



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 除菌療法中のヘリコバクター・ピロリ過敏症における細胞外小胞を介した抗原提示の役割に関する研究                                                  |
| Author(s)           | 伊東, 孝政                                                                                          |
| Description         | 配架番号 : 2431                                                                                     |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第13375号                                                                                        |
| Issue Date          | 2018-12-25                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k13375">https://doi.org/10.14943/doctoral.k13375</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/72398">https://hdl.handle.net/2115/72398</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Takamasa_Ito.pdf                                                                                |



# 学位論文

除菌療法中のヘリコバクター・ピロリ  
過敏症における細胞外小胞を介した  
抗原提示の役割に関する研究  
(Potential role of extracellular  
vesicle-mediated antigen  
presentation in *Helicobacter  
pylori* hypersensitivity during  
eradication therapy)

2018 年 12 月

北海道大学

伊東 孝政



# 学位論文

除菌療法中のヘリコバクター・ピロリ  
過敏症における細胞外小胞を介した  
抗原提示の役割に関する研究

(Potential role of extracellular  
vesicle-mediated antigen  
presentation in *Helicobacter  
pylori* hypersensitivity during  
eradication therapy)

2018 年 12 月

北海道大学

伊東 孝政

## 目 次

|                          |      |
|--------------------------|------|
| 発表論文目録及び学会発表目録 . . . . . | 1 頁  |
| 緒言 . . . . .             | 2 頁  |
| 略語表 . . . . .            | 10 頁 |
| 実験方法 . . . . .           | 11 頁 |
| 実験結果 . . . . .           | 17 頁 |
| 考察 . . . . .             | 39 頁 |
| 総括および結論 . . . . .        | 42 頁 |
| 謝辞 . . . . .             | 43 頁 |
| 引用文献 . . . . .           | 44 頁 |

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Ito T, Shiromizu T, Ohnishi S, Suzuki S, Mabe K, Hasegawa A, Ujiie H, Fujita Y, Sato Y, Terai S, Kato M, Asaka M, Tomonaga T, Shimizu H, Abe R

Potentail role of extracellular vesicle-mediated antigen presentation in *Helicobacter pylori* hypersensitivity during eradication therapy

*J Allergy Clin Immunol.* 142, 672-676. 2018

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Ito T, Ujiie H, Fujita Y, Shimizu H, Abe R  
A novel mechanism of skin reaction related to *Helicobacter pylori* treatment  
46th Annual ESDR Meeting,  
Munich, Germany, Sep 5<sup>th</sup>, 2016.

Ito T, Ujiie H, Fujita Y, Shimizu H, Abe R  
A novel mechanism of skin reaction related to *Helicobacter pylori* treatment  
42th Annual JSID Meeting,  
Kochi, Japan, Dec 15<sup>th</sup>, 2017

## 緒言

*Helicobacter pylori* (HP) は主に人の胃に生息するグラム陰性のらせん桿菌である<sup>1-4</sup>。HP は胃潰瘍、胃がんといった胃のみならず特発性血小板減少性紫斑病、鉄欠乏性貧血、急性冠症候群といった胃以外の臓器病変に関与していることが知られている<sup>5-8</sup>。胃以外の臓器病変をきたす発症機序は不明な点が多いが、近年では HP を含有するエクソソーム といった細胞外小胞の関与が示唆される報告がなされている<sup>9</sup>。

本邦において 2000 年より胃十二指腸潰瘍における HP 感染症が除菌対象疾患となり、現在では HP 感染胃炎患者に対しても除菌治療の適応となっている。近年除菌療法の保険適応の拡大とともに皮疹の出現を認めることが報告されてきている<sup>10-14</sup>。一般的には除菌に使用した薬剤による薬疹が考えられており除菌に使用した薬剤の使用が禁止になることが多い。しかしながら、これらの症例においてパッチテスト、Drug-induced lymphocyte stimulation test (DLST)、内服誘発試験といった検査を施行するも原因薬剤を同定できなかった症例も報告されている。これまでの報告では検査陰性例の皮疹の場合、薬疹は否定的であり、薬剤内服終了後に皮疹が出現している臨床経過からも別の機序の存在が推察されているが詳細は解明されていない<sup>10-14</sup>。

本研究では HP 除菌療法後に皮疹を認める症例において、薬剤ではなく HP が関与する病態の存在解明を目指すものである。

## *Helicobacter pylori* について

*Helicobacter pylori* (HP) は 1983 年に Warren JR と Marshall BJ によって発見された主にヒトの胃に生息するらせん型のグラム陰性微好気性細菌である<sup>1</sup>。HP はウレアーゼと呼ばれる酵素を産生している。この酵素によって胃粘液中の尿素をアンモニアと二酸化炭素に分解し、生じたアンモニアで局所的に胃酸を中和することで HP は胃に適応し生息している<sup>2-4</sup>。HP は世界人口の約 40-50%、本邦においても 40 歳以上の約 70%が保菌していると報告されている<sup>15</sup>。

HP の感染は、慢性胃炎、胃潰瘍、胃がんといった胃病変のみならず、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) や鉄欠乏性貧血の原因となることや急性冠症候群やインスリン抵抗性のリスク因子になるといった胃以外の臓器疾患にも深く関与していることが報告されている<sup>5-8</sup>。

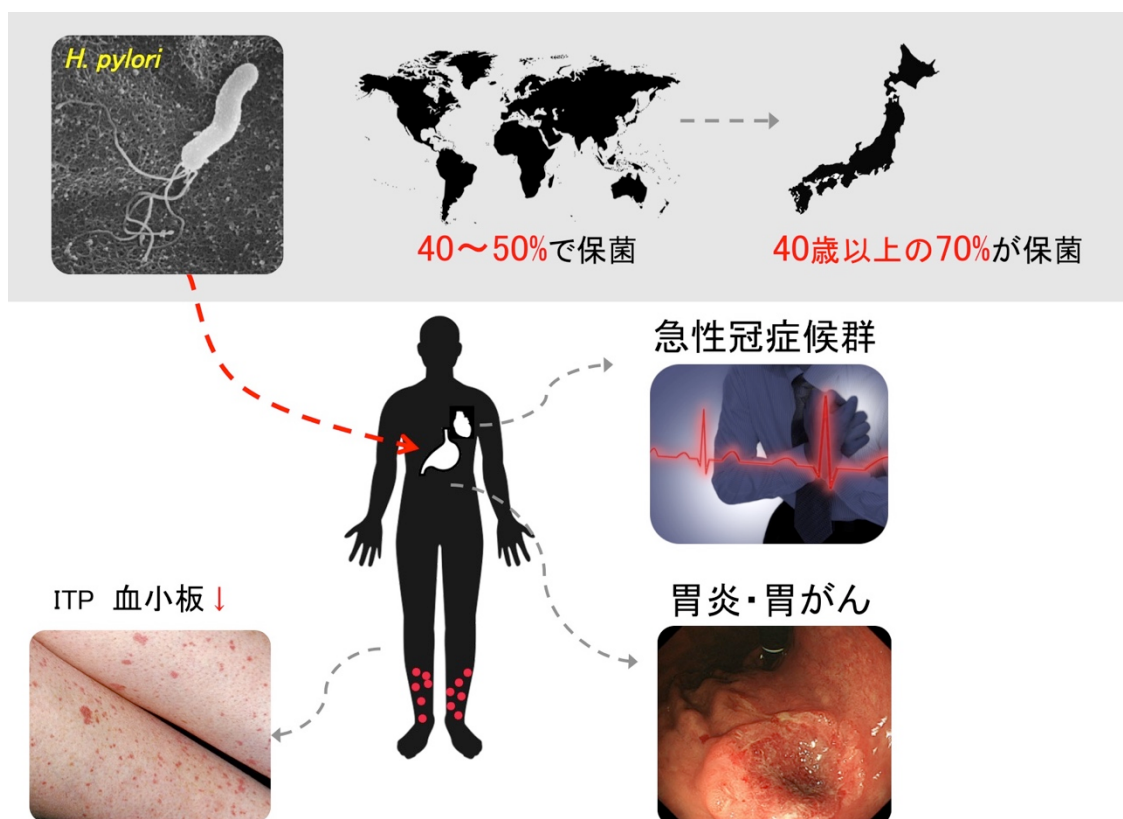


図 1

HP 感染症は胃に感染し、胃疾患のみならず他臓器疾患にも深く関与している。

## 薬疹について

体内に摂取された薬剤、あるいはその代謝産物によって皮膚や粘膜に発疹をきたすようになったものを薬疹と呼ぶ。症状としては、浮腫性紅斑や丘疹を主症状とする丘疹紅斑型のものが多いが、あらゆる臨床像をとりうる<sup>16,17</sup>。皮疹発症までの期間は薬剤摂取開始から内服継続7～10日目が多く、発症機序としては薬剤自体、あるいは薬剤がハプテンとして血清蛋白などと結合した薬剤複合体が抗原性を獲得するといった抗原特異的な機序を介することが知られている<sup>18-20</sup>。

原因薬剤の同定方法としては、皮疹出現時期と薬剤投与期間、類似薬による薬疹の既往歴の有無、発疹型などから可能性のある薬剤を絞り込む。また、類似した症状を呈した過去の薬疹報告例、薬剤の中止・変更による皮疹の軽快の有無も参考となる。さらに薬剤リンパ球刺激試験（DLST）、パッチテスト、内服誘発試験（再投与試験）を行うことが有用である<sup>21-27</sup>。



図4 薬疹の臨床像

多形紅斑型薬疹。一部癒合した1-2cm大までの浮腫性紅斑を認める(左図)。播種状丘疹紅斑型。5-10mm大の丘疹や紅斑を認める(右図)。  
(清水宏「あたらしい皮膚科学第3版」<sup>28</sup>より抜粋)

## *Helicobacter pylori* 除菌療法後の皮疹について

HP 除菌療法として、2000 年 11 月に胃十二指腸潰瘍におけるピロリ感染症に対してランソプラゾール、アモキシシリン、クラリスロマイシンの 3 剤併用療法が保険適応となり、その後現在では、①一次除菌療法としてプロトンポンプ阻害薬(ランソプラゾールまたはオメプラゾール)、アモキシシリン、クラリスロマイシン、②二次除菌法としてプロトンポンプ阻害薬、アモキシシリン、メトロダニゾールが保険適応のある除菌療法となった<sup>29)</sup>。

多剤併用 HP 除菌療法による副作用として約 2~3 割に下痢・軟便等の軽微な消化器症状や味覚障害などの口腔内症状が起こることが多く報告されているが、近年除菌療法の保険適応の拡大とともに、数としては少ないが皮疹の出現を認めることが報告されてきている<sup>10-14)</sup>。ピロリ除菌療法時において生じる皮疹は、一般的には除菌に使用した薬剤による薬疹が考えられており、本邦においては 2012 年までに除菌療法後に皮疹が出現した症例は少なくとも 32 例が論文として報告されている。男女比は不明な 1 例を除き男性(10 例):女性(21 例)=1:2 で女性に多く、発症年齢は 22 歳~77 歳(平均 58.6 歳)で 50 歳代に多く(13 例)認められた。皮疹の病型分類では、播種状紅斑丘疹型(17 例)、多形紅斑型(11 例)の順に多く、その他、Stevens-Johnsons 型、アナフィラキシー型、固定薬疹、紅皮症型がそれぞれ 1 例ずつ報告されていた。原因薬剤を特定する検査として、現在一般的に使用されているものとしてはパッチテスト、DLST、内服誘発試験などがあるが、これらの検査が陽性であった症例は 22 例あり、陰性例は 9 例、不明 1 例であった。



**図 2 HP 除菌療法後に皮疹を認めた症例**  
略全身に紅斑を認め、一部癒合している。(文献 10 より引用)

次に、薬剤同定試験が陽性であった症例(22 例)と検査陰性例(9 例)の比較をみると、薬疹症例(22 例)では、薬剤内服開始から皮疹の出現までの期間が 1~14 日(平均 6.2 日)であり、皮疹出現期は薬剤内服中が 9 例、内服終了後が 9 例、不明が 4 例であった。原因薬剤は重複例を含めアモキシシリンが 21 例(72.4%)で、ランソプラゾールが 4 例(13.8%)、クラリスロマイシンが 3 例(10.3%)、オメプラゾールが 1 例(3.4%)であり、アモキシシリンの頻度が最も多かった。原因薬剤特定検査では、DLST が 14 例中 7 例、パッチテストが 15 例中 14 例、内服誘発試験が 3 例中 3 例、プリックテストが 1 例中 1 例で陽性を示した。

原因薬剤検査陰性例(9 例)は、薬剤内服から皮疹出現までの期間が 7~10 日(平均 8.9 日)で、検査陽性例に比べ出現までの期間が長い傾向を認めており、内服終了後から皮疹が出現することが多かった。

これまでの報告では検査陰性例の皮疹の場合、薬疹は否定的であり、薬剤内服終了後に皮疹が出現していることから、Jarisch-Herxheimer 様反応でないかと推察されている。Jarisch-Herxheimer 反応とは、梅毒などの治療の為にペニシリンなどの抗生物質を投与した際に身体に起こる反応で、主な症状としては全身倦怠感、発熱、頭痛、血圧低下などである。通常、抗生剤の投与後 2 時間前後から生じ、24-48 時間で症状の回復を認める<sup>30,31</sup>。病態としては、病原の細菌が大量に死滅・破壊されて、細菌内部の毒素が血液に混入する事が考えられており、血中において TNF- $\alpha$  などのサイトカインが上昇することが報告されている<sup>32</sup>。今回のピロリ除菌療法後に出現した皮疹においても、ピロリ毒素自体によるものより、抗生剤によって死滅・破壊され変性したピロリの菌体成分による遅延アレルギー反応と考えられてきた<sup>33</sup>。

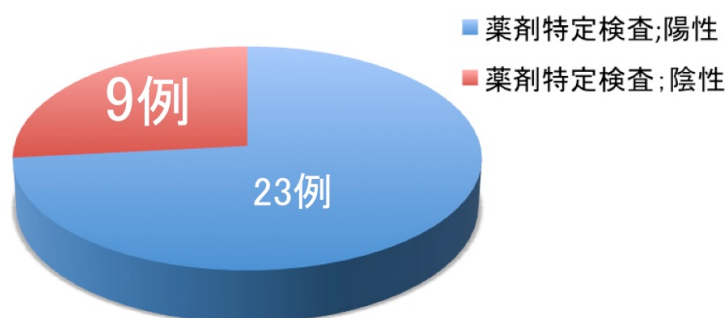


図 3 原因薬剤を同定できなかった HP 除菌療法後に皮疹を認めた症例

## エクソソーム（細胞外小胞）について

エクソソームはほぼ全ての細胞から分泌される脂質二重膜で形成される 100-250nm 前後の小胞である。内部に mRNA, miRNA などの核酸分子を含み、新しい細胞間コミュニケーションツールとして着目されている<sup>34,35</sup>。食食細胞が分泌するエクソソームは抗原提示関連タンパクである Major Histocompatibility Complex (MHC) クラス I/II 両方を有し、免疫細胞間の情報伝達に関わっていることが報告されている<sup>36-39</sup>。

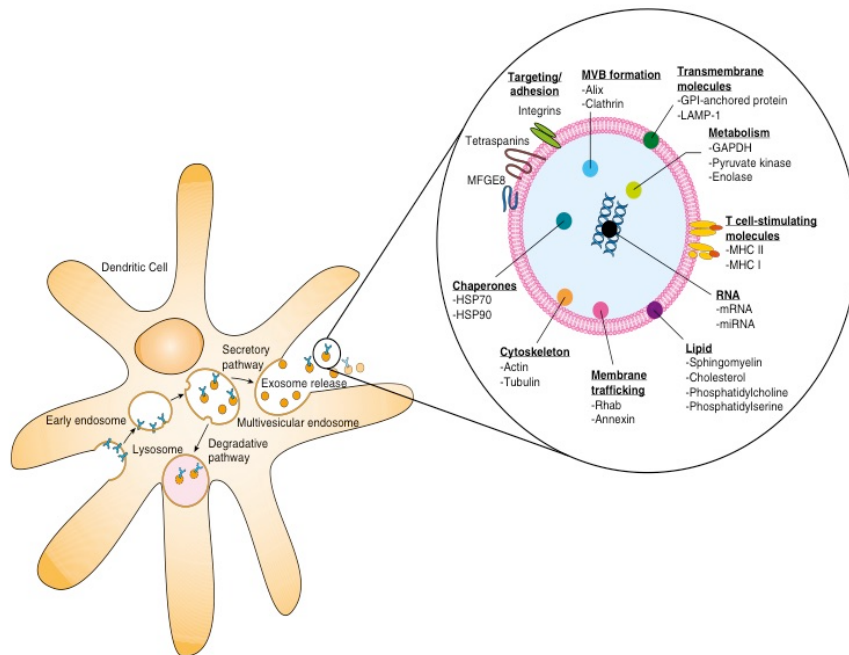


図 5 樹状細胞から分泌されるエクソソーム（文献 38 より抜粋）

## 本研究の目的

*Helicobacter pylori* 除菌療法後の皮疹は一般的に除菌療法に使用される薬剤による薬疹と考えられるが、一部の患者において一般的な薬疹と異なる臨床所見が散見される。そこで本研究の目的は、それらの症例を研究することで薬疹と異なった皮疹の機序解明を目指すものである。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

|         |                                          |
|---------|------------------------------------------|
| HP      | <i>Helicobacter pylori</i>               |
| BSA     | bovine serum albumin                     |
| LTT     | lymphocyte stimulation test              |
| DLST    | drug-induced lymphocyte stimulation test |
| PBMC    | peripheral blood mononuclear cells       |
| MDDCs   | monocyte-derived dendritic cells         |
| LC-MS   | liquid chromatography mass spectrometry  |
| ELISA   | enzyme linked immunosorbent assay        |
| FBS     | fetal bovine serum                       |
| PBS     | phosphate buffered saline                |
| ELISpot | enzyme linked immunospot                 |
| HE      | hematoxyline-eosin                       |
| EVs     | extracellular vesicles                   |
| IL      | interleukin                              |
| TNF     | tumor necrosis factor                    |
| IFN     | interferon                               |
| HLA     | human leukocyte antigen                  |
| MHC     | major histocompatibility complex         |
| EDTA    | ethylenediaminetetraacetic acid          |
| RPMI    | Roswell Park Memorial Institute medium   |
| S.I.    | stimulation index                        |

## 実験方法

本研究はヘルシンキ宣言に則り、北海道大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認（承認番号 015-0464）を得た上で、参加者から書面による同意を得て施行した。臨床検体の取り扱いに関しては北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認を受け、「北海道大学における臨床研究の取り扱いに関する指針」に則した。

### 1. 各種試料の作成

#### ① 血清サンプルの採取

HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者(15 名)、HP 除菌療法後に皮疹を認めなかった患者(n=3)、HP 非保菌者(n=5)からそれぞれ同意のもと血清を採取した。HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者では皮疹出現時、皮疹を認めなかった症例においては除菌療法終了 2-3 日後に採取した。

#### ② 患者 PBMC の回収

HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者末梢血を EDTA 試験管で 30ml 採取した。この末梢血を Phosphate buffered saline (PBS) と等量希釈し、Ficoll-Isopaque (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) の上層にゆっくり滴下し遠心分離を行った。400xg、30 分、4℃ の条件下で遠分離後、Ficoll-Isopaque 上層の白色層をピペットで回収し、PBS で洗浄し PBMC を回収した。使用した末梢血は皮疹消退後 2 週間から 3 ヶ月経過した患者から回収した。

#### ③ 皮膚生検

HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者の皮膚病変部から皮膚生検をそれぞれ同意のもと施行した。皮膚はエピネフリン添加 1%キシロカインで局所麻酔したのちに 4mm デルマパンチを用いて皮膚を切除し、4-0 ナイロン皮膚を用いて表皮縫合した。採取した皮膚はホルマリン固定し HE 染色に使用した。

#### ④ *Helicobacter pylori* の培養

-80℃の条件下で Brain Heart Infusion 中に保管されていた *Helicobacter pylori* (ATCC43504; American Type Culture Collection, Rockville, MD) を融解後、コロムビア 10%ヒツジ血液寒天培地 (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) にて散布した。培地は密閉容器に入れ、アネロパック (三菱ガス化学株式会社, 東京) を用いて 37℃、72-120 時間微好気条件 ( $O_2$ ; 5%、 $CO_2$ ; 10%、 $N_2$ ; 85%) 下で培養した。培養した HP は滅菌生理食塩水に懸濁し、 $10^7$ CFU/ml の菌液を調整した。

#### ⑤ 患者血清からのエクソソーム 抽出

回収した血清サンプルから超遠心方を用いてエクソソーム を回収した。回収した患者血清に PBS を加え希釈し、300g、10 分の条件下で遠心し大きな debris を除去した。その後、上清を回収し  $0.22\mu m$  のフィルター (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) で濾過した後に 100,000x g、70 分の条件で遠心した。遠心後に回収した沈殿物を PBS で洗浄し、さらに 100,000x g、70 分の条件下で遠心した。遠心後に回収した沈殿物を少量の PBS で懸濁し各種解析に使用した。

#### ⑥ 患者単球の樹状細胞への分化

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性であった患者から回収した PBMC を 10cm ディッシュプレートに播種し、10ml の 10% fetal bovine serum (FBS) 含有 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) に入れて、37℃、5%  $CO_2$  下で培養した。90 分経過後に RPMI 培地を吸引し、PBS 500 $\mu$ l で洗浄してプレートに吸着した単球を回収した。その後、10% FBS、100 ng/ml リコンビナント GM-CSF (RD systems, Minneapolis, MN)、そして 50ng/ml リコンビナント IL-4 (RD systems, Minneapolis, MN) を含有した RPMI 培地を加え、37℃、5%  $CO_2$  下で 7 日間培養した。培養後に回収した細胞を光学顕微鏡とフローサイトメトリー (CD14) を用いて分化の評価をした。

#### ⑦ 培養上清からのエクソソーム 抽出

上記のように HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性であった患者 PBMC から分化させた樹状細胞 ( $2 \times 10^4$  cells) にそれぞれ *Helicobacter pylori* ( $1.0 \times 10^7$  /CFU)、薬剤 (4 $\mu$ g/ml amoxicillin, 4

μg/ml clarithromycin, 4 μg/ml lansoprazole)、PBS を添加し、10% FBS 含有 complete RPMI 培地にいれ、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。培養開始から 24 時間後に PBS を加え希釈し、300g、10 分の条件下で遠心して大きな debris を除去した。回収した上清を 0.22 μm のフィルター (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) で濾過し、100,000x g、70 分の条件で遠心した。遠心後に回収した沈殿物を PBS で洗浄し、さらに 100,000x g、70 分の条件下で遠心した。遠心後に回収した沈殿物を少量の PBS で懸濁して各種解析に使用した。

### ⑧ 電子顕微鏡観察試料の作成

*Helicobacter pylori* を加えた患者 PBMC 由来樹状細胞培養上清中エタノールから電子顕微鏡観察試料を作成した。サンプルを 5% グルタルアルデヒド溶液で固定し、回転ローターを用いて 4℃ で一晩、攪拌した。緩衝液を除去後にオスミウム溶液を加え、1 時間静置した。オスミウム溶液を除去後に、1% 酢酸ウラン溶液を加え、4℃ で 1 時間静置し溶液を除去し、サンプル内部の水分をエタノール→参加プロピレン→エポキシ樹脂の順で置換した。その後ゼラチンカプセル (応研商事、日本) に包埋し、80℃ で 4 日間以上静置し樹脂を硬化させた試料を用いて、電子顕微鏡観察を行った。

## 2. 培養上清サイトカイン測定

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性であった患者、HP 除菌療法後に皮疹を認めなかった患者、HP 非保菌者から上記の方法を用いて PBMC を回収し、10% FBS を含有した complete RPMI 培地に懸濁し、96well U 底プレートに播種した ( $5.0 \times 10^5$  cells/well)。次に HP ( $1.0 \times 10^7$ /CFU)、*E. coli* ( $1.0 \times 10^7$ /CFU)、PBS をそれぞれ加え、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下の条件下で培養した。24 時間後に 4℃、2500rpm、5 分間遠心し上清を回収した。回収した上清中のサイトカインは Bio-Plex Human Cytokine 27-Plex panel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて解析した。さらに interleukin (IL)-2、IL-4、IL-6、interferon (IFN)-γ、tumor necrosis factor (TNF)-α に関しては ELISA kits (RD systems, Minneapolis, MN) を用いて添付の説明書の記載通りに使用して改めて測定した。

## 3. IFN-γ ELISpot

ELISPOT assay kit (human IFN- $\gamma$  ELISpot<sup>PRO</sup> kits; Mabtech AB, Nacka Strand, Sweden)を添付の説明書の記載通りに使用した。まず、IFN- $\gamma$  特異的キャプチャー抗体でコートされた well を PBS で 3 回洗った後、RPMI media1640 を 200  $\mu$ l 加え室温で静置した。30 分後に RPMI media1640 を decant で除去し、HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性であった患者から単離した PBMC を 10%FBS を含有した complete RPMI に懸濁しプレート (5.0x 10<sup>5</sup> cells/well) に播種した。その後、それぞれのウェルに HP (1.0 x 10<sup>7</sup>/CFU)、薬剤 (4  $\mu$ g/ml amoxicillin, 4  $\mu$ g/ml clarithromycin, 4  $\mu$ g/ml lansoprazole) を加え、陽性コントロール、陰性コントロールを設定した。陽性コントロールは anti-CD3m-ab を加えた。陰性コントロールには RPMI media1640 を加えた。37°C、5% CO<sub>2</sub> 下の条件下で培養し、24 時間後に PBS で 4 回洗浄、Stop solution (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)を加え実体顕微鏡で観察しスポットの出現を確認して 5 分以内に超純水で洗浄して反応を停止させた。well が乾燥した後に Immunospot S5 Versa Analyser (Cellular Technology Limited, OH, USA)を用いてスポット数をカウントした。

#### 4. Lymphocyte stimulation test

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性であった患者から単離した PBMC を 10%FBS 含有 complete RPMI 培地に懸濁し 96well U 底プレート (5.0x 10<sup>5</sup> cells/well) に播種した。次に HP (1.0 x 10<sup>7</sup>/CFU)、薬剤 (4  $\mu$ g/ml amoxicillin, 4  $\mu$ g/ml clarithromycin, 4  $\mu$ g/ml lansoprazole)、PBS をそれぞれ加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下の条件下で培養した。24 時間後に 3H-thymidine (PerkinElmer, Boston, MA) を加え、tapping にて攪拌し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下の条件下で培養した。18 時間後にセルハーベスター (FilterMate) を用いて濾紙に培養した細胞を吸着させ、パラフィンプレートに固定した。パラフィンが乾燥したのちに液体シンチレーションカウンター (MicroBeta2) を用いて細胞の 3H-thymidine 取り込み量を測定した。陰性コントロールとの取り込み量の比、すなわち stimulation index (SI) は 2.0 以上を陽性と判断した。

#### 5. フローサイトメトリー

HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者から単離した PBMC を 10%FBS

含有 complete RPMI 培地に懸濁し 96well U 底プレート ( $5.0 \times 10^5$  cells/well) に播種した。次に HP ( $1.0 \times 10^7$ /CFU)、薬剤 (4  $\mu$ g/ml amoxicillin, 4  $\mu$ g/ml clarithromycin, 4  $\mu$ g/ml lansoprazole)、PBS をそれぞれ加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下の条件下で培養した。24 時間後に 4°C、400g、5 分間遠心し、decant し細胞を回収した。その後、下記の抗体を加え、氷上で 30 分安置した後、FACS バッファー 1ml を加え、2 回遠心 (4°C、400g、5 分間) し FACS チューブに移しフローサイトメトリーで測定、sorting した。FITC-conjugated CD4 (BD Bioscience, CA), PE-Cy7-conjugated CD3 (BD Bioscience), PE-conjugated CD154 (BD Bioscience), FITC-conjugated CD81 (BioLegend, San Diego, CA), PE-conjugated CD9 (BioLegend), Pacific Blue-conjugated CD63 (BioLegend), PE-Cy7-conjugated HLA-ABC (BioLegend), PerCP cy5.5-conjugated HLA-DR (BioLegend), and Sytox Blue (Thermo Fisher Scientific, Bartlett, IL). フローサイトメトリーは FACS-Canto II (BD Bioscience) を使用し、sorting には FACS Aria III (BD Bioscience) を用いた。得られた結果は Flow Jo software (BD Bioscience) を用いて解析した。

## 9. LC-MS/MS 解析

回収したエクソソームは phase transfer surfactant (PTS) プロトコル<sup>40</sup> を用いて膜タンパク処置を施行した。エクソソーム から抽出したタンパクに 1% トリプシンを加え 37°C で overnight にて処理した。処理されたペプチドは Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) with an UltiMate 3000 nano-flow HPLC system (Dionex, Sunnyvale, CA) と HTC-PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) を用いて分析した。得られたデータは MaxQuant software (version 1.5.1.2) を用いて処理した。抽出したピークリストは Andromeda 検索エンジンを用いて UnitProt protein データベースに照合した<sup>41</sup>。

## 10. 統計学的解析

統計学的解析は GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA) を用いた。解析結果は平均  $\pm$  標準誤差で示した。P 値は parametric Student's unpaired t-test あるいは non-parametric Mann-Whitney U-test で解析した。P 値は 0.05 未満を有意差ありとみなし、\*0.01<p<0.05, \*\*0.01<p<0.001 で示した。

## 実験結果

### 1. 患者背景

#### ① 除菌療法に使用した薬剤と DLST の結果

HP 除菌療法後に皮疹を認めた症例 15 例に対して被疑薬 3 剤をもちいて DLST を施行した。DLST によって原因薬剤を同定した症例は 2 名であり、残り 13 名は原因薬剤を同定できなかった。

|            | Age (yrs.) | Sex | Interval from start of treatment to onset (days) | Medications | Result of drug LTTs    |
|------------|------------|-----|--------------------------------------------------|-------------|------------------------|
| Patient 1  | 66         | F   | 11                                               | ACL         | All negative (5 times) |
| Patient 2  | 72         | F   | 10                                               | ACL         | All negative (3 times) |
| Patient 3  | 46         | M   | 10                                               | ACR         | All negative (3 times) |
| Patient 4  | 30         | F   | 10                                               | ACR         | All negative (3 times) |
| Patient 5  | 62         | F   | 10                                               | ACV         | All negative (3 times) |
| Patient 6  | 64         | M   | 10                                               | ACR         | All negative (3 times) |
| Patient 7  | 70         | F   | 9                                                | ACL         | All negative (3 times) |
| Patient 8  | 74         | F   | 9                                                | ACL         | All negative (3 times) |
| Patient 9  | 61         | F   | 9                                                | ACR         | Amoxicillin (226%)     |
| Patient 10 | 42         | F   | 8                                                | ACL         | All negative (3 times) |
| Patient 11 | 74         | M   | 8                                                | ACL         | All negative (4 times) |
| Patient 12 | 73         | F   | 7                                                | ACR         | Rabeprazole (232%)     |
| Patient 13 | 65         | F   | 4                                                | ACL         | All negative (3 times) |
| Patient 14 | 60         | F   | 4                                                | ACR         | All negative (3 times) |
| Patient 15 | 75         | F   | 4                                                | ACL         | All negative (3 times) |

LTTs; lymphocyte stimulation tests ACL: Amoxicillin, Clarithromycin and Lansoprazole, ACR:

Amoxicillin, Clarithromycin and Rabeprazole, ACV: Amoxicillin, Clarithromycin and vonoprazan

表 1. ピロリ除菌療法後に皮疹を認めた患者の除菌療法に使用し

た薬剤と DLST の結果

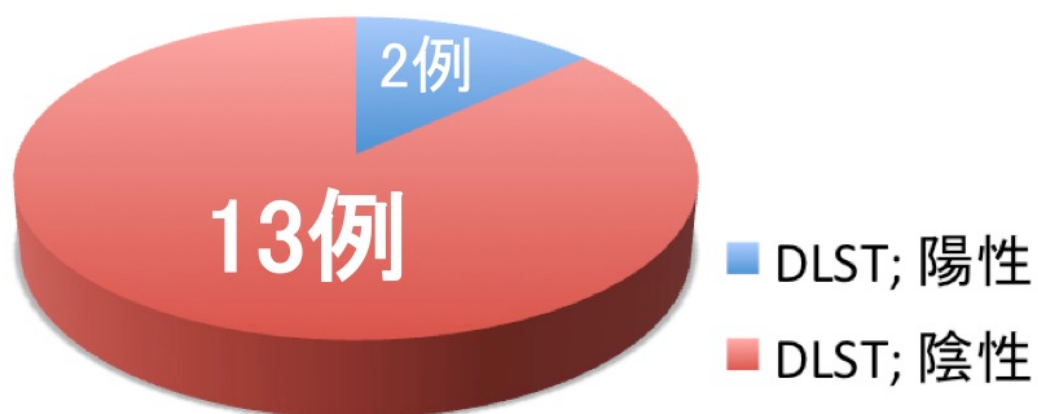


図 6. HP 除菌療法後に皮疹を認めた症例における DLST 結果

## ② HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者の臨床像の検討

次に HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性の症例における臨床像を検討した。皮疹はいずれの患者も多形紅斑型または播種状丘疹紅斑型であり、薬疹との明らかな相違点は認めなかった。

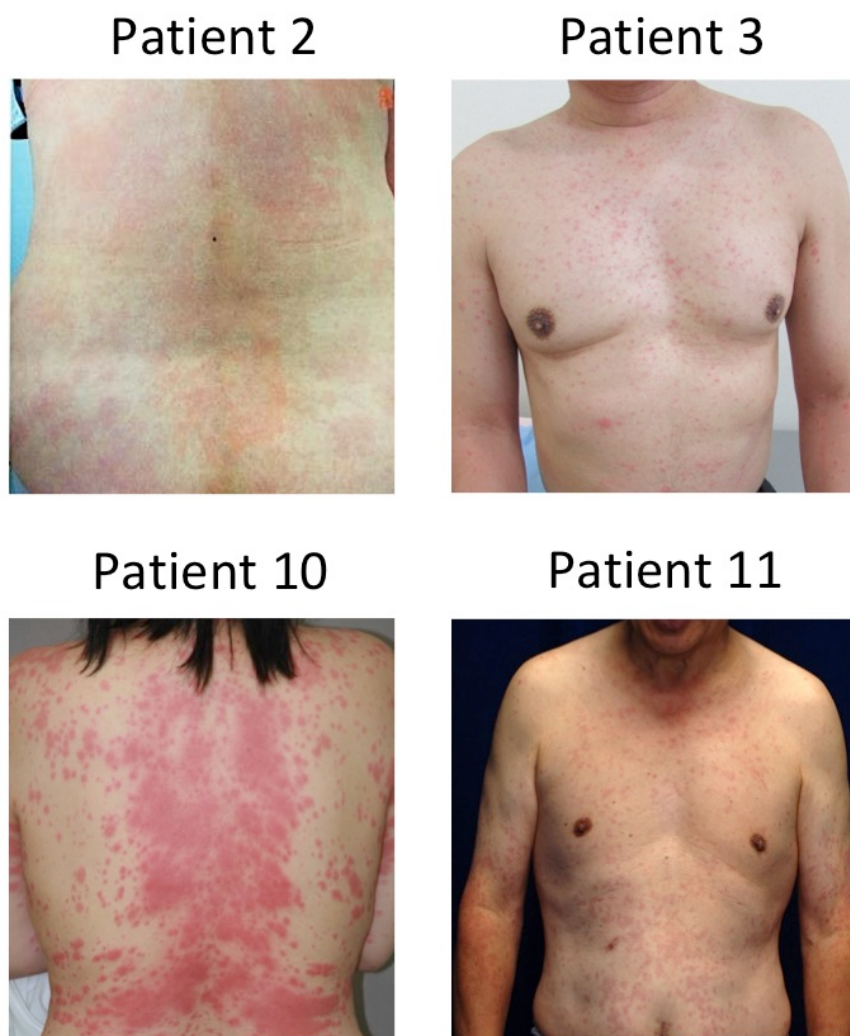


図 7. HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者の臨床像  
躯幹を中心に略全身に浮腫性紅斑を認め一部癒合している (patient 2,10,11)。5-10mm 大の丘疹、紅斑を略全身に認める (patient 3)。

### ③ HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性・陽性の患者皮膚の病理組織像の検討

LTT 陰性例の皮膚病理組織像は表皮真皮境界部に液状変性、真皮浅層にリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤を認めており、LTT 陽性例(薬疹)と比較して明らかな相違は認められなかった。

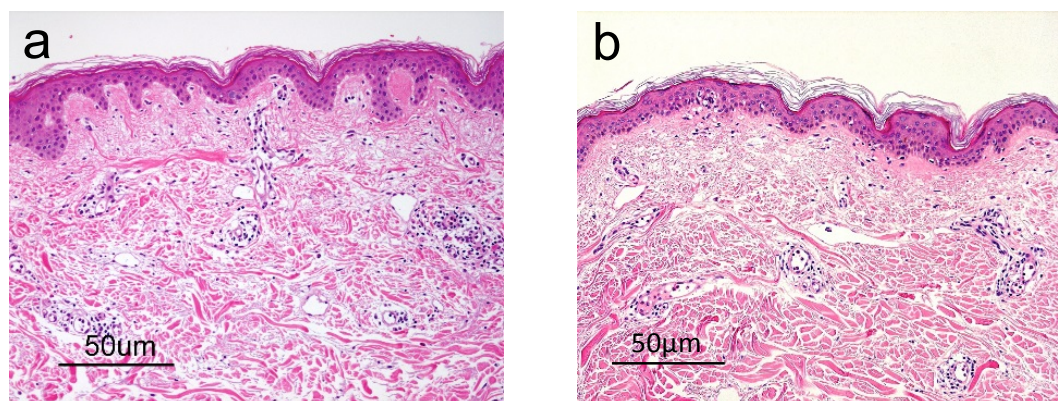
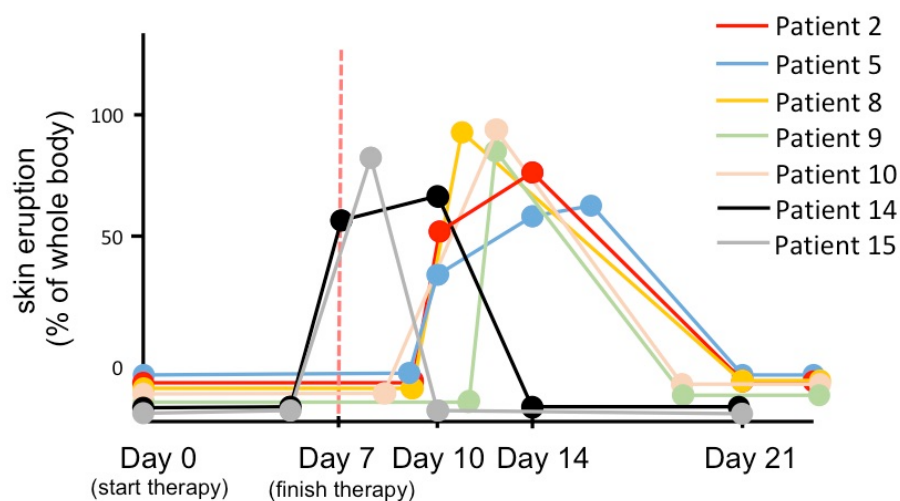


図 8. HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性例と陽性例 (薬疹) の皮膚病理組織像の比較

表皮真皮境界部に軽度の液状変性と真皮血管周囲にリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤を認める。(a) LTT 陰性例、(b) LTT 陽性例 (薬疹)

#### ④ HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性症例の臨床経過

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性であった症例の多くが内服開始から皮疹発症までに 7 日以上要している、つまり、HP 除菌療法内服終了後から皮疹を認めていた。



#### 図 9. HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性症例の臨床経過

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性例では除菌療法終了日 (Day7) 以降に皮疹が出現していた。

## 2. HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者 PBMC に HP を加えた際の培養上清中サイトカインの検討

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者、HP 除菌療法後に皮疹を認めなかった患者、HP 非保菌者から単離した PBMC に HP、*E.coli*、PBS をそれぞれ添加し培養上清中のサイトカインを測定した。HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者において HP を添加した際に他の群と比較して IL-2、IL-4、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  が有意に上昇していた (図 10)。

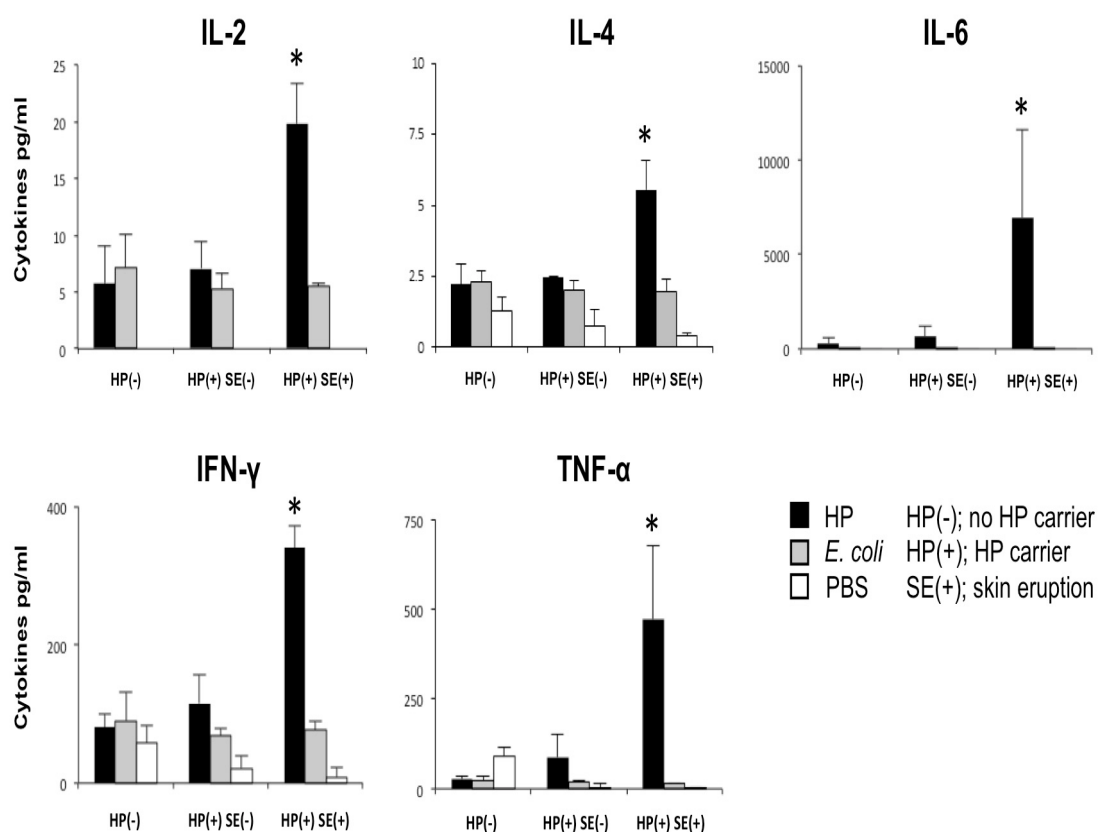


図 10. HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者 PBMC に HP、*E.coli*、PBS を添加した培養上清中のサイトカイン測定

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者において、HP を加えた際に IL-2、IL-4、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  が他の群に比べ有意に上昇する。

IL-2、IL-4、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  は主に effective T 細胞から分泌されることが知られている<sup>42</sup>。上述の結果から HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性の症例において、HP を抗原とした特異的な反応の存在が示唆された。

### 3. HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者 PBMC に HP を添加した際の LST による検討

上述の結果から HP 抗原特異的な反応の存在が示唆されたため lymphocyte stimulation test (LST) を施行した。結果、1 例において HP を加えた際に Stimulation Index (S.I.) が 2.0 以上であり陽性となった。

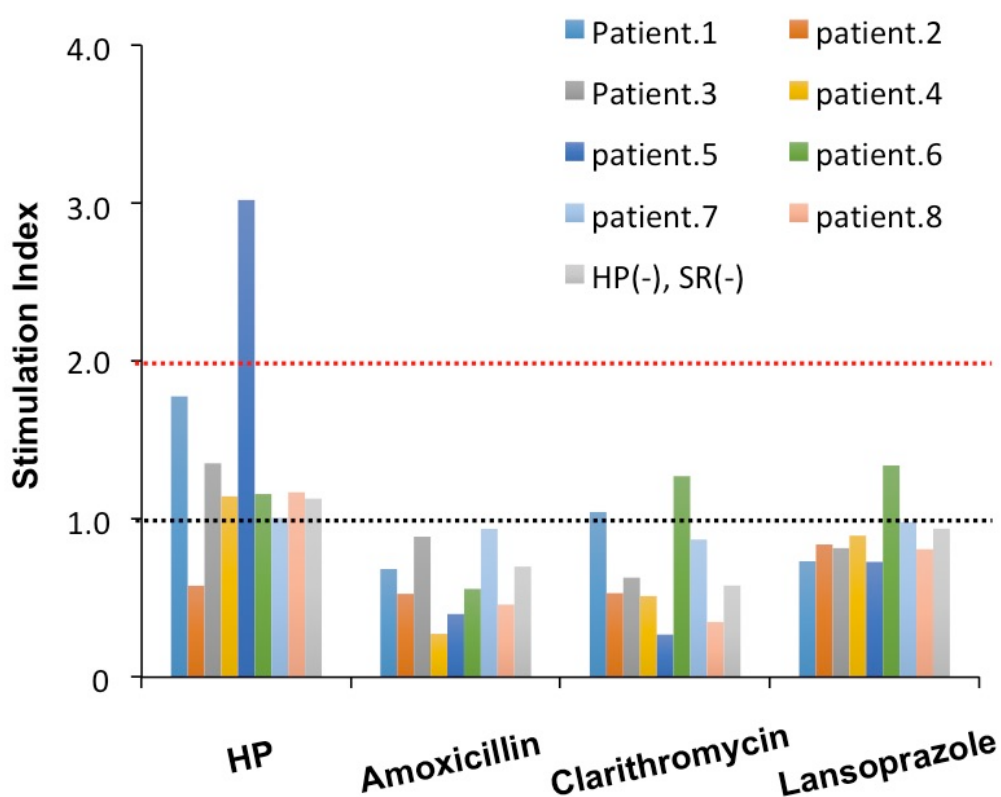


図 11. HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者 PBMC に HP を加えた際の LST

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者 PBMC を用いたところ 1 例 (patient.5) において HP を添加した際に  $SI > 2.0$  と陽性を認める。

### 3. HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者 PBMC に HP を添加した際の ELISpot (IFN- $\gamma$ ) による検討

さらに HP を添加した際の HP 抗原特異的な反応の有無を評価するために ELISpot (IFN- $\gamma$ ) を用いて評価した。結果、1 例 (patient 5) において HP を添加した際に濃度依存性にスポット数の上昇を認めた。しかしながら、除菌療法に使用した薬剤を添加した場合にスポット数の増加を認めなかった。少数ではあるが HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者において、HP を抗原とした特異的な反応の存在が示唆された。

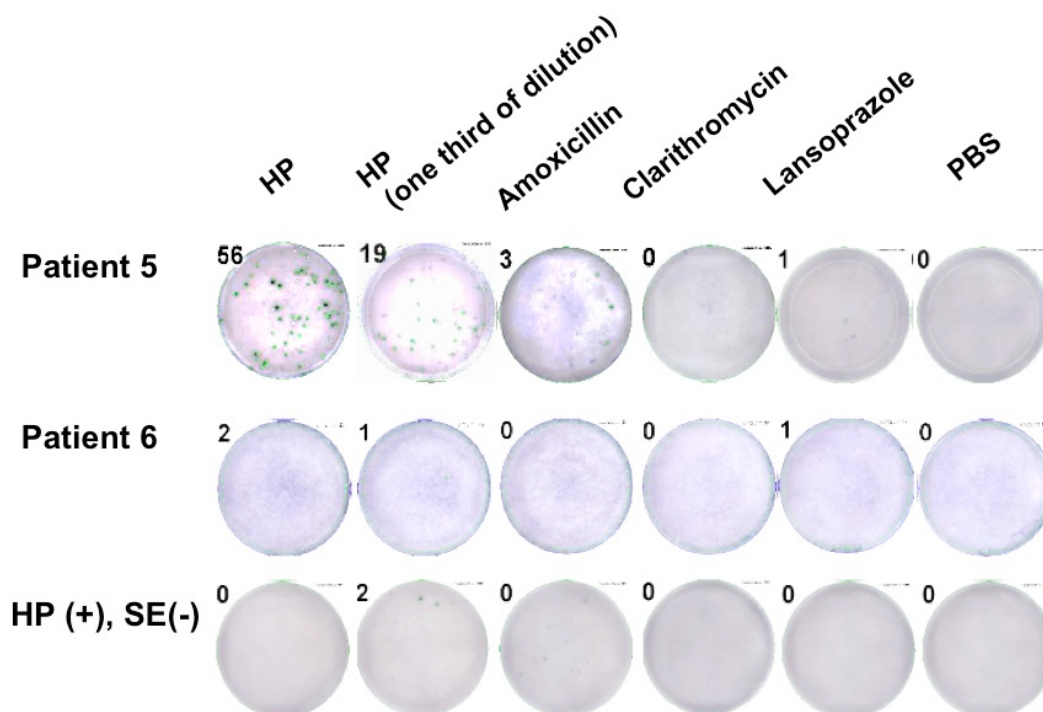


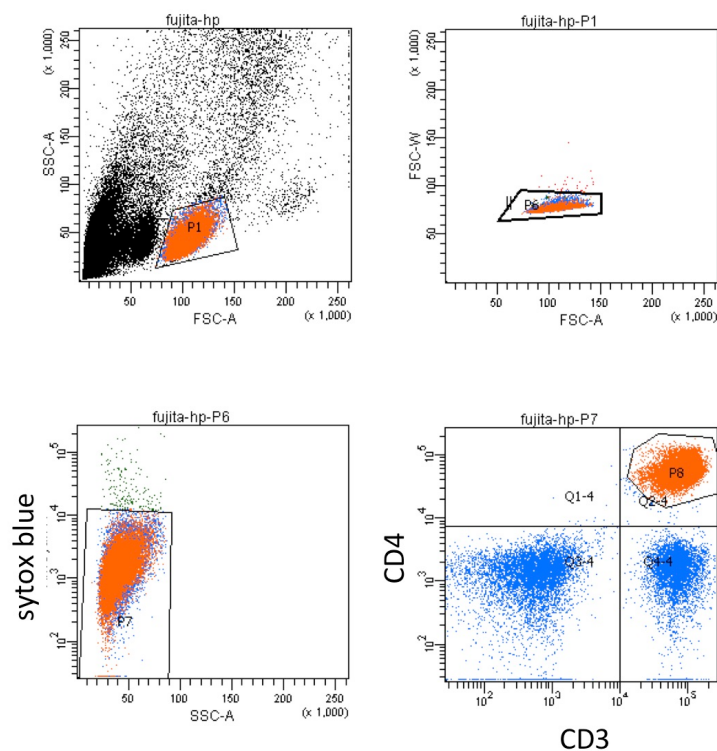
図 12. HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者 PBMC に HP を加えた際の ELISpot

1 例 (patient.5) において、HP を添加した際に濃度依存性にスポット数の増加を認める。

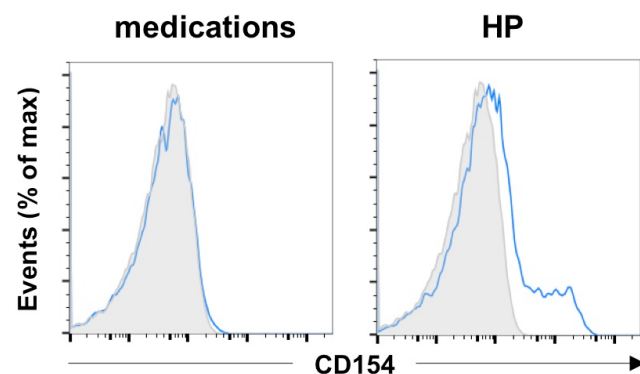
#### 4. フローサイトメトリーを用いた解析

上述したように HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者において、HP を抗原とした特異的な反応の存在を示唆するデータを得たが陽性例が少ないこともあり、より感度の高いフローサイトメトリーを用いて CD154 の発現を評価した<sup>43</sup>。HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性であった患者 PBMC において、HP を加えた際に PBS、薬剤を添加した際に比較して CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合の増加を認めた。

a)



b)



### 図 13. フローサイトメトリーを用いた解析

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者 PBMC に HP、薬剤、PBS (negative control) を添加して培養しフローサイトメトリーにて解析した。a)CD3 陽性 CD4 陽性細胞をゲーティングした。b)HP を加えた際にコントロールに比較して CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合が増加している。しかし、薬剤を加えた際は CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の増加は認めない。

次に HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者 11 名から回収した PBMC を用いて同様の実験を行なった結果を図 14 と表 2 に示す。PBS(ネガティブコントロール)を加えた際に比べ、HP を加えた際に CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合の上昇を有意に認めた。薬剤を加えた 1 例において CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合の増加 (patient.10) を認め、この症例に関しては薬疹と考えた。尚、HP 保菌者で皮疹が出現していない患者に関しては施行していない。また、皮疹の出現時期によって 2 群にわけ同様の解析を行なったところ、皮疹出現が内服終了 3 日後以降の群において HP を添加した際に CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合の増加をより有意に認めた。しかしながら、皮疹出現が内服終了 2 日以内の群においては HP を添加した際と PBS を添加した際の間に有意差は認めなかった。つまり、HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者で、特に内服終了 3 日後以降に皮疹を認めた症例において HP 特異的な反応が生じている可能性が示唆された。

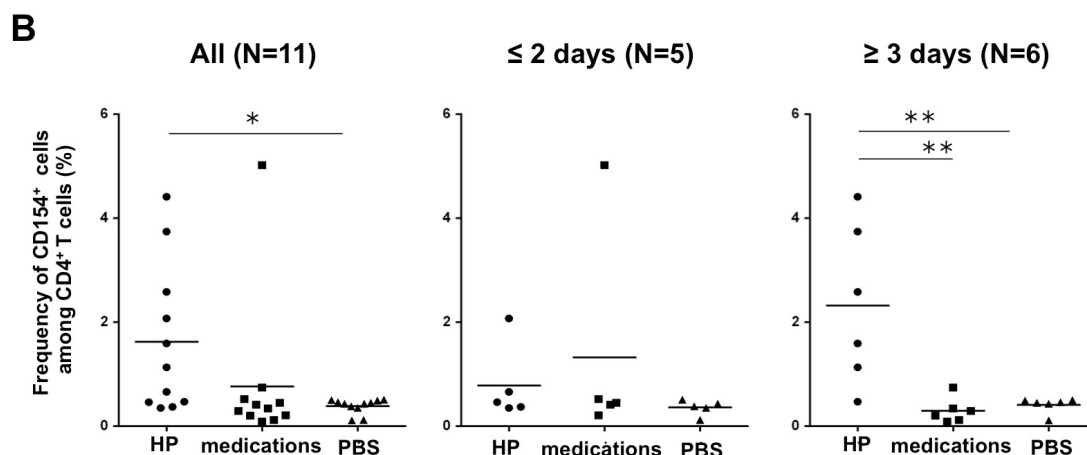


図 14. フローサイトメトリーを用いた CD154 陽性 T 細胞の発現解析

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性であった患者 PBMC 11 例に HP を添加した群は薬剤または PBS を添加した群と比較し CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合が有意な増加を認める。内服終了 3 日後以降に皮疹を認めた患者 PBMC 6 例を用いて検討した際に HP を添加した群でより有意な差を認めた。一方、皮疹出現が内服終了 2 日以内に皮疹を認めた患者 PBMC 5 例においては有意差は認めない。

\*\*P < 0.01, \*\*\*\*P < 0.0001.

|            | Interval from start of treatment to onset (days) | Frequency of CD154+ expression in CD4 + T cells (%) |             |      |
|------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------|------|
|            |                                                  | HP                                                  | Medications | PBS  |
| Patient 1  | 11                                               | 3.85                                                | 0.09        | 0.43 |
| Patient 2  | 10                                               | 2.58                                                | 0.2         | 0.11 |
| Patient 3  | 10                                               | 1.13                                                | 0.34        | 0.5  |
| Patient 4  | 10                                               | 4.41                                                | 0.74        | 0.46 |
| Patient 5  | 10                                               | 1.59                                                | 0.29        | 0.45 |
| Patient 6  | 10                                               | 0.47                                                | 0.12        | 0.49 |
| Patient 7  | 9                                                | 0.37                                                | 0.21        | 0.51 |
| Patient 8  | 9                                                | 0.66                                                | 0.45        | 0.35 |
| Patient 10 | 8                                                | 0.35                                                | 5.02        | 0.12 |
| Patient 14 | 4                                                | 2.07                                                | 0.52        | 0.43 |
| Patient 15 | 4                                                | 0.46                                                | 0.41        | 0.38 |

表 3. フローサイトメトリーを用いた CD154 陽性 T 細胞の発現解析

## 5. HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者血清エクソソーム内における HP 特異的タンパクの検討

上述したように HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者において、HP 特異的な反応の存在が示唆された。次に、この反応を引き起こす抗原が患者血清内に存在するか検討した。近年、HP 保菌胃癌患者の血清エクソソーム内に HP 特異的タンパクの存在が報告されている<sup>9</sup>。そこで本研究において HP 除菌療法に皮疹を認め DLST 陰性患者の皮疹出現時に採取した血清エクソソーム内における HP 特異的なタンパク有無について検討した。すると、HP 非保菌者 (n=5)、HP 除菌療法後に皮疹を認めなかった症例 (n=1) の血清エクソソーム中に HP 特異的なタンパクを認めなかったのに対して、HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者 (n=4) の皮疹出現時に回収した血清エクソソーム全例において HP 特異的なタンパクの存在を認めた。

|            | Time Interval from start of treatment to onset (days) | <i>H. pylori</i> infection | Skin rash | Number of protein    |         |
|------------|-------------------------------------------------------|----------------------------|-----------|----------------------|---------|
|            |                                                       |                            |           | ( <i>H. pylori</i> ) | (Human) |
| Control.1  | -                                                     | -                          | -         | 0                    | 734     |
| Control.2  | -                                                     | -                          | -         | 0                    | 581     |
| Control.3  | -                                                     | -                          | -         | 0                    | 350     |
| Control.4  | -                                                     | -                          | -         | 0                    | 616     |
| Control.5  | -                                                     | -                          | -         | 0                    | 526     |
| Control.6  | -                                                     | +                          | -         | 0                    | 911     |
| Patient.3  | Day 10                                                | +                          | +         | 20                   | 493     |
| Patient.5  | Day 10                                                | +                          | +         | 19                   | 463     |
| Patient.7  | Day 9                                                 | +                          | +         | 18                   | 466     |
| Patient.11 | Day 8                                                 | +                          | +         | 19                   | 438     |

\*+, positive, -, negative

表 4. 超遠心法を用いた HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者血清エクソソーム内における HP 特異的タンパク解析

HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者の皮疹出現時に回収した血清エクソソーム 4 例中 4 例 (100%) において HP 特異的なタンパクの存在を認めた。HP 非保菌者 5 例と HP 除菌療法後に皮疹を認めなかった患

者 1 例の血清エクソソーム中においては HP 特異的なペプチドを認めない。

| ID     | Gene    | Protein                                                     | Sequence                          | Score*         | Patient  |
|--------|---------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------|----------|
| O07025 | flil    | Flagellum-specific ATP synthase                             | LGIFAGSGVGK                       | 20.79          | 3,5,7,11 |
| O24884 | HP_0043 | Mannose-6-phosphate isomerase                               | MVELNAK                           | 49.59          | 3,5,7,11 |
|        |         |                                                             | SVGFLLESLSK                       | 47.30          | 3,5,7,11 |
| O24925 | HP_0099 | Methyl-accepting chemotaxis protein (TlpA)                  | MLETSSNFAKDLANDSANLK<br>SKGLSIGNK | 22.63<br>68.66 | 3<br>3   |
| O24936 | HP_0114 | Uncharacterized protein                                     | MDIYQK                            | 42.12          | 3,5,7,11 |
| O25369 | bamA    | Outer membrane protein assembly factor BamA                 | EASQESQK                          | 39.66          | 3,5,7,11 |
|        |         |                                                             | LDQLEYDSMR                        | 47.19          | 3,5,7,11 |
| O25395 | HP_0686 | Iron(III) dicitrate transport protein (FecA)                | AYSSMLNQAK                        | 51.45          | 3,5,7,11 |
| O25412 | HP_0708 | Uncharacterized protein                                     | INTLEDQK                          | 45.08          | 11       |
|        |         |                                                             | KINTLEDQK                         | 76.22          | 11       |
| O25446 | HP_0750 | Uncharacterized protein                                     | QVASSYQNINTTSYNGPK                | 34.93          | 3,5,7,11 |
| O25466 | HP_0775 | Penta-phosphate guanosine<br>-3-pyrophosphohydrolase (SpoT) | LTEEIENK                          | 66.35          | 3,5,7,11 |
|        |         |                                                             | QVLLNDCCYPK                       | 20.78          | 3,5,7,11 |
|        |         |                                                             | SGDVVKIHK                         | 49.42          | 3,5,7,11 |
|        |         |                                                             | VTPKGGIEILR                       | 38.00          | 3,5,7,11 |
| O25720 | HP_1088 | Transketolase                                               | LSALMKLK                          | 41.65          | 5        |
|        |         |                                                             | VLKGAYVK                          | 27.12          | 5        |
| O25730 | pgl     | 6-phosphogluconolactonase                                   | GYQLFEFENLK                       | 45.66          | 3,5,7,11 |
| O25781 | pgi     | Glucose-6-phosphate isomerase                               | EKIEAMFK                          | 47.08          | 3,5,7,11 |
|        |         |                                                             | RAVLHTALR                         | 8.34           | 3,5,7,11 |
| O25885 | HP_1327 | Uncharacterized protein                                     | ESLVFK                            | 77.91          | 3,5,7,11 |
| O25923 | HP_1371 | Type III restriction enzyme R protein                       | EDLLEELK                          | 48.56          | 3,5,7,11 |
|        |         |                                                             | GGTQIICFIDPKGSK                   | 21.89          | 3,5,7,11 |
| O26038 | HP_1508 | Ferredoxin-like protein                                     | KGLQLECIKLECVDACTITMAK            | 3.24           | 3        |
|        |         |                                                             | LKTIAYMGVIAIVIALAISFK             | 0.71           | 3        |
|        |         |                                                             | RSPENECVNCLHCVQVCPHIDIR           | 0.16           | 3        |
| O34810 | HP_0426 | Uncharacterized protein                                     | SVETIK                            | 70.91          | 3,5,7,11 |
| P48370 | gyrA    | DNA gyrase subunit A                                        | MQDNSVNETK                        | 50.03          | 3,5,7,11 |
| P56013 | rpsF    | 30S ribosomal protein S6                                    | EVEAWHALVDRANKK                   | 35.04          | 3,5,7,11 |
|        |         |                                                             | PSHAKEK                           | 111.04         | 3,5,7,11 |
| P56088 | guaB    | Inosine-5-monophosphate dehydrogenase                       | GLITIK                            | 88.73          | 3,5,7,11 |
| P56157 | dnaE    | DNA polymerase III subunit alpha                            | LGITLK                            | 76.55          | 3,5,7,11 |
| P94846 | uvrB    | UvrABC system protein B                                     | VLLYAK                            | 78.00          | 3,5,7,11 |
| P96786 | fliD    | Flagellar hook-associated protein 2                         | LDEDTR                            | 69.43          | 3,5,7,11 |

\*,Andromeda score for the associated MS/MS spectra.

表 4. HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性であった患者血清  
エクソソーム内において認めた HP 特異的ペプチド

## 6. HP タンパク含有エクソソームを用いた HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者 PBMC における抗原特異的反応の検討

次に、HP 特異的タンパクを含んだエクソソームが HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者 PBMC において CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の増加を引き起こすか検討した。前述した皮疹出現時の患者血清から抽出したエクソソームを回収する方法では血清サンプル量保存量の関係上、抽出量に限界があるため図 15 に示す方法を用いてエクソソームを回収することとした。

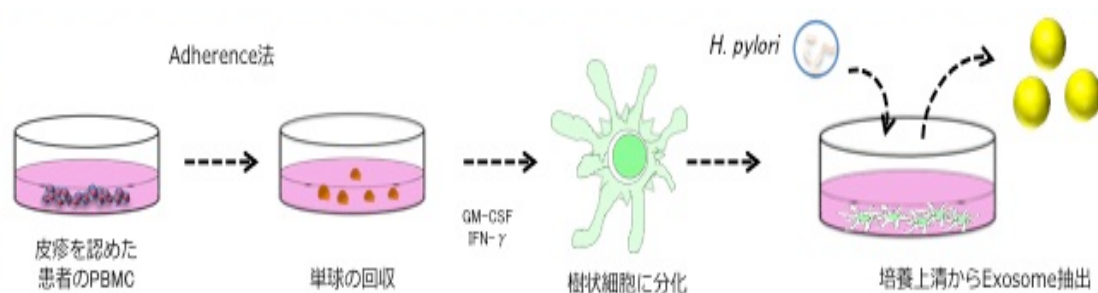


図 15. HP タンパク含有樹状細胞由来エクソソーム抽出方法

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性であった患者から回収した PBMC から adherence 法で単球を回収。GM-CSF、IL-4 を添加し培養する。

### ① HP 添加患者単球由来樹状細胞 (monocyte-derived dendritic cells; MDDC) 培養上清中におけるエクソソームの検討

HP を添加した MDDC 培養上清中からエクソソームを回収し、電子顕微鏡下で確認した (図 16)。またフローサイトメトリーを用いてエクソソームマーカー (CD9、CD81、HLA-DR、HLA-ABC) の発現を確認した。

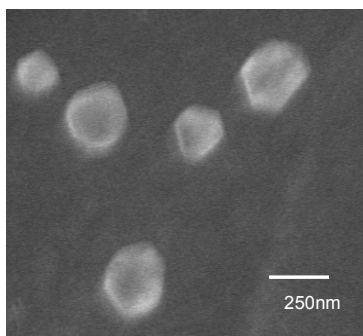


図 16. HP 添加 MDDC 培養上清中エクソソームの走査電子顕微鏡像

超遠心法で回収後、直径約 100-250nm の粒子を認める。

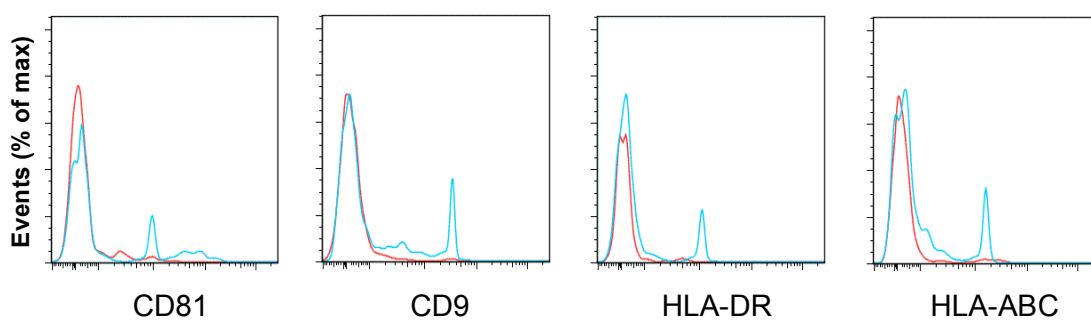


図 17. HP 添加 MDDC 培養上清中エクソソームのフローサイトメトリー解析像

CD9、CD81、HLA-DR、HLA-ABC 陽性を認める（青ヒストグラム；MDDC 由来エクソソーム、赤ヒストグラム；isotype control）。

## ② HP 添加患者 MDDC 培養上清中におけるエクソソームの HP 特異的タンパクの有無の検討

次に、回収した MDDC 由来エクソソーム内に HP 特異的タンパクが存在するかプロテオーム解析を行った（表 5）。MDDC 由来エクソソーム内において HP 特異的なタンパクの存在を確認することができた。

| ID     | Gene    | Protein                                              | Sequence                                                                                                   | Score                                          |
|--------|---------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| O25506 | hup     | DNA-binding protein HU                               | FETAEQK<br>GESVELIGFGK                                                                                     | 100.19<br>116.55                               |
| O25728 | hcpC    | Putative beta-lactamase HcpC                         | YAEGCASLGGIYHDGK                                                                                           | 121.32                                         |
| O25776 | fldA    | Flavodoxin                                           | AIGNAEVVDVAK<br>FVGLVIDEDNQDDLTDER<br>IGIFFGTDSGNAEIAEK<br>TIGLVGLGDQDTYSETFAEGIFHIYEK<br>VVGQTPTDGYHFEASK | 138.24<br>174.19<br>150.70<br>206.00<br>121.99 |
| O25825 | HP_1227 | Cytochrome c-553                                     | IVNMMSEAEIEK                                                                                               | 88.16                                          |
| P0A0R3 | groS    | 10 kDa chaperonin                                    | EHEACCHDHK<br>LEENKTSSGIIIPDNAK<br>TSSGIIIPDNAK                                                            | 257.88<br>77.70<br>99.73                       |
| P21762 | tsaA    | Probable peroxiredoxin                               | APAVLGNNEVDEHFELSK<br>DFTFVCPTEIIAFDK<br>GGIGQVTFPMVADITK                                                  | 54.51<br>73.80<br>92.70                        |
| P43312 | sodB    | Superoxide dismutase [Fe]                            | IEIIQTSNAQTPVTDK<br>SSLFDILTK                                                                              | 152.37<br>105.52                               |
| P52093 | ftnA    | Bacterial non-heme ferritin                          | AYEHEQHISESINNIVDHAIK<br>FEGLTQIFQK<br>LIVFLNENNVPVQLTSISAPEHK                                             | 37.21<br>89.68<br>124.31                       |
| P55834 | rplL    | 50S ribosomal protein L7/L12                         | EGVNKEEAETIKK                                                                                              | 86.94                                          |
| P56003 | tuf     | Elongation factor Tu                                 | ITVELISPALELGTK                                                                                            | 103.67                                         |
| P56112 | HP_0175 | Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase HP_0175 | DSPVTYTYEQAKPTIK<br>FIELANR<br>TALVENEAK                                                                   | 85.99<br>105.39<br>105.98                      |
| P56431 | trxB    | Thioredoxin reductase                                | QVVCAASDGATAALSVISYLEHH                                                                                    | 70.07                                          |
| P66928 | trxA    | Thioredoxin                                          | GVALVDFWAPWCGPCK                                                                                           | 73.83                                          |
| P69996 | ureB    | Urease subunit beta                                  | LGDTDLIAEVEHDYTIYGEELK                                                                                     | 55.05                                          |
| Q48271 | copP    | COP-associated protein                               | SVVVEFDAPATQDLIK                                                                                           | 101.30                                         |
| O24943 | HP_0129 | Uncharacterized protein                              | NLASLSQEDR                                                                                                 | 113.03                                         |
| O25043 | HP_0263 | Adenine specific DNA methyltransferase (Hpaim)       | MKPYFSLEK                                                                                                  | 63.82                                          |
| O25076 | HP_0305 | Uncharacterized protein                              | GVLDLLNFGK                                                                                                 | 123.79                                         |
| O25218 | HP_0472 | Outer membrane protein (Omp11)                       | HGNDLYGLNFK                                                                                                | 123.26                                         |

|        |         |                         |                               |        |
|--------|---------|-------------------------|-------------------------------|--------|
|        |         |                         | LGFVGFANK                     | 119.41 |
|        |         |                         | VYGFLDWFNTSGTEHTK             | 118.70 |
| P77872 | katA    | Catalase                | ADDSDYYTQPGDYR                | 149.35 |
|        |         |                         | DAIKFPDFIHTQK                 | 121.45 |
|        |         |                         | DLFNAIAR                      | 104.44 |
|        |         |                         | EFEVWNWDYR                    | 119.22 |
|        |         |                         | FHFHTMQGVK                    | 144.47 |
|        |         |                         | GPVLLQSTWFLEK                 | 150.11 |
|        |         |                         | GSGAYGTFTVTK                  | 92.86  |
|        |         |                         | HLTNEEAAEVR                   | 108.56 |
|        |         |                         | HMDGFGSHTFSLINAK              | 199.33 |
|        |         |                         | LHDTIGESLAHVTHK               | 188.59 |
|        |         |                         | NPENYFAEVEQAAFSPANVVPGIGYSPDR | 106.56 |
|        |         |                         | YYTEEGNWDLVGNNTPVFFIR         | 157.73 |
| O25423 | HP_0721 | Uncharacterized protein | DHDDKDHDHDEHSDKH              | 206.70 |
|        |         |                         | GNMEDMDDDFGLR                 | 153.39 |
|        |         |                         | KGNMEDMDDDFGLR                | 77.37  |
|        |         |                         | MAGVVAPQDIVDYTK               | 110.35 |
| O34810 | HP_0426 | Uncharacterized protein | MAKIDVELK                     | 64.65  |

\*Andromeda score for the associated MS/MS spectra.

## 図 26. HP 添加患者 MDDC 培養上清中におけるエクソソームのプロテオーム解析結果

HP 添加患者 MDDC 培養上清中エクソソーム内に HP 特異的ペプチドを認める。

### ③ HP 添加患者 MDDC 培養上清中エクソソーム添加患者 PBMC における CD154 陽性 T 細胞の検討

上述したように HP 添加患者 MDDC 培養上清から回収したエクソソーム内に HP 特異的タンパクが存在することを認めた。この回収したエクソソームが実際に HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者 PBMC（エクソソーム抽出に用いた患者と同一患者）において HP 特異的な反応を誘導しているかフローサイトメトリーを用いて検討した。

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性であった患者 5 例中 2 例において PBS または薬剤添加患者 MDDC 培養上清から抽出したエクソソーム EVs (PBS) /EVs (medications) を添加した際に比較して、HP 添加患者 MDDC 培養上清から抽出したエクソソームを添加した患者 PBMC では CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の増加を認めた。

一方、薬剤または PBS 添加患者 MDDC 培養上清から抽出したエクソソーム EVs (PBS) /EVs (medications) 添加した際にいずれの患者 PBMC においても CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞数に変化は認められなかった。以上の結果から、HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者において、HP ペプチドを含有するエクソソーム を介した抗原特異的な反応の存在が示唆された。

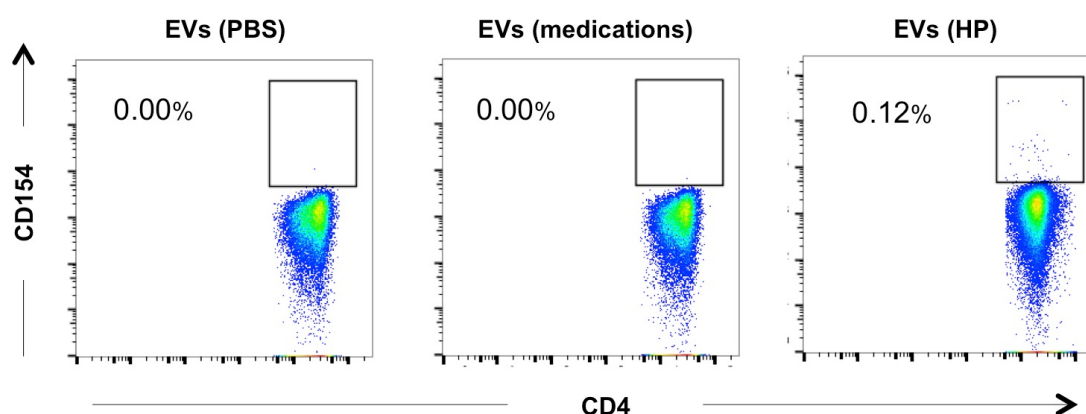


図 18. HP 添加患者 MDDC 培養上清中エクソソームを用いた CD154 陽性 T 細胞の発現解析

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性であった患者から分化させた MDDC に HP、薬剤、PBS (negative control) を添加して培養しフローサイトメトリーにて解析した。a)CD3 陽性 CD4 陽性細胞をゲーティングした。b)HP を加えた際にコントロールに比較して CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の増加を認める。しかし、薬剤を加えた際は

CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の増加は認めない。

|            | Frequency of CD154 <sup>+</sup> expression in CD4 <sup>+</sup> T cells (%) |                   |           |
|------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|
|            | EVs (HP)                                                                   | EVs (medications) | EVs (PBS) |
| Patient 1  | 0.12                                                                       | 0.00              | 0.00      |
| Patient 2  | 0.04                                                                       | 0.02              | 0.00      |
| Patient 5  | 0.02                                                                       | 0.03              | 0.00      |
| Patient 6  | 0.00                                                                       | 0.00              | 0.00      |
| Patient 14 | 0.13                                                                       | 0.03              | 0.00      |

**図 18. HP 添加患者 MDDC 培養上清中エクソソームを用いた CD154 陽性 T 細胞のまとめ**

HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性であった患者 5 例中 2 例において、HP 添加患者 MDDC 培養上清から抽出したエクソソームを添加した際に CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞の増加を認める。

## 考察

本研究において、HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性である症例の一部では、除菌療法に用いられる薬剤による薬疹ではなく、HP に対する抗原特異的な反応によって生じている症例が含まれていることが示唆された。複数の抗原特異的な反応を評価する実験系を用いたところ、HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST が陰性である症例 PBMC に HP を添加した際に抗原特異的な反応を示すことがわかった。興味深いことに HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性症例の皮疹出現時に採取した血清から回収したエクソソーム中において HP ペプチドが存在することを同定した。近年、HP 感染胃癌患者血清エクソソームにおいて HP ペプチドが同定されている<sup>9</sup>。しかし、HP 保菌者における胃以外の臓器障害を引き起こす機序に関与している可能性が示唆されているが詳細な検討は明らかになっていない。また、本研究において先述した回収された患者由来エクソソームを用いて少数例ながら HP 抗原特異的な反応を引き起こすことを示した。これらの結果は、細菌によるアレルギーを同定することで従来薬疹とされ使用が避けられていた薬剤の使用できる可能性をもたらし臨床的に有用性が高いと考える。

薬剤による副作用による皮疹、つまり cADR (cutaneous adverse drug reaction) は体内に摂取された薬剤、あるいは薬剤がハプテンとして血清タンパクなどと結合した薬剤複合体が抗原性を獲得することで抗原特異的な機序を介する<sup>18-20</sup>。cADR は他の薬剤に比べて抗生剤によって生じることが多いこと報告されている<sup>44-46</sup>。原因薬剤を同定することが必要であるが、パッチテストや DLST は確固たる診断方法とはなっていない。原因薬剤同定方法の中においては、内服誘発試験が原因薬剤同定方法として最も有効であるが実臨床では行うことで皮疹を誘発することもあり慎重な検討が必要である<sup>21-27</sup>。したがって、細菌による皮膚反応を伴う症例において DLST とパッチテストの検査は陰性となりうる。一方、病原性細菌が残っており抗生剤によって分解されるならば、内服誘発試験は陽性を呈することが推察される。本研究において、LST、サイトカイン測定、ELISpot (IFN- $\gamma$ )、フローサイトメトリー (CD154 陽性 T 細胞) といった複数の実験系を用いることで、HP 抗原特異的な反応の存在を示した。特にフローサイトメトリーを用いた CD154 陽性 T 細胞の評価では、薬剤と HP を介したアレルギー反応の区別に有用であった。これらの結果は、細菌による

アレルギーを同定することで従来薬疹とされ使用が避けられていた薬剤の使用できる可能性をもたらした臨床的に有用性が高いと考える。

抗生物質による cADR は交差反応性を示す。交差反応には 2 つのタイプがある、すなわちアナフィラキシーを引き起こす IgE 媒介性の即時型過敏症および斑状紅斑および多形性紅斑などの非即時性の皮膚反応をもたらす T 細胞媒介遅延過敏症である。最近の報告では、 $\beta$ -ラクタム系（特にペニシリン）に遅発型過敏反応をもつ患者の 5.5% にイミペネム・シラスタチンに対して遅発型過敏症をもつ交差反応を認めることが報告されている<sup>48</sup>。一方、他の研究においてペニシリンとカルバペネムの間の遅延過敏症において臨床的に有意な交差反応性がなく、すべての被験者で行なったパッチテストと内服誘発試験は陰性であったと報告されている<sup>49</sup>。本研究の結果は、遅延過敏症におけるいくつかの臨床的な「交差反応性」は真の交差反応性ではなく、すなわち抗菌剤によって媒介されることを示唆している。細菌に対する特異的な過敏症を有する個体は抗生物質使用の結果として免疫反応を発症し、時には皮膚発疹を発症しており、したがって DLST などの過敏症の同定を試みる試験において代替の抗生物質に対して陰性である可能性が考えられる。

本研究において患者血清エクソソーム中に HP ペプチドが存在し、特定の免疫反応を誘発する可能性を有することを認めた。この結果は免疫系と腸内細菌との関係を示唆している。HP 保菌者において抗 HP 抗体はしばしば検出される<sup>50-51</sup>。これは死滅した HP (分解された HP) が免疫系によって絶えず吸収、認識されることを示している。今回、我々が認めた現象が生じる理由として HP 除菌療法により分解された大量の HP が小腸にて吸収された結果、血清エクソソーム中の HP 成分の増加し、CD4 陽性 T 細胞を介した免疫反応を誘導するという機序の可能性を考えた。HP は胃において貪食細胞による貪食に対して抵抗性を示す一方、小腸においては形態変化 (coccoid form) をきたし易貪食性を示すことが報告されている<sup>52</sup>。本研究においても HP 保菌者患者血清エクソソームの除菌前後における定量解析を試みたが血清サンプル量に制限があり十分な結果が得られなかった (未掲載データ)。

本研究では、HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性患者血清エクソソーム中の HP ペプチドを同定した。しかし、検出されたペプチドは多岐にわたっており特定のペプチドを患者間で認めることはできなかった。また、cADR の発症機序において HLA ハプロタイプが密接に関連することが知られている<sup>53</sup>。HP 介在性に皮疹を発症した症例に

においても HLA ハプロタイプに依存する可能性があるが、一部の患者（ $n=3$ ）では HLA-ABC または DR の特異的な対立遺伝子は検出されなかった（未掲載データ）。HP 媒介性皮膚発疹症例において HLA 対立遺伝子とペプチドの特異的な組み合わせが存在するか今後の課題である。

最後に、本研究によって HP 除菌療法後に皮疹を認めた患者において、HP 成分を含んだエクソソーム を介した抗原特異的な反応が生じている可能性を示した。本研究で用いた HP 感受性を同定する免疫学的手法は抗生物質過敏症と区別するための有用な手法となりうる。

## 総括および結論

本研究では以下の新知見を得た。

- 1) HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性症例において、HP を介した抗原特異的な免疫反応を認めることを示した。
- 2) HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性症例において、血清エクソソーム 内に HP ペプチドが存在することを示した。
- 3) HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性症例 PBMC において、HP ペプチドを含むエクソソームを介した抗原特異的な免疫反応が誘導されることを示した。

以上から、HP 除菌療法後に皮疹を認め DLST 陰性である症例において、薬剤ではなく HP 特異的な免疫反応が生じており、さらにその反応は HP 成分を含んだエクソソーム を介している可能性を示した。

本研究の結果は、HP 特異的な免疫反応を同定することで従来薬疹と診断され使用が控えられていた薬剤を使用できる可能性をもたらした臨床的に有用性が高いと考え、さらなる機序解明のためにマウスなどを使用した *in vivo* での検討が期待される。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さり多くの御指導と御助言 を賜りました、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 清水宏教授に、そ して直接御指導いただきました北海道大学院医学研究科皮膚科学分野 阿部 理一郎准教授(新潟大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 現教授)に心より感謝いたします。そして本研究に御協力いただきました ピロリ除菌療法後に皮疹を認めました患者さんに深く御礼申し上げます。最後に、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野の教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

## 引用文献

1. Marshall BJ, Warren JR. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1, 1311-1315.
2. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper R. (2001). *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 345, 784-789.
3. Fukase K, Kato M, Kikuchi S, Inoue K, Uemura N, Okamoto S, Terao S, Amagai K, Asaka M, Kikuchi S, Inatsuchi S, Arakawa T, Sakaki N, Kato T, Watanabe Y, Ohara S, Aida S, Iijima K, Nasu J, Doi T, Endo H, Shirai T, Takagi A, Inaba T, Aoyama N, Shirasaka D, Azuma T, Ishihata R, Chiba T, Nishio A, Yazumi S, Kawanami T, Sawada M, Konda Y, Okazaki K, Nakamura T, Komatsu H, Miwa J, Kaise M, Kamoshida T, Yagi K, Sato H, Fuke H, Sone Y, Satoh K, Kihira K, Kawata H, Sugano K, Fujisaki J, Yanaka A, Nakajima S, Nomura H, Mizuno M, Okada H, Furukawa K, Yamazaki Y, Kagaya T, Kasugai K, Joh T, Sasaki M, Harada K, Tsutsumi T, Aoyagi K, Maeda K, Mizumachi S, Suzuki M, Furuta T, Shirai N, Suwaki K, Matsuda M, Satomura Y, Miura M, Takahashi S, Imoto I, Horiki N, Sugiyama A, Kato T, Isomoto H, Murakami K, Fujioka T, Sugihara M, Goto H, Matsui S, Nakayama J, Katsuyama T, Sugiyama T, Haruma K, Tominaga S. (2008). Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label , randomised controlled trial. *Lancet* 372, 392-397.
4. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. (2002). *N Engl J Med* 347, 1175-86.
5. Franceschi F, Tortora A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. (2014). *Helicobacter* 19, 52-58.
6. Goni E, and Franceschi F. (2016). *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Helicobacter* 1, 45-48.
7. Stasi R, Sarpatwari A, Segal JB, Osborn J, Evangelista ML,

- Cooper N, Provan D, Newland A, Amadori S, Bussell JB. (2009). Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review. *Blood* 113, 1231-40.
8. Bohr UR, Annibale B, Franceschi F, Roccarina D, Gasbarrini A. (2015). Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection -- other *Helicobacters*. *Helicobacter* 1, 40-46.
  9. Shimoda A, Ueda K, Nishiumi S, Murata-Kamiya N, Mukai SA, Sawada S, Azuma T, Hatakeyama M, Akiyoshi K. (2016). Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Sci Rep.* 6, 18346.
  10. 市川竜太郎, 伊藤絵里子, 寺尾浩, 福田英三. (2008). ヘリコバクター・ピロリ除菌療法による多形紅斑型薬疹の5例. *日皮会誌* 118, 1527-32.
  11. 福田英嗣, 早乙女敦子, 宇佐美奈央, 加藤景一, 水野久美子, 向井秀樹. (2012). *Helicobacter pylori* 除菌後に皮疹を生じた1例. *皮膚臨床* 8, 613-615.
  12. 平野郁代, 袖本衣代, 八田尚人. (2008). ピロリ菌除菌中に発症した薬疹. *皮膚診療* 30, 499-502.
  13. 吉見宣子, 栗木安弘, 夏秋優, 山西清文. (2009). ヘリコバクター・ピロリ除菌療法による薬疹の4例. 8, 313-317.
  14. 大井三恵子, 種瀬朋美, 石井敏直. (2008). ヘリコバクター・ピロリ除菌療法後に生じたアモキシシリン(パセトシン)による多型滲出性紅斑型薬疹. *J Environ Dermatol.* 2, 375.
  15. Asaka M, Kimura T, Kudo M, Takeda H, Mitani S, Miyazaki T, Miki K, Graham DY. (1992). Relationship of *Helicobacter pylori* to serum pepsinogens in an asymptomatic Japanese population. *Gastroenterology* 102, 760-766.
  16. Bigby M, Jick S, Jick H, Arndt K. (1986). Drug-induced cutaneous reactions. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program on 15,438 consecutive inpatients, 1975 to 1982. *JAMA* 256, 3358-3363.
  17. Bigby M. (2001). Rates of cutaneous reactions to drugs. *Arch Dermatol.* 137, 765-770.
  18. Pichler WJ, Daubner B, Kawabata T. (2011). Drug hypersensitivity: flare-up reactions, cross-reactivity and multiple drug hypersensitivity. *J Dermatol.* 38, 216-221.

19. Kanny G, Pichler W, Morisset M, Franck P, Marie B, Kohler C, Renaudin JM, Beaudouin E, Laudy JS, Moneret-Vautrin DA. (2011). T cell-mediated reactions to iodinated contrast media: evaluation by skin and lymphocyte activation tests. *J Allergy Clin Immunol.* 115, 179–185.
20. Takahashi R, Kano Y, Yamazaki Y, Kimishima M, Mizukawa Y, Shiohara T. (2009). Defective regulatory T cells in patients with severe drug eruptions: timing of the dysfunction is associated with the pathological phenotype and outcome. *J Immunol.* 182, 8071–8079.
21. Barbaud A. (2009). Skin testing in delayed reactions to drugs. *Immunol Allergy Clin North Am.* 29, 517–535.
22. Romano A1, Quarantino D, Di Fonso M, Papa G, Venuti A, Gasbarrini G. (1999). A diagnostic protocol for evaluating nonimmediate reactions to aminopenicillins. *J Allergy Clin Immunol.* 103, 1186–1190.
23. Stejskal VD, Olin RG, Forsbeck M. (1986). The lymphocyte transformation test for diagnosis of drug-induced occupational allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 77, 411–426.
24. Stejskal VD, Olin R, Forsbeck M. (1983). Diagnosis of drug-induced occupational allergy by lymphocyte transformation test. *Dev Toxicol Environ Sci.* 11, 559–562.
25. Nyfeler B, and Pichler WJ. (1997). The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy.* 27, 175–181.
26. Brugnolo F, Annunziato F, Sampognaro S, Campi P, Manfredi M, Matucci A, Blanca M, Romagnani S, Maggi E, Parronchi P. (1999). Highly Th2-skewed cytokine profile of beta-lactam-specific T cells from nonatopic subjects with adverse drug reactions. *J Immunol.* 163, 1053–1059.
27. Schnyder B, and Pichler WJ. (2012). Nonimmediate drug allergy: diagnostic benefit of skin testing and practical approach. *J Allergy Clin Immunol.* 129, 1170–1171.
28. 清水宏. あたらしい皮膚科学(第3版). 中山書店, 東京, 2018
29. 日本ヘリコバクター学会ガイドライン作成委員会編. *H. pylori* 感染の診断と治療のガイドライン 2016年改訂版. 先端医学社, 東京, 2016

30. Li J, Wang LN, Zheng HY. (2013). Jarisch-Herxheimer reaction among syphilis patients in China. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 27, 1304-1307.
31. Morton RS. (1998). *Textbook of Dermatology*. Blackwell Science, London, 1263.
32. Fekade D, Knox K, Hussein K, Melka A, Lalloo DG, Coxon RE, Warrell DA. (1996). Prevention of Jarisch-Herxheimer reactions by treatment with antibodies against tumor necrosis factor alpha. *N Engl J Med.* 335, 311-315.
33. 伊東孝政, 阿部理一郎. (2015). 除菌治療による薬疹. *The GI Forefront.* 10, 130-132.
34. Hood JL, San RS, Wickline SA. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 71, 3792-3801.
35. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2, 569-579.
36. Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. (2002). Indirect activation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol.* 12, 1156-1162.
37. Montecalvo A1, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, Milosevic J, Tkacheva OA, Divito SJ, Jordan R, Lyons-Weiler J, Watkins SC, Morelli AE. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood.* 119:756-766.
38. Pitt JM, Charrier M, Viaud S, André F, Besse B, Chaput N, Zitvogel L. (2014). Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol.* 193, 1006-11.
39. Pitt JM, Kroemer G, Zitvogel L. (2016). Extracellular vesicles: masters of intercellular communication and potential clinical interventions. *J Clin Invest.* 126, 1139-1143.
40. Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. (2008). Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res.* 7, 731-740.
41. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V, Mann M. (2011). Andromeda: a peptide search engine

- integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res.* 10, 1794-1805.
42. Zhu J, and Paul WE. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 112, 1557-1569.
  43. Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, Thiel A. (2005). Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med.* 11, 1118-11124.
  44. Bigby M, Jick S, Jick H, Arndt K. (1986). Drug-induced cutaneous reactions. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program on 15,438 consecutive inpatients, 1975 to 1982. *JAMA* 256, 3358-3363.
  45. Roujeau JC. (2005). Clinical heterogeneity of drug hypersensitivity. *Toxicology.* 209, 123-129.
  46. Arden-Jones and HY Lee. Benign Cutaneous Adverse Reaction. In: Griffiths CE, Barker JN, Bleiker T, et al. (2016). *Rook's textbook of Dermatology.* 9th ed. Oxford, England: Willy-Blackwell 181, 1-2.
  47. Riedl MA, and Casillas AM. (2003). Adverse Drug Reactions. *Am Fam Physician.* 68, 1781-90.
  48. Schiavino D, Nucera E, Lombardo C, Decinti M, Pascolini L, Altomonte G, Buonomo A, Patriarca G. (2008). Cross-reactivity and tolerability of imipenem in patients with delayed-type, cell-mediated hypersensitivity to beta-lactams. *Allergy.* 64, 1644-1648.
  49. Romano A, Gaeta F, Valluzzi RL, Alonzi C, Maggioletti M, Zaffiro A, Caruso C, Quarantino D. (2013). Absence of cross-reactivity to carbapenems in patients with delayed hypersensitivity to penicillins. *Allergy* 68, 1618-1621.
  50. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ, European Helicobacter Study Group. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut.* 61, 646-664.
  51. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. Chey WD, Wong BC. (2007). Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol.* 102,

1808-1825.

52. Nagai S, Mimuro H, Yamada T, Baba Y, Moro K, Nochi T, Kiyono H, Suzuki T, Sasakawa C, Koyasu S. (2007). Role of Peyer's patches in the induction of *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104, 8971-8976.
53. Chung WH, and Wang CW DR. (2016). Severe cutaneous adverse drug reactions. *J Dermatol*.43, 758-766.