をもとにアナフィラキシーの診断を行い（合計スコア（0-4）で2点以上が確定診断）、原因薬を同定できた症例および対照群に対して、発症時・発症後・および発症後の検体に薬剤アレルギーを添加した検体を用いて、好塩基球を含めた末梢血単核球のシングルセル解析結果を比較検討する。また、同意が得られた患者については、皮膚アレルギーテストで陽性となった症例の、検査部位の皮膚生検検体を用いてシングルセルRNAシーケンス（scRNA-seq）を行い、末梢組織における肥満細胞を含めた解析を検討する。



研究の結果

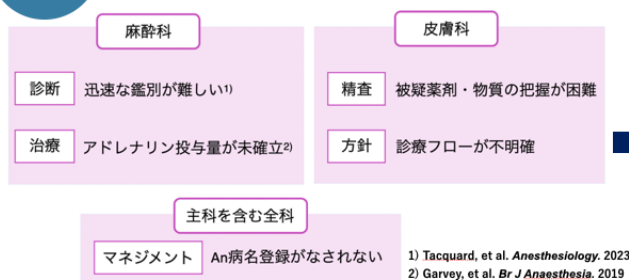
① 診療体制

麻酔科・皮膚科・手術を行う主科との連携を開始し、国際基準の臨床スコア導入による診断率の向上、好塩基球活性化試験と皮膚検査による精査の標準化、アレルギー精査依頼100%を達成した [4]。

① 診療体制構築

手術室における致死的状态

周術期アナフィラキシー(An)診療の課題



- 麻酔科では、呼吸・循環障害等をきたす他の病態との迅速な鑑別が難しく、鑑別に有用である皮膚症状を確認しづらい。
- また、アドレナリン投与は急激な後負荷増大等の懸念から躊躇されることがあり、診断・治療の統一なコンセンサスが得られていない。
- 皮膚科では、使用された薬剤や物質を把握することが困難であり、治療方針も含め麻酔科や主科との連携体制が十分に確立されていない。
- アナフィラキシー (An) の病名登録も、いつ・誰が行うのか不明確。

進捗1
診療体制
構築

慶應義塾大学病院アレルギーセンター連携
周術期An発症時フローの明確化



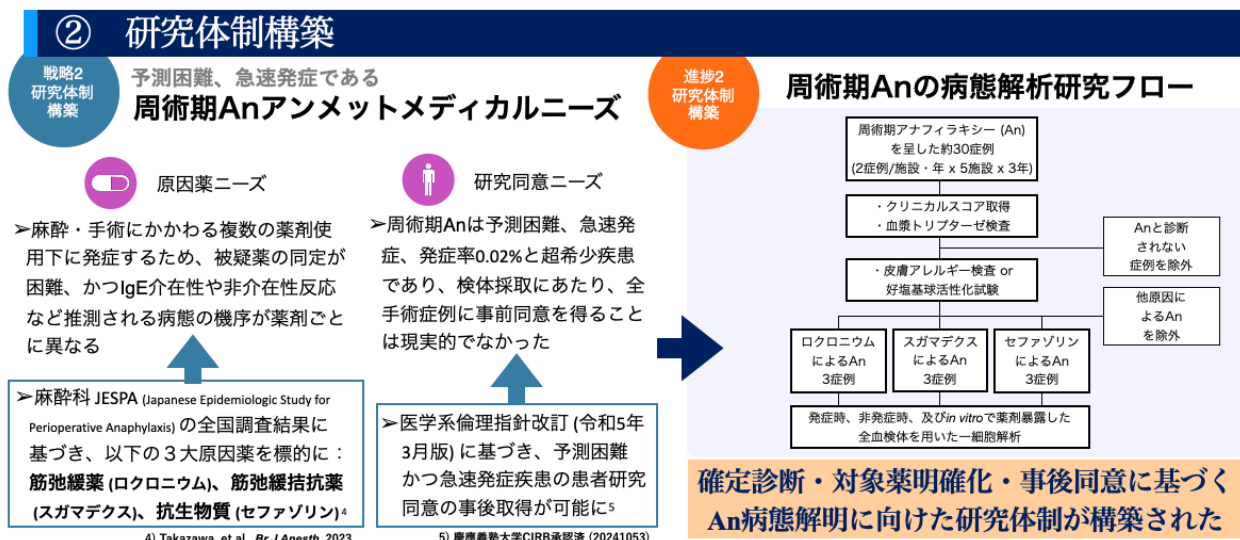
3) 藤金詩子, 足立剛也ら. 日本皮膚免疫アレルギー学会 2024

- 麻酔科・皮膚科・手術を行う主科との連携を開始。
- 国際基準の臨床スコア導入による診断率の向上、好塩基球活性化試験と皮膚アレルギー検査による標準化、アレルギー状況説明、精査依頼100%を達成。

次の手術を安全に行えるようにする
ための診療体制の基盤が確立された

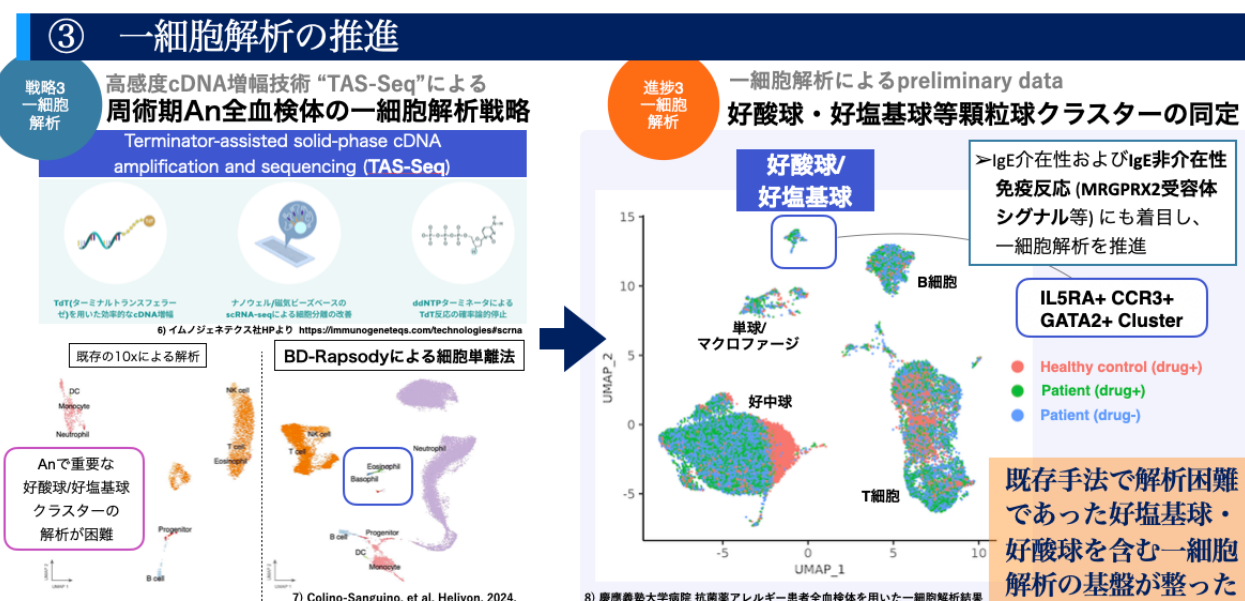
② 研究体制構築

周術期アナフィラキシーは、予測困難、急速発症、発症率 0.02%と超希少疾患であり、その検体採取にあたり、全手術症例に事前同意を得ることは現実的でないが、本研究では、「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（R5 年改正）」に基づいて、患者の研究同意事後取得が可能となり、研究計画の倫理委員会承認が得られ、円滑な検体採取に繋がった。



③ 一細胞解析の推進

さらに、BD 社の Rhapsody を用いた細胞単離法と、高感度 cDNA 増幅技術“TAS-Seq”を用いることで[5]、既存の scRNA-seq 手法で解析が困難だった好酸球・好塩基球を含む IL5RA+ CCR3+ GATA2+ 細胞クラスターの同定に成功した。



研究の展望

本研究により、次の手術を安全に行えるようにするための診療連携体制と、確定診断・対象薬剤の明確化・事後同意に基づく薬剤アナフィラキシーの病態解明研究の基盤が確立された。今後、薬剤ごとにIgE介在性だけでなく、MRGPRX2 受容体シグナルやオピオイド受容体発現集団など IgE 非介在性免疫反応に着目した、scRNA-seq 解析のさらなる推進が望まれる。

さらに、麻酔科を含めた学際的研究体制を構築し、周術期アナフィラキシーに関して解析したリアルワールドエビデンス、および検体解析によって得られた免疫学的機序・新規バイオマーカー候補等の知見を、診療ガイドライン等への反映を通じて社会実装につなげることを目指す。最終的に、本研究の成果は医療の質向上、診療の均てん化等につながることが期待される。

ガイド
ライン反映

社会実装を目指す 薬剤アレルギー知見のガイドライン等反映戦略

ガイドライン等反映	症例組み入れ・患者/医療従事者啓発	研究連携	将来
 厚生労働省政策研究班 佐藤班 (申請中) 「アナフィラキシー発症予防 および初動対応の質向上に 資する研究」	 JESPA Japanese Epidemiologic Study for Perioperative Anaphylaxis	重症・難治性症例のゲノム解析 AMED免疫アレルギー疾患 実用化研究事業 森田班 「アレルギー関連パスウェイの 遺伝子解析を通じた重症 アレルギー疾患の病態解明」	造影剤・ 輸血製剤 等へ展開

参考文献

1. Cianferoni: JACI 2021,
2. Stone KD, et al: JACI 2010
3. Ko, et al: *Sci Rep* 2016
4. 雁金詩子, 寅丸智子, 高橋ちあき, 田原海, 若宮里恵, 正木克宜, 足立剛也: 周術期アナフィラキシーの診療体制構築に向けた調査研究. 第 54 回日本皮膚免疫アレルギー学会学術大会, 福島, 2024 年 12 月 21 日.
5. イムノジェネテクス: Terminator-assisted solid-phase cDNA amplification and sequencing (TAS-Seq). Available at <https://immunogeneteqs.com/technologies#scrna>