

カインは IFN- γ を除いて減少した。

- 2) B6 マウスに RS ウイルスの経鼻接種を行ったところ、一過性の RS ウイルスの鼻粘膜での増殖がみられ、ヒスタミンに対する鼻粘膜過敏性亢進も一過性に認められた。OVA で感作を行った鼻アレルギーモデルマウスでは、RS ウイルスの経鼻接種によりその後の OVA 誘発に対する症状の増強とヒスタミンに対する過敏性の著しい亢進が認められた (図 2)。NK-1/NK-2 受容体拮抗薬の投与は好酸球数には有意な影響を与えられなかったものの、OVA やヒスタミンに対する鼻粘膜過敏反応は著しく減少させた。
- 3) アンケート回収した 233 名中喘息合併児は 86 名、アレルギー性鼻炎の合併は 121 名に認められた。術後 1 年の検討で、発熱回数の減少、かぜ罹患の減少、学校欠席日の減少といった上気道炎の改善は 70% 以上にみられ、いびき改善も約 70% に認められた。一方、アレルギー性鼻炎合併児ではくしゃみ、鼻汁、鼻づまりといった症状が 40-50% で 1 年以内に認められた (図 1)。
- 4) 小児舌下免疫治療にはハウスダスト通年性アレルギー性鼻炎患児 14 名、スギ花粉症患者 19 名、共に合併している 15 名の計 48 名が参加し、これまで 1 年半投与を続けたが、15 名に湿疹、口のかゆみ、痛みといった grade 2 以下の有害事象が認められた。1 名のみアトピー性皮膚炎悪化との関連が疑われ、投与を中止した (表 1)。臨床効果はオープン試験であり、スギ花粉症での評価は困難ではあるが、ハウスダスト通年性アレルギー性鼻炎では半数で症状に改善以上の効果が認められている。
- 5) 成人スギ花粉症に対する二重盲検試験では、実薬群 2 名、偽薬群 2 名で脱落がみられた。しかし grade 2 を超える有害事象は 1 例も認められなかった。本年のスギ花粉飛散シーズンでの臨床症状に関しては、症状-薬物スコアでも部分的な有意差がみられたが、免疫学的パラメーターとして血清中のスギ特異的 IgG、IgE 抗体の変動に実薬群、偽薬群で差は認められなかったが、スギ特異的 IgG4 抗体は実薬群で有意に高値を呈していた。スギ特異的 Th2 クローンサイズは偽薬群では花粉飛散前後で 1.7 倍の増加がみられたが、実薬群では 0.92 倍と花粉飛散によるクローンサイズの増大を抑制していた (図 2)。

D. 考察

鼻粘膜へのウイルス感染により、過敏性の亢進が引き起こされる。この機序として、鼻粘膜上皮細胞障害以外に、炎症性サイトカイン、さらに神経ペプチド受容体が大きく関与する可能性がある。好酸球はウイルス排除に作用するものの鼻粘膜過敏性への関与はマウスの実験モデルでは明らかではなかった。

小児扁桃中には RS ウイルスやインフルエンザウイルスに対するメモリー T 細胞の存在が比較的高い割合で認められた。血中にはこのウイルス特異的メモリー T 細胞は少なく、特に RS ウイルスでは検出限界以下であった。一方で調節性 T 細胞の存在も末梢血中には検出出来ないが、扁桃にはその存在も確認された。このことは扁桃での過剰な免疫応答に抑制的に作用していることが推察された。

一方、アレルギー性鼻炎合併の小児では扁桃摘出より 1 年以内にその約 40% の小児でアレルギー性鼻炎の症状の改善がみられた。5 年経過した小児でも 30% 前後に改善がみられた。小児アレルギー性鼻炎の自然寛解、自然改善は少ないためこれら症状の改善は扁桃摘出に負うところが大きい。喘息合併児では 1 年以内 80% が改善している。機序として上気道炎症状の改善が 70% に認められており、上気道炎罹患の減少が喘息やアレルギー性鼻炎の症状改善に働いていると推測される。

小児のスギ花粉症、ハウスダスト通年性アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法の安全性が示された。有効性、作用機序を明らかにするため、成人スギ花粉症患者を対象とした二重盲検試験を併せて行った。8 ヶ月間の投与ではあったが、grade 2 を超える有害事象はなく、また症状スコアで実薬群に改善がみられた。敏感に抗原曝露に応答するスギ特異的 T 細胞クローンを測定すると、本年の少量スギ飛散数でもスギ特異的 Th2 細胞クローンは飛散後に偽薬群では増加が認められた。しかし、実薬投与群ではこの Th2 細胞のクローンサイズの増加が抑制されていた。スギ特異的 IgG4 抗体の増加と相まって、スギ特異的 Th2 細胞クローンサイズへの影響は、舌下免疫療法の有効性を示すバイオマーカーとなることが期待される。

E. 結論

- 1) 鼻粘膜へのウイルス感染は過敏性亢進を引き起こすが、特に感作を受けている鼻粘膜では著しい亢進が生じる。
- 2) 扁桃にはウイルスに対して高い CTL の誘導に作用したり、アレルゲンに対する Th2 細胞と同時に

過剰な免疫反応を抑制する調節性T細胞が多数存在している。

- 3) 扁桃摘出は小児アレルギー性鼻炎の症状改善に作用する。
- 4) 舌下免疫療法は小児に対しても安全性が高く、有効性が期待される。有効性を示すバイオマーカーとして、特異的IgG4の上昇、特異的Th2細胞クローンの変化が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Okamoto.Y., Matsuzaki.Z., Matsuoka.T., Horiguchi.S.: Influence of viral infection on the development of nasal hypersensitivity. *Clinical and Experimental Allergy*.35: 679-684, 2005.
- Horiguchi.S., Okamoto.Y.: Role of T cells in allergic rhinitis. *Clinical and Experimental Allergy reviews*. 5: 64-67, 2005.
- Okamoto.Y., Sakurai.D., Horiguchi.S.: Allergic rhinitis in children: environmental factors. *Clinical and Experimental Allergy reviews* 4:9-14,2004.
- Horiguchi.S., Okamoto.Y., Chazono.H., Sakurai.D.: Expression of membrane-bound CD23 in nasal B cells from patients with perennial allergic rhinitis. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*.94: 286-291, 2005.
- Yokoo.E., Yatomi.Y., Takafuta.T., Osada.M., Okamoto.Y., Ozaki.Y.: Sphingosine 1-phosphate inhibits migration of RBL-2H3 cells via SIP2: cross-talk between platelets and mast cells. *The Journal of Biochemistry* 135: 673-681,2004
- 岡本美孝,堀口茂俊,櫻井大樹: Th1/Th2 バランスとアレルギー疾患. *Animus*34:26-29,2004.
- 岡本美孝: アレルギー性鼻炎治療ガイドラインについて *medicina* 41:364-365,2004.
- 岡本美孝: 花粉症はなぜ増えているのか(環境要因). *からだの科学* 235:28-31,2004.
- 岡本美孝: 鼻内の強い花粉症症例への対応. *臨床医* 30:172-173,2004.
- 岡本美孝: 急性・慢性副鼻腔炎. *治療* 86:837-840,2004
- 茶菌英明: 小児の花粉症. *からだの科学*235,60-61,2004.
- 岡本美孝: アレルギー性鼻炎・花粉症と抗アレルギー薬. *アレルギー・免疫*.12,168-172,2005.
- 堀口茂俊: メモリー・キラーT細胞の非リンパ組織局在の機序. *臨床免疫* 43(1):97-101,2005
- 堀口茂俊: 急性感染症が上気道・下気道の慢性炎症に及ぼす影響. *アレルギー科* 21:135-139, 2006
- 國井直樹, 留守卓也: 上気道感染とアレルギー性鼻炎. *医学のあゆみ* 216:401-405, 2006
- 留守卓也, 堀口茂俊: 上気道感染から見た下気道アレルギー. *Topics in Atopy* 4:9-13, 2005
- 岡本美孝: 免疫療法の改良アプローチ 特に舌下減感作療法について. *アレルギーの臨床*. 243: 41-47, 2006.
- 岡本美孝: 花粉症に備える一減感作療法. *メディカル朝日* 1号, 2006.

2. 学会発表

- 岡本美孝: 鼻アレルギーの研究の最近の進歩(教育セミナー),第54回日本アレルギー学会総会(東京,2004.11)
- 大川 徹, 小林皇一, 茶菌英明, 堀口茂俊, 岡本美孝: 花粉症に対する抗ヒスタミン薬と点鼻ステロイド薬併用療法の検討, 第54回日本アレルギー学会総会, 東京,2004.11
- 岡本美孝: ガイドラインにおけるステロイド点鼻薬の将来展望-ARIAガイドラインから-, 第23回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(岡山,2005.3)
- 堀口茂俊: Th1/Th2バランスからみた鼻アレルギー 第16回日本アレルギー学会春期臨床大会教育セミナー, 2004年5月,前橋
- 留守卓也, 堀口茂俊, 茶菌英明, 岡本美孝: 扁桃におけるウイルス特異的T細胞の検討, 第17回日本口腔・咽頭科学会, 2004年9月, 神戸
- 堀口茂俊: 鼻アレルギー病態形成因子と治療戦略ミT細胞の検討から- 第43回日本鼻科学会基礎問題研究会シンポジウム, 2004年9月,東京
- 堀口茂俊, 茶菌英明, 留守卓也, 岡本美孝: スギ花粉症患者のメモリー維持に関する検討 第54回日本アレルギー学会総会, 2004年11月,横浜
- 堀口茂俊:スギ花粉症患者のメモリー維持に関する検討 第23回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2005年3月,岡山
- 留守卓也, 堀口茂俊, 工藤典代, 岡本美孝: 扁桃摘出が気道アレルギーに及ぼす影響について. 第18回日本口腔咽頭学会, 2005年9月, 旭川
- 堀口茂俊, 岡本美孝, 留守卓也, 工藤典代: 急性感染症が上気道/下気道の慢性炎症に及ぼす影響. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会(シンポ

ジウム), 2005年6月, 岡山

- ・岡本美孝:アレルギー性鼻炎の現状と今後の治療.
第56回日本アレルギー学会秋季大会 教育セミナー, 平成18年11月, 東京.

・

G. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

図 1

卵白アルブミン感作マウスへのRSウイルス感染実験

8weeks old male BL/6 mice

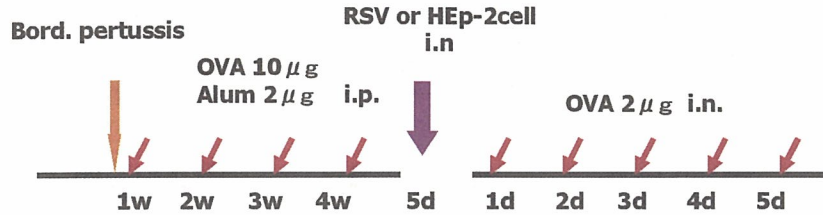
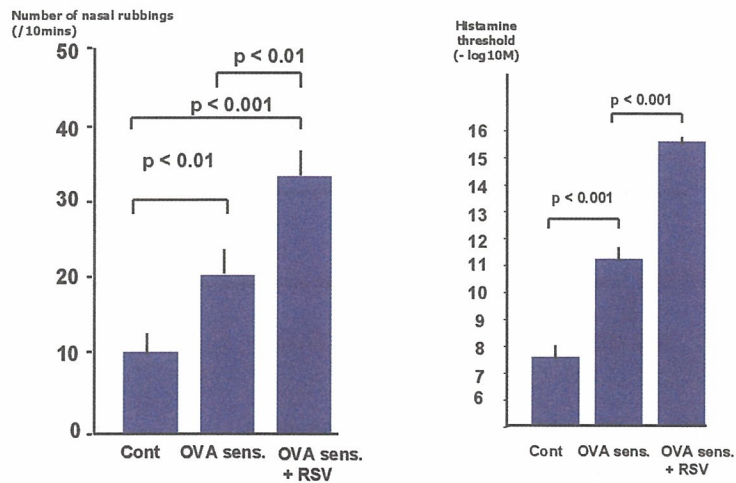


図 2 OVA鼻内誘発後の鼻かき発作数

鼻かき発作を誘導するヒスタミン閾値



→スギ花粉症患者対象;

2~4月に定期的鼻内ウイルス,細菌検査施行中

図3

鼻アレルギー児の鼻症状の術後変化

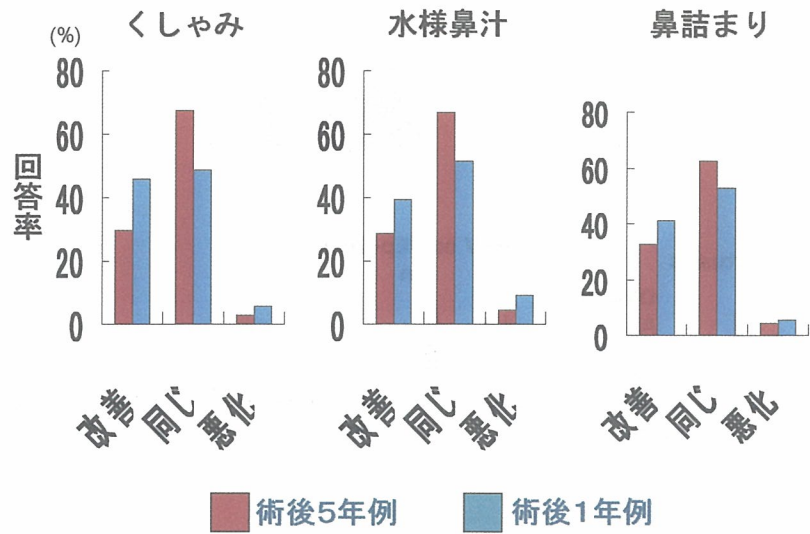
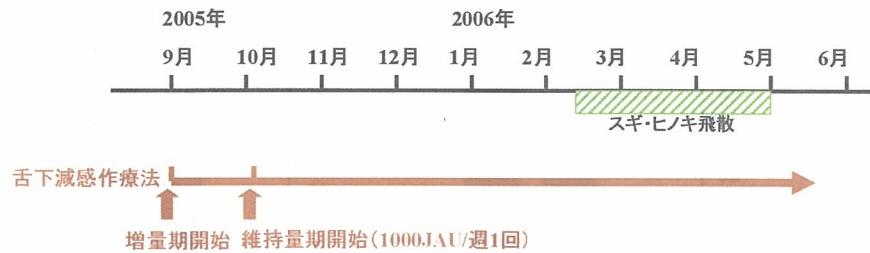


図4

スギ舌下減感作療法(6ヶ月二重盲検試験, 吐き出し法)

同一花粉飛散数地域(千葉市)で実施

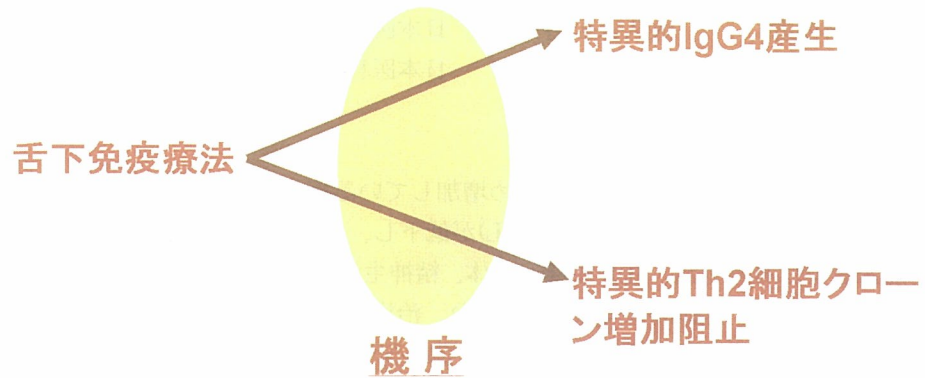
実薬群 42名 偽薬群 21名



【評価項目】: 安全性、有効性、作用機序の解明

- ・アレルギー日記
- ・血清Cry j 特異的 IgG, IgG4
- ・副作用
- ・スギ抗原特異的IL-4, IL-5, IFN- γ 産生T細胞数
- ・血清IgE

図5



- ・小児アレルギー性鼻炎患者で二重盲検試験進行中
- ・有効性の評価と機序解明を目指す

表1

小児舌下減感作療法：
44症例1年半での有害事象疑い例

症例No	舌下	時期	有害事象
7・男	スギ	増量期	量が多いと苦い
7・男	スギ	増量期	たびたび口の中が痒くなる
7・男	HD	維持期	喘息発作出現も因果関係なし
8・女	スギ	増量期	腕と顔に紅斑が出現(因果関係明)
9・男	HD	増量期	全身に痒み(アトピー性皮膚炎合併)
11・男	HD	増量期	腹痛(因果関係不明)
13・女	スギ	増量期	口の中が少しピリピリ
14・男	HD	増量期	右肘窩の痛み(因果関係不明)
17・男	HD・スギ	増量期	朝じんま疹、その後舌下施行。学校から帰宅後増悪(因果関係明)
20・男	スギ	増量期	口の中が白くなった(因果関係明)

小児アレルギー性鼻炎の成人への移行を阻止するための治療法の確立に関する研究 小児アレルギー性鼻炎に対する免疫療法の治療的・予防的効果の検証

分担研究者 大久保公裕 日本医科大学耳鼻咽喉科助教授
後藤 穰 日本医科大学千葉北総病院耳鼻咽喉科講師

研究要旨

小児アレルギー性鼻炎は小児花粉症を含め増加している疾患であるが、その実際の報告は少ない。3年間の検討で我々ほどのように Quality of Life (QOL)が低下し、治療が行われているかなどの検討をまず行った。成人での花粉症患者では日常生活、社会生活、身体、精神生活の QOL が低下した。しかし小児では、日常生活で悪化しているのみであり、全体的な QOL が保たれ、治療法では抗ヒスタミン薬の投与が多かった。また我々は小児でのアレルギー性鼻炎の自然経過を修飾するであろう抗原特異的免疫療法 (Ag-IT; 減感作療法) が 2005 年のスギ花粉の大量飛散年の症状と 2004 年と 2006 年の少量飛散年でどのように症状を抑制していたか、16 歳以上と 15 歳以下で比較検討した。その結果は 16 歳以上より 15 歳以下の群が Ag-IT の効果が高かった。いずれの年も軽症以下で納まりさらに薬剤の服用を必要とする症例は小児において少なかった。

小児のアレルギー性鼻炎をはじめとするアレルギー疾患の増加が衛生仮説で説明されている現在、Th1 変換機能を有するプロバイオティクスの効果を知ることは重要である。我々はある種の乳酸菌がマウスのスギ花粉誘発アレルギー反応を抑制することを検討した。その結果、スギ花粉特異的な好酸球の浸潤を抑制した。次にスギ花粉症患者に乳酸菌菌体粉末を毎日服用させるランダム化プラセボ対照比較試験を行った。乳酸菌摂取群ではプラセボ群より症状スコア、鼻や眼症状スコアは全体的に低値で推移する傾向にあった。今後症状抑制はもとより発症予防としてのプロバイオティクスの基礎的・臨床的検討がさらに重要である。

A. 研究目的

アレルギー性鼻炎は I 型アレルギーの典型的な疾患であり、現在では厚生省の定める生活習慣病としての慢性疾患でもある。治癒が難しいかわりに、重症化しても QOL の低下を生じるのみで死亡原因となりえない。成人では日本アレルギー性鼻炎標準調査票がその QOL を把握するため用いられているが、小児ではその専用の調査票がないのが現状である。小児のアレルギー疾患が今後どのように変化するかを知るためには専用の調査票がどうしても必要である。今回我々は初めて、小児花粉症を含む小児アレルギー性鼻炎の QOL についてインターネットを用いて評価を試みた。またアレルギー性鼻炎は国際的に増加している疾患である。特に小児では顕著で、日本でも小児におけるスギ花粉症の低年齢発症などが問題となってきている。現在のアレルギー性鼻炎治療の主体は薬物療法であるが、これは単に症状を抑える対症療法にすぎなく、アレルギー歴の経過を修飾するものではない。アレルギー性鼻炎の根本治療は疾患が純粋な I 型アレルギーであるがゆえに、抗原特異的免疫療法 (Ag-IT) しかない。Ag-IT によって経年的に症状が抑制されることが日本の奥田稔と英国の Durham SR により報告され、根治的治療法であることが確認された。またさらに小児におい

て、喘息の発症を抑制し、アレルギー自然史の修飾も可能であることが Moller A らによって報告された。ランダム化され、Ag-IT を行った群と行わなかった群を 3 年後まで調査したものである。に Ag-IT 群は Ag-IT をしなかった群と比較してオッズ比 2.52 で有意に喘息なった比率が少なかったという報告である。しかしアナフィラキシーなどの副作用の問題から日本ではあまり一般的には行われていないのが現状である。特に 15 歳以下の小児ではアナフィラキシー副作用がより生じやすいことも報告されている。我々の教室では以前より Ag-IT を行っているが、本当に小児に対して高い効果を上げているか 2004 年から 2006 年までの花粉症に対する Ag-IT の効果を検証する。

近年、小児においては衛生仮説を源にしたアレルギーの発症増加が注目されている。現在、小児の衛生が良くなったためにアレルギー疾患の有病率が増加したとする報告が散在される。細菌への適度な接触がなくなり、本来の Th1 からアレルギーの免疫を修飾する Th2 にシフトされているというものである。そこでこの衛生仮説から注目されているプロバイオティクスの花粉症の症状に与える研究を行った。ある種の乳酸菌を取り上げ 2006 年スギ花粉飛散期に

花粉症患者に二重盲検比較試験を行ったのでその結果を報告する。

B. 方法

①インターネットを用いて小児アレルギー性鼻炎の QOL がどの程度障害されているかを調査した。使用した調査票はアレルギー協会での特別調査から開発された日本アレルギー性鼻炎標準 QOL 調査票であり、インターネットによって調査を行った。

②小児に対して免疫療法が予防的な有効性を持ったかどうかを検討した。1996年から2000年に当科でアレルギー検査を行った15歳以下の小児でハウスダスト抗原のみ陽性であった喘息のない症例(n=152)に対して質問票により鼻以外のアレルギーが発症したかどうかについて質問票を郵送した。

③スギ花粉症に対する Ag-IT の効果を成人(16歳以上)と小児(15歳以下)で検討した。Ag-IT を行っているそれぞれの対象について2004年から2006年までスギ花粉症の重症度を比較検討した。その年度の最高の重症度が軽症以下を有効として判定した。この有効群をさらに薬剤の服用日数でわけ、評価した。

④BALB/c マウスにスギ花粉抽出抗原液(合計 Cry j 1.04 µg/ml 含有)を皮下に投与し、抗原感作を行った。20日目にスギ花粉エキス(Cry j0.04 µg 含有)を腹腔内投与して腹腔内への好酸球遊走を誘発した。乳酸菌あるいはプラセボを21日間毎日、強制胃内投与した。腹腔内の洗浄細胞を回収しその中の好酸球数を計測した。

⑤2006年スギ花粉飛散季節にスギ花粉症患者(27名)に乳酸菌菌体粉末を1日750mg毎日服用させる試験を行った。プラセボを対照とし、被験者はランダムに振り分けられ、花粉症期間中の症状を比較検討した。

C. 結果

①QOL 調査票 I での症状(水っぱな、くしゃみ、鼻づまり、鼻のかゆみ、目のかゆみ、涙目)どの項目をとっても成人と小児の間では有意な差が認められなかった。また QOL を評価する標準調査票 II でも差は認められなかった。小児では日常生活で悪化している傾向があった。どの QOL の領域でも「ややひどい」以上の率は成人より有意に低い率であったが、特に精神生活の領域では成人と比較し、軽いことが分かった。小児の医療機関への受診率は55.5%で、成人の47.4%より高かった。これは結果的には症状が同じでも小児と成人ではその QOL の程度に違いがあるという事を示した。しかし一方では小児の本当の QOL を評価できたのか疑問も残る。

②63症例の返送があり、A群(免疫療法非施行)15症例、B群(1年未満の免疫療法)17例、C群(1年以上2年未満の免疫療法)20症例、D群(2年以上の免疫療法)11症例であった。そのデータから通年性アレルギー性鼻炎の症状の寛解率はA群20%、B群24%、C群40%、D群55%だった。スギ発症率はA群60%、B群50%、C群35%、D群36%であった。喘息発症はA群13%、B群18%、C群15%、D群18%であり、喘息発症抑制における免疫療法の有用性は少なかった。

③スギ花粉症では16歳以上より15歳以下の群が免疫療法法の効果が高かった。季節を通じて軽症以下の症状で収まった有効症例で薬剤の服用なしでは2004年では成人60%、小児83%、2005年では成人26%、小児38%、2006年では成人58%、小児62%でいずれの年も小児で薬剤の服用を必要とする症例は少なかった。花粉飛散数が多いと薬物の併用率が高まることも明らかになった。

④乳酸菌を投与した群ではどの投与量においても対照群と比較して好酸球比率は有意に抑制された。好酸球増多抑制率は約44%であった。

⑤乳酸菌摂取群ではプラセボ群より症状スコアは全体的に低値で推移する傾向にあった。これは鼻症状、眼症状とも同様で、有意差のある日も認められた。患者の印象も乳酸菌群で良好であったが、バイオマーカーでは差が認められなかった。

D. 考察

小児アレルギー性鼻炎は小児花粉症を含め増加している疾患であるが、その実際の報告は少ない。小児アレルギー性鼻炎は花粉症を含め QOL が低下していた。小児では、日常生活が悪化した。全体的な QOL が保たれ、治療法では抗ヒスタミン薬の投与が多かった。その悪化は成人よりは軽度であるが、とても悪化していることを訴える症例もあり、さらに成人より自然寛解が少ないのでこれからの管理・治療が必要である。アレルギー性鼻炎や花粉症を含むアレルギー疾患を治癒させる可能性があるのは Ag-IT のみである。その作用メカニズムから特にアレルギー性鼻炎では症状に対する抗原特異性が高いほど効果も高いと考えられる。今回の結果は小児においてはより Ag-IT の効果が高く、小児では他の環境因子やタバコなどによる非特異性過敏性亢進などで修飾された成人よりも高いことが分る。論文から Ag-IT によって経年的に花粉症の症状が抑制されることが既に報告され、根治的治療法であることが確認された。またさらに小児において、喘息の

発症を抑制し、アレルギー自然史の修飾も可能であることも明らかになっている。しかしアナフィラキシーなどの副作用の問題から日本ではあまり一般的には行われていないのが現状で特に 15 歳以下の小児では生じやすいとされている。今回の検討から小児に対する Ag-IT がアレルギー疾患の治療的・予防的効果を持つことが示唆されたが、その証明にはプロスペクティブな大規模の試験が必要である。

また乳酸菌のプロバイオティクスの研究では花粉症における短期的な効果があることが示唆されたが、その効果発現機序は判明しなかった。症例数を増加させると共に短期的あるいは長期的にわたるプロバイオティクスにおける免疫寛容システムのバイオマーカーを見出さなければならない。

E. 結論

小児アレルギー性鼻炎は成人より QOL は軽いが、とても悪化している症例がある事は明らかで、自然寛解がないことを考え合わせると早期医療介入が必要である。今回の検討から花粉症においては Ag-IT の効果は成人より高かった。小児のアレルギー疾患に対する Ag-IT の有用性を示しており、将来のアレルギーの重症化を抑制する可能性がある。またプロバイオティクスではその効果発現機序の解明が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

大久保公裕、奥田稔：インターネットを用いたアレルギー性鼻炎患者に対するアンケート調査結果。アレルギー・免疫 11: 100-115, 2004.

大久保公裕、奥田稔：塩酸エピナスチンドロップの小児アレルギー性鼻炎における臨床試験。耳鼻臨床補 114: 1-21, 2004

大久保公裕：小児アレルギー性鼻炎（花粉症）の長期予後。アレルギー・免疫 11:72-77, 2004

Okubo K, Gotoh M and Okuda M: Prevalence of Japanese cedar pollinosis in children aged under 15 years throughout Japan. Clin Exp All Rev 4: 31-34, 2004

Okubo K, Gotoh M, Shimada K, Ristu M, Kobayashi M and Okuda M: Effect of fexofenadine on the quality of life of Japanese cedar pollinosis patients. Allergology International 53: 245-254, 2004

大久保公裕、永倉俊和、臼井秀夫、八木尚子、横森

淳二、植地康之、永田傳：小児花粉症患者におけるプロピオン酸フルチカゾンの有効性、安全性及び鼻炎 QOL の検討。アレルギー・免疫 12: 148-161, 2005
Gotoh M, Okubo K: Sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. Allergology International 54: 167-171, 2005.

Okuda M, Okubo K, Goto M, Okamoto Y, Konno A, Baba K, Ogino S, Enomoto M, Imai T, So N, Ishikawa Y, Takenaka Y, Manndai T, Crawford B: Comparative study of two Japanese rhinoconjunctivitis quality-of-life questionnaires. Acta Oto-Laryngologica 125: 10. 736-744, 2005
Gotoh M, Okubo K, Okuda M: Inhibitory effects of facemasks and eyeglasses on invasion of pollen particles in the nose and eye: clinical study. Rhinology 43, 8: 266-270, 2005.

大久保公裕：アレルギー性鼻炎の QOL について－抗ロイコトリエン剤の有効性－。日気食会報 56. 2(4 月)：194-196, 2005.

大久保公裕：ARIA と PG-MARJ2005. Prog Med 25.10: 2741-2747, 2005.

奥田稔、大久保公裕、後藤穰：鼻正常者の鼻症状。アレルギー54.6: 551-554, 2005.

奥田稔、大久保公裕、後藤穰、石田祐子：空中スギ花粉の着衣、皮膚への付着。アレルギー54.6: 555-558, 2005.

奥田稔、大久保公裕、後藤穰、石田祐子：季節前スギ花粉症の高率発症への疑問－鼻内スギ花粉数の測定から。アレルギー54.7: 636-640, 2005.

Okubo K, Gotoh M: Inhibition of the antigen provoked nasal reaction by second-generation antihistamines in patients with Japanese cedar pollinosis. Allergology International 55: 261-269, 2006.

Okubo K, Ogino S, Nagakura T, Ishikawa T: Omalizumab is effective and safe in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis. Allergology International 55: 379-386, 2006.

大久保公裕：アレルギー性鼻炎の QOL. 東京都医師会雑誌 59.3: 11-16, 2006.

大久保公裕、後藤穰：Hygiene hypothesis に基づいた抗原特異的免疫療法。Progress in Medicine 26: 1829-1832, 2006.

大久保公裕：小児アレルギー性鼻炎（花粉症）の現状と治療。小児科臨床 59: 1461-1468, 2006.

2. 学会発表

- 大久保公裕、後藤穰、島田健一、八木聰明、奥田稔：
小児アレルギー性鼻炎の成人への移行（耳鼻科から）
第41回日本小児アレルギー学会（東京）2004.11
- 大久保公裕：小児アレルギー性鼻炎の現状と QOL.
第23回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会（岡山）
2004.3
- 大久保公裕、後藤穰、島田健一、奥田稔、八木聰明：
小児アレルギー性鼻炎の現状と QOL. 第23回日本
耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2005.3
- Okubo K, Gotoh M, Okuda M: Epinastine
hydrochloride protects the nasal reactivity by
provocation tests with Japanese cedar pollen
allergen better than placebo and fexofenadine
hydrochloride. 19th World Allergy Congress, June,
2005, Munch, Germany
- 大久保公裕：生物製剤（抗 IgE を中心に）シンポジ
ウム 14 期待されるアレルギー疾患の治療戦略. 第
17回日本アレルギー学会春季臨床大会（岡山）2005.
4
- 奥田稔、大久保公裕、後藤穰：季節前スギ花粉症の
発症. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会（岡
山）2005. 4
- 大久保公裕：免疫療法の展望. 第44回日本鼻科学会
（大阪）2005. 9
- 大久保公裕：アレルギー疾患における抗ヒスタミン
薬の使用法（耳鼻咽喉科の立場から）第55回日本
アレルギー学会（盛岡）2005. 10
- 後藤穰、大久保公裕、島田健一、奥田稔：花粉症に
対する舌下免疫療法（液剤）. 第55回日本アレルギ
ー学会（盛岡）2005. 10
- 今井透、大久保公裕、藤倉輝道、相田瑞江、小津千
佳、酒主敦子、遠藤朝彦、宇井直也、吉村剛：2005
年のスギ花粉症に対するラマトロバンと抗ヒスタミ
ン薬の併用効果. 第55回日本アレルギー学会（盛岡）
2005. 10
- 後藤穰、大久保公裕、島田健一、奥田稔：スギ花粉
症に対する舌下免疫療法. 日本耳鼻咽喉科免疫アレル
ギー学会（鳥羽）2006. 3
- 大久保公裕：花粉症の発症の予防と治療. 日本耳鼻
咽喉科免疫アレルギー学会（鳥羽）2006. 3
- Okubo K, Okamoto Y, Masuyama K, Fujieda S,
Okano M, Yoshida H, Gotoh M: Randomized
placebo controlled trial of sublingual
immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. 第
18回日本アレルギー学会春季臨床大会（東京）
2006.5
- 大久保公裕：鼻アレルギー・副鼻腔炎の難治化要因
とその対策. 第23回日本小児難治喘息・アレルギー
疾患学会（富山）2006.6
- 大久保公裕：スギ花粉症と環境. 衛生薬学・環境ト
キシコロジー フォーラム 2006（東京）2006.10
- 大久保公裕：スギ花粉症に対する舌下免疫療法. 第
43回日本小児アレルギー学会（千葉）2006.11
- 後藤穰、大久保公裕、島田健一、奥田稔：スギ花粉
症に対する舌下免疫療法の二重盲検比較試験. 第56
回日本アレルギー学会（東京）. 2006.11
- 大久保公裕、後藤穰：アレルギー疾患に対する免疫
療法. 第56回日本アレルギー学会（東京）. 2006.11
- 大久保公裕：アレルギー性鼻炎「眼科と他科のイン
タラクション アレルギー炎症 鼻粘膜と結膜の違
いを探る」第110回日本眼科学会（大阪）2004.4
- 大久保公裕：小児アレルギー性鼻炎における最近の
話題. 第39回日本小児呼吸器疾患学会（東京）
2006.11
- 橋口一弘、湯懷鵬、藤田俊夫、椿茂和、藤田雅巳、
越野健、末松潔親、大久保公裕：花粉症調査研究施
設（OHIO Chamber）を使用した花粉症状発現に関
する探索的研究. 第18回日本アレルギー学会春季臨
床大会（東京）2006.5
- 湯懷鵬、藤田俊夫、波部和弘、大久保公裕、橋口一
弘、石川：スギ花粉を用いた暴露システムの開発.
第18回日本アレルギー学会春季臨床大会（東京）
2006.5
- Tang H, Fujita T, Habe K, Okubo K, Hashiguchi K,
Ishikawa T, Okuda M: Development of an
artificial exposure chamber system using
Japanese cedar pollen. XXV Congress of the
European Academy of Allergology and Clinical
Immunology (Vienna). 2006.6
- Hashiguchi K, Tang H, Fujita T, Tsubaki, Fujita
M, Koshino T, Suematsu K, Okubo K:
Preliminary study on Japanese cedar pollinosis in
an artificial exposure chamber (OHIO chamber).
XXV Congress of the European Academy of
Allergology and Clinical Immunology (Vienna).
2006.6
- 須甲松伸、大田健、長谷川真紀、大久保公裕、海老
澤元宏、朝比奈昭彦：実地医家向けアレルギー研修
会における「アレルギー診療ガイドライン」の認知
度と利用度に関する実態調査. 第56回日本アレルギ

一学会（東京）. 2006.11

指原紀宏、末木奈津子、池上秀二、竹友直生、山地
健人、紀光助、後藤穰、大久保公裕：Lactobacillus
gasseri OLL2809 の好酸球増多抑制効果の検討. 第
56 回日本アレルギー学会（東京）. 2006.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

抗原暴露室システム

国際出願番号 PCT/JP2005/017865

2005 年 9 月 28 日

抗原暴露室の抗原供給装置

国際出願番号 PCT/JP2005/017866

2005 年 9 月 28 日

抗原暴露室およびその洗浄・乾燥方法

国際出願番号 PCT/JP2005/017867

2005 年 9 月 28 日

スギ花粉症の診断方法 特願 2006-288853

2006 年 10 月 24 日

免疫療法を行ったアレルギー性鼻炎の長期追跡調査ならびにハウスダスト長期皮下および短期舌下免疫療法による抗原特異的メモリーT細胞の変動に関する研究

分担研究者 増山敬祐 山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科頭頸部外科教授
研究協力者 松崎全成 山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科頭頸部外科講師
松岡伴和 山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科頭頸部外科助手

研究要旨

免疫療法は現在唯一治癒が期待できる治療法である。また、喘息など他のアレルギー疾患の発症を予防できる可能性を持っている。今回の研究では、まずアレルギー性鼻炎で免疫療法を行った症例の追跡調査を行い、症状の改善効果やその他のアレルギー疾患の発症の有無、他抗原感作の有無について検討した。長期免疫療法を行っている症例の予後は良好で、症状別では鼻閉への効果が高かった。小児期に喘鳴を認めた症例では治療後に消失し、免疫療法後に喘息やアトピー性皮膚炎の新たな発症は認めなかった。

次に、免疫療法(皮下注)の作用機序について、抗原特異的メモリーT細胞を指標に免疫療法群と非免疫療法群の間で比較検討した。長期効果では、治療群においてIL-4、IL-5メモリーT細胞は有意に低下を示したが、IL-10メモリーT細胞には明らかな差を認めなかった。一方、系時的にみた同一症例の短期効果では、IL-4、IL-5メモリーT細胞の減少、IL-10メモリーT細胞の増加が示された。

さらに、ハウスダストによる短期舌下免疫療法の免疫学的作用機序について抗原特異的メモリーT細胞レベルで検討を行った。その結果、抗原特異的IL-4、IL-5メモリーT細胞数の有意な減少およびIL-10メモリーT細胞数の有意な増加を認めた。すなわち、舌下免疫療法は従来の皮下注法と同様にT細胞レベルに作用しており、その作用機序の一部に調節性T細胞が関与している可能性が示唆された。

A 研究目的

1. 免疫療法を行ったアレルギー性鼻炎患者の長期追跡調査:

アレルギー性鼻炎は喘息と合併することが多く、喘息発症の危険因子でありその治療が喘息症状の改善に寄与したり、喘息発症の予防にもつながる可能性がある。ところで、免疫療法は、現在のところアレルギー性鼻炎を治癒させる可能性をもつ唯一の治療法であり、患者個人の免疫状態を変容させることが示唆される。今回、免疫治療施行がその他のアレルギー疾患の発症や症状の改善に影響しているかどうか検討を行った。

2. ハウスダスト長期免疫療法によるメモリーT細胞の変動:

免疫療法の長期予後は患者にとっても満足いくものであり、免疫療法の臨床効果も優れている。しかしながら、その作用機序や臨床効果を評価するためのバイオマーカーは現在まで不十分であり、新たな評価法が必要と考えられる。そこで、我々は抗原特異的メモリーT細胞にターゲットを絞り、従来の皮下注による長期特異的免疫療法による抗原特異的メモリーT細胞の変化について検討を行い、非免疫療法群と比較した。

3.

小児アレルギー性鼻炎は低年齢化の一途をたどり、花粉症を含めその増加は深刻である。アレルギー性鼻炎は自然寛解がほとんどみられず、小児時期における早期介入治療が必要である。本研究において、その有効な治療法として特異的免疫療法に注目し検討を行ってきた。特異的免疫療法は、WHOでも評価されているように、効果についての実績は認められている。しかし、従来の特異的免疫療法は皮下注射のため、痛み・アナフィラキシーショックといった副作用の心配や通院等の患者負担が大きく、小児(特に学童以下)に行うことは困難であった。近年欧米を中心に行われるようになった特異的舌下免疫療法は、これらの欠点を補うものであり、小児アレルギー疾患に対する早期介入に最も適した治療法と考えられる。

現在、研究班では小児通年性ハウスダスト・ダニアレルギー性鼻炎患者に対するハウスダスト特異的舌下免疫療法に取り組んでいるが、効果判定のバイオマーカーとして適切なものはこれまでみつかっていない。我々は、舌下免疫療法の効果判定のバイオマーカーとして、特異的免疫療法による抗原特異的メモリーT細胞に注目し、免疫療法によるその変動について検討したので報告する。

B 方法

1. 免疫療法群の長期追跡調査:

アレルギー性鼻炎で免疫療法を受けた患者を対象に、アンケート調査を施行した。内容は、免疫療法の試行期間、効果、症状の再発、最近の鼻症状とその程度、喘息やアトピー性皮膚炎の症状の有無について調査した。

2. 抗原特異的メモリーT細胞の検出法:

アレルギー性鼻炎では、実際の臨床の指標としてはRAS Tをはじめとする抗原特異的IgEの検出などB細胞中心の検査法が主体であり、それは免疫療法効果の指標とはならない。一方、抗原特異的T細胞の評価法としては、長時間の培養を行うものがほとんどで再現性に乏しい。そこで、我々は可及的に短時間培養で直接抗原特異的メモリーT細胞検出ができる検査法を新たに検討した。抗原特異的メモリーT細胞の活性化には、タンパクレベルの抗原を抗原提示細胞によりペプチドレベルに分解し抗原提示を行う必要があり、活性化したT細胞は、IFN- γ ・IL-4・IL-5・IL-10といった様々なサイトカインを産生する。そこで、樹状細胞を体外で誘導し、タンパクレベルのダニ抗原(Der f 1, Der f 2)をプロセッシングし、抗原提示させる方法を用い、抗原特異的サイトカイン産生メモリーT細胞の頻度をELISPOT法にて検討した。なお本研究は、山梨大学医学部の倫理審査委員会の承認を受けている。

3. 舌下免疫療法による抗原特異的メモリーT細胞の変化:

小児アレルギー性鼻炎患者のうち、通年性の鼻症状があり、特異的IgE抗体検査にてハウスダスト・ダニ陽性(クラス2以上)で、文書で同意の得られた7症例に対し、2005年12月よりハウスダスト特異的舌下免疫療法を行った。具体的には、ハウスダストエキス「トリイ」を用い、以下に述べるプロトコールにそって舌下においたパン等にエキスを滴下し2分保持、その後吐き出す舌下吐き出し法にて免疫療法を行った。すなわち、第1週目は 10^{-4} エキスを1滴、2滴、3滴、4滴、6滴、8滴、10滴と7日間に亘って増量、2週目は 10^{-3} エキスを同様に増量、3週目は 10^{-2} エキスを同様に増量、4週目は 10^{-1} エキスを1滴、2滴、4滴、8滴、12滴、18滴、20滴と増量した。5週目は 10^{-1} エキス20滴を週2回、6週目以降は1週間に1回、抗原エキスHD 10^{-1} を20滴舌下に投与した。

治療前・閾値到達時(6週目)・治療開始3ヶ月後・治療開始6ヶ月後に採血を行い、末梢血単核球を分離保存した。患者末梢血の単球を分離、各種サイトカイン存在下で培養し、さらにダニ抗原タンパクを抗原提示細胞と48時間共培養することによってダニ抗原提示細胞を誘導

した。この細胞に抗原提示させ保存した末梢血単核球中のダニ抗原特異的サイトカイン産生メモリーT細胞の頻度についてELISPOT法を用いて検討を行った。検討対象としたサイトカインは、IL-4、IL-5およびIL-10である。

C 結果

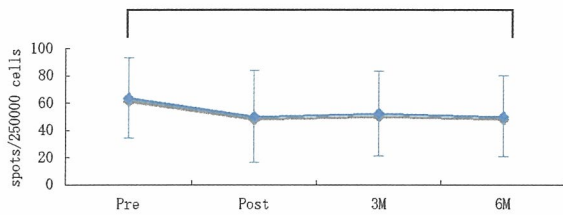
1. 53症例にアンケートを依頼し35症例より回答が得られた(回収率66%)。年齢は14歳~78歳で平均年齢44歳である。治療期間:3年未満14例、3~5年7例、6~9年8例、10年以上6例であった。平均治療年数5.5年。免疫療法の抗原の種類は、ハウスダスト13例、スギ32例、ヨモギ4例、ブタクサ4例、カモガヤ5例(重複あり)。使用抗原の種類:1種類15例、2種類17例、3種類3例であった。スギとハウスダストの2種類での減感作症例が10例であった。減感作治療のハウスダスト単独症例は1例のみで、他の12例はスギ(11例)、ブタクサ(2例)との併用減感作治療であった。効果については、とてもあった20例(57%)、少しあった10例(29%)、無効2例、不明3例で、86%に効果を認めた。治療期間別効果をみると、3年未満(14例)ではとてもあった2例(14%)、少しあった7例、無効2例、不明3例であった。一方、3年以上(21例)では、効果がとてもあった18例(86%)、少しあった3例で、すべての症例で何らかの効果が認められた。再発は4例(11%)でいずれも注射期間が3年未満の症例であった。現在の鼻症状については、ほとんどない8例、1年中ある8例、春のみ6例、春と秋6例、春、夏、秋2例、春、冬2例、その他3例であった。症状別では、くしゃみ、鼻汁(23%)に比べ、鼻閉(51%)の消失率が高かった。小児期の喘鳴(7例)、アトピー性皮膚炎(5例)の免疫療法後の経過は、喘鳴は全例なし、アトピー性皮膚炎は4例治療後にも認められている。免疫療法後の、喘息、アトピー性皮膚炎の症状の推移については、喘息、アトピー性皮膚炎が消失あるいは軽くなったと答えた方が1例ずつ認められた。

2. 3年以上特異的免疫療法を継続し著効を示している「免疫療法群」6例、未治療群で実際にはアレルギー性鼻炎症状があり皮内テスト陽性でかつ誘発テストも陽性のハウスダスト・ダニアレルギー性鼻炎「有症状者群」8例、皮内テストは陽性だが誘発テストは陰性で症状のない「無症状者群」10例の3群間で抗原特異的メモリーT細胞を比較検討した。まず、IL-5産生メモリーT細胞の頻度は、「免疫療法群」において「有症状者群」や「無症状者群」と比較して有意に低値であった。次に、IL-4産生メモリーT細胞の頻度は、「免疫療法群」で「有症状者群」に比べ有意に低値であった。一方、IL-10産生メモリーT

細胞の頻度には3群間で明らかな有意差は認められなかった。

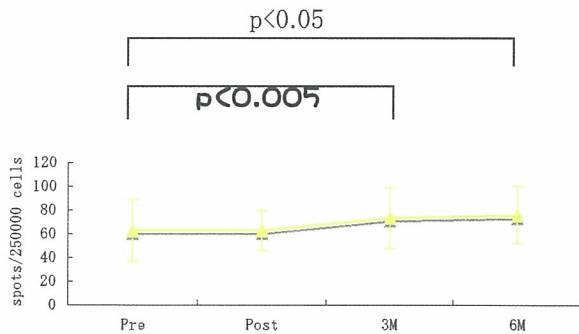
3. 舌下免疫療法患者における、末梢血中ダニ抗原特異的メモリーT細胞について検討したところ、アレルギーにおいて重要な働きをする Th2 サイトカインである IL-4、IL-5 産生メモリーT細胞は、免疫療法治療開始前に比べ治療6ヶ月後で有意なIL-4(図1)・IL-5産生メモリーT細胞の減少が見られた。

P<0.01



(図1:ダニ抗原特異的IL-4産生メモリーT細胞)

また、制御性T細胞として、アレルギーに対して抑制的に働くと考えられているIL-10産生メモリーT細胞については、治療開始前に比べ治療開始後3ヶ月と6ヶ月で有意にその産生細胞数の増加が認められた。(図2)



(図2:ダニ抗原特異的IL-10産生メモリーT細胞)

D 考察

1. 今回のアンケート調査ではスギ花粉症の免疫療法症例が多数を占めたため、小児期から治療を開始した症例は少なかった。しかしながら、スギ単独症例以外では、スギとハウスダストを重複して持っている症例が多く、小児期より通年性の症状を有している症例である。ハウスダストとスギで9歳より免疫療法を行った症例では、合併していた喘息は治療により軽快がみられた。免疫療法の効果は、3年以上継続して行っている症例のほうが3年未満の症例より優れていた。症状消失例も存在し(23%)、免疫療法の長期予後は優れている。今回の検討では喘息、アトピー性皮膚炎などその他のアレ

ルギー疾患の合併率は低かったが、免疫療法により他のアレルギー疾患の発症が抑えられるかどうかについてはさらなる検討が必要である。

2. 特異的免疫療法(皮下注)の長期効果として、抗原特異的IL-4・IL-5産生メモリーT細胞の頻度の低下が示唆されたが、IL-10産生メモリーT細胞の頻度の増加は明らかではなかった。しかし、これはあくまでも非免疫療法群との群間比較であることを認識しておく必要がある。今回少数例であるが、免疫療法に伴って系時的に採血を行い、短期間ではIL-10産生メモリーT細胞の頻度の増加が認められた(IL-4・IL-5産生メモリーT細胞の頻度の低下もみられた)。特異的免疫療法の作用機序として調節性T細胞の関与が示唆されており、バイオマーカーとして臨床的に有用であるかどうか今後の検討課題である。

3. ハウスダスト特異的舌下免疫療法によってIL-4、IL-5産生メモリーT細胞は、治療開始前に比べ治療開始6ヶ月後で有意な減少が見られ、IL-10産生メモリーT細胞については、治療開始前に比べ治療開始後3ヶ月と6ヶ月で有意に産生細胞数が増加した。つまり、舌下法においても従来の皮下法と同様に、免疫学的機序が作働していることが示唆された。さらに、近年、特異的免疫療法の機序のひとつとしてIL-10産生細胞などの調節性T細胞の関与を示唆する報告もみられる。我々が施行した舌下免疫療法においても、抗原特異的IL-10産生メモリーT細胞の有意な増加を認め、舌下免疫療法による効果発現機序のひとつであることが推定された。以上のことより、舌下免疫療法が従来の皮下注射による免疫療法と同等の効果があることが期待されよう。今回は少数例での検討でありかつプラセボでの効果を見ていないため、免疫学的効果の比較検討や臨床効果については十分な評価ができなかったと考えている。現在、プラセボ試験における臨床効果判定と免疫学的変動との相関を調べバイオマーカーとしての検討を行っている。

E 結論

1. 免疫療法は長期的にはアレルギー性鼻炎の治療に有用である。免疫療法により喘息が軽快する症例を認め、かつ喘息やアトピー性皮膚炎の新たな発症はなかった。また、新たな吸入抗原への感作も認めなかった

2. 非免疫療法群との比較において、特異的免疫療法(皮下注)の長期的効果発現には、抗原特異的IL-4・IL-5産生メモリーT細胞の有意な低下があると考えられた。だが、短期的系時的検討においては抗原

特異的IL-10産生メモリーT細胞の増加も認められ、調節性T細胞の誘導による機序も否定できない。

3. ハウスダスト特異的舌下免疫療法により、抗原特異的IL-10産生メモリーT細胞の有意な増加と、IL-4、IL-5産生メモリーT細胞の有意な減少が認められた。舌下免疫療法が従来の皮下注射と同等の効果が期待できるとともに、舌下免疫療法による効果発現機序のひとつと考えられた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

増山敬祐:EBMに基づく鼻アレルギー診療ガイドラインの活用と問題点を探る. 2. 花粉症治療の選択法. Progress in Medicine 23: 3174-3178, 2003.

増山敬祐:ステロイド剤の薬物療法 花粉症・アレルギー性鼻炎. 薬局 54: 25-33, 2003.

増山敬祐:病態に則した診断へのアプローチ 2. アレルギー性鼻炎. 日本内科学会雑誌 93: 12-18, 2004.

増山敬祐:小児アレルギー性副鼻腔炎の病態、診断と治療. 日本耳鼻咽喉科学会専門医通信 82: 8-9, 2005.

松崎全成、増山敬祐:鼻アレルギーの発症・増悪因子としての環境因子. アレルギー・免疫 12: 18-22, 2005.

松崎全成、増山敬祐:アレルギー性鼻炎における神経ペプチド. アレルギーと神経ペプチド 2: 29-30, 2006.

増山敬祐:ガイドラインに基づくアレルギー性鼻炎の治療と展望. アレルギー科 21(6): 617-626, 2006.

2. 学会発表

高橋吾郎、松崎全成、増山敬祐:インターネット鼻アレルギー日記(第1報). 第53回日本アレルギー学会総会、2003

松岡伴和、松崎全成、高橋吾郎、堀口茂俊、岡本美孝、増山敬祐:ダニアレルギー性鼻炎患者の抗原特異的

サイトカイン産生細胞の検討. 第16回日本アレルギー学会春季臨床大会、2004

松岡伴和、松崎全成、高橋吾郎、増山敬祐、他:ダニアレルギー性鼻炎患者の抗原特異的サイトカイン産生細胞の検討2. 第54回日本アレルギー学会総会、2004

松崎全成、高橋吾郎、遠藤周一郎、松岡伴和、増山敬祐、他:花粉症疫学調査における病診連携について—山梨県での取り組み—. 第23回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2005

松岡伴和、堀口茂俊、岡本美孝、松崎全成、増山敬祐:ダニアレルギー性鼻炎患者の抗原特異的細胞の検討. 第106回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、2005

松岡伴和、岡本篤司、松崎全成、増山敬祐:OK-432を用いた癌抗原特異的細胞障害性T細胞誘導の検討. 第24回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2006

松崎全成、高橋吾郎、増山敬祐、他:鼻噴霧用ステロイド薬に対する花粉症患者の意識調査. 第107回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、2006

高橋吾郎、松崎全成、増山敬祐、他:スギ花粉症に対する民間療法について—2006年患者アンケート調査から—. 第23回日本耳鼻咽喉科学会山梨県地方部会学術講演会、2006

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

メモリーTh2細胞研究

分担研究者：中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 教授

研究要旨

I型アレルギーの発症はTh1/Th2のバランスによって制御されていることがわかってきた。花粉症は、慢性気道炎症を特徴とする喘息などのアレルギー疾患と違って、I型アレルギーの典型的な病態である。従ってTh1/Th2のバランスの制御による免疫治療によって病態の改善がもっとも期待できる対象疾患である。これまで、減感作療法はある程度の治療効果を発揮してきたが、著効例においても数年は杉花粉特異的なIgEなどは高値を示したままである。これは、杉花粉特異的なメモリー細胞の寿命がかなり長いために、数年にわたって杉花粉特異的なIgE産生が続くためであると考えられる。アレルゲン特異的なメモリーTh2細胞の制御なしに根治治療の樹立は期待できない。しかし、メモリーTh2細胞の成立や生存、機能維持に関する研究は、ほとんど行われていない。そこで、メモリーTh2細胞を大量に生体内で調整できるメモリーマウスを樹立した。その実験系を用いて、アレルゲン特異的なメモリーTh2細胞の形成と機能維持に関わる分子レベルでの解析を行った。Th2細胞の誘導に重要なIL-4はメモリーTh2細胞の機能維持には必要ないこと、MLL分子がメモリーTh2細胞の機能維持に重要であることがわかった。また、杉花粉症の患者で、シーズンと非シーズンに分けた花粉抗原特異的なTh1/Th2細胞のクローンサイズの定量的検討を行った。この研究によって、花粉症患者でのアレルゲン特異的なメモリーTh2細胞の形成と機能維持に関する機序が明らかになり、エビデンスに基づいた花粉症の免疫治療の樹立に貢献すると考えられる。

A. 研究目的

I型アレルギー発症の要の細胞であるメモリーTh2細胞の成立、生存、機能維持に関する分子レベルでの検討を行い、アレルギーをターゲットにした免疫療法の開発研究に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

(1) Th2細胞がどのような分子機構でTh2サイトカインを産生する能力を維持しているのかに関して解析するために、卵アレルギーの主要アレルゲンであるOVA特異的なナイーブCD4T細胞を、*in vitro*で抗原とIL-4を用いて培養することでTh2細胞分化を誘導し、出来たTh2細胞を正常のマウス及びヌードマウスに移入し、OVA特異的なメモリーTh2細胞を作成する、メモリーTh2マウスの実験系を樹立した。そしてどのような分子がメモリーTh2細胞の形成、維持に必要なに関してまず初年度は、IL-4遺伝子欠損マウスを用いて解析した。

(2) Th2細胞の、分化制御機構は次第に明らかになってきたが、加齢とともにどのように分化能が変化するかに関してはほとんど不明である。そこで、6週齢の若年マウスと8-12ヶ月の老齢マウス（ヒトでは60才台に相当）を用いて実験を行った。OVA特異的なナイーブCD4T細胞を、*in vitro*で抗原とIL-4またはIL-12を用いて培養することでTh1/Th2細胞を分化誘導し分化能を評価した。また、マウス喘息モデルを用いて生体レベルでの解析を行った。

(3) メモリーTh2細胞の機能維持における分子機構を解明するために、ヒストンメチル基転移酵素であるMLLに注目して研究を行った。MLLホモ欠損マウスは胎生致死であるが、ヘテロ欠損(*MLL+/-*)マウスにおいても影響が見られるため、*MLL+/-*マウスのCD4T細胞を用いて解析を行った。*in vivo*におけるMLLの役割を解析するため、正常または*MLL+/-*バックグラウンドのOVA特異的な $\alpha\beta$ TCRトランスジェニックマウスよりエフェクターTh2細胞を調製し、ヌードマウスに移入してメモリーTh2マウスをつくった後、抗原である

OVA を吸入することで誘発したアレルギー性気道炎症モデルで検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来のサンプルは使用していない。動物実験は千葉大学実験動物委員会の指針を遵守して行った。

C. 研究結果

(1) 初年度に次の3点の結果が得られた。1. 典型的メモリーTh2細胞の作成実験系の樹立。リコールレスポンスに対して即座に反応して分裂し、しかもTh2サイトカインを大量に産生する、典型的なメモリーTh2細胞が出来ることがわかった。2. IL-4ノックアウトマウスのT細胞を用いて細胞移入実験を行い、IL-4はメモリーTh2の形成、機能維持に必要なことがわかった。3. クロマチンレベルの解析から、IL-4遺伝子座のヒストンアセチル化(転写活性と相関)は、メモリーTh2細胞で維持されており、それはあるレベルで起こる転写に依存性して維持されていることがわかった(Yamashita et al. *J. Biol. Chem.* 279: 39454, 2004)。

(2) 平成17年度には次の3点の結果が得られた。老齢マウスでは、1. TCR下流のERK/MAPK系の活性化が選択的に抑制されていること。2. Th2細胞分化が選択的に障害されていること。3. OVAで誘導される好酸球性の気道炎症の程度が低いことがわかった(Hasegawa et al. *J. Immunol.* 176:2546, 2006)。

(3) MLLの発現が半分に低下している $MLL^{+/-}$ タイプCD4 T細胞でも、Th2細胞分化条件下で培養することでGATA3遺伝子座やTh2サイトカイン遺伝子座のヒストンH3(K4)のメチル化は正常に誘導された。その結果、GATA3発現が誘導されTh2サイトカイン産生能の獲得が起こり、正常にエフェクターTh2細胞へ分化する。しかしながら、 $MLL^{+/-}$ メモリーTh2細胞ではGATA3遺伝子座・Th2サイトカイン遺伝子座のヒストンH3(K4)のメチル化は維持されず、GATA3の発現およびTh2サイトカイン産生能は大幅に低下した。正常メモリーTh2マウスでは、OVAの吸入により再気管支周囲への炎症細胞の浸潤が誘導されるが、 $MLL^{+/-}$ メモリーTh2細胞では浸潤のレベルが低下していた。これらの実験から、ヒストンメチル基転移酵素のMLLがメモリーTh2細胞におけるTh2サイトカイン産生能の維持に必要なことが明らかになった(Yamashita et al. *Immunity.* 24:611, 2006)。

D. 考察

新たに樹立したメモリー細胞形成の実験系では、

1匹から 1×10^7 個以上のメモリーTh2細胞を調整することが出来、分子機構の研究にとって非常に有用なモデルであることがわかった。Th2細胞の分化に必須のIL-4はメモリー細胞の形成、維持には必要ないことが明らかになり、アレルギーの分子レベルでの治療のターゲットとしてIL-4の再評価が必要であることがわかった。加齢と共にTh2細胞への分化能が低下することがわかった。アレルギー特異的な、メモリーTh2細胞の機能維持に関するターゲット分子(MLL)が明らかになったことより、小児でのアレルギーの成人への移行に関しても同様のメカニズムが働いている可能性が浮上した。アレルギー患者での解析を行う段階に来たと考えている。

E. 結論

メモリーTh2細胞を大量に調整できる実験系が樹立された。年齢依存性のTh2細胞分化能の調節機構の存在が明らかになった。メモリーTh2細胞の機能維持に関するターゲット分子MLLが明らかになった。

F. 研究発表

論文発表

1. Koike, J., Wakao, H., Ishizuka, Y., Sato, T., Hamaoki, M., Seino, K., Koseki, H., Nakayama, T., and Taniguchi, M.: Bone marrow allograft rejection mediated by a novel murine NK receptor, NKG2I. *J. Exp. Med.* 199:137-143 (2004).
2. Watanabe, H., Shimizu, T., Nishihara, J., Abe, R., Nakayama, T., Taniguchi, M., Sabe, H., Ishibashi, T., and Shimizu, H.: Ultraviolet A-induced production of matrix metalloproteinase-1 is mediated by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279:1676-1683 (2004).
3. Hasegawa, A., Cheng, X., Kajino, K., Berezov, A., Murata, K., Nakayama, T., Yagita, H., Murali, R., and Greene, M. I.: Fas-disabling small exocyclic peptide mimetics limit apoptosis by an unexpected mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6599-6604 (2004).
4. Inami, M., Yamashita, M., Tenda, Y., Hasegawa, A., Kimura, M., Hashimoto, K., Seki, N., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: CD28 costimulation controls histone hyperacetylation of the IL-5 gene locus in developing Th2 cells. *J. Biol. Chem.* 279:23123-23133 (2004).
5. Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Miyamoto, T., Sugaya, K., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Kimura, M., Taniguchi, M., DeGregori, J., and Nakayama, T.: Essential role of GATA3 for the maintenance of Type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene

- loci. *J. Biol. Chem.* 279:26983-26990 (2004).
6. Shimizu, E., Koike, J., Wakao, H., Seino, K., Koseki, H., Kakiuchi, T., **Nakayama, T.**, and Taniguchi, M.: Role of a NK receptor, KLRE-1, in bone marrow allograft rejection: analysis with KLRE-1 deficient mice. *Blood* 104:781-783 (2004).
 7. Yamashita, M., Shinnakasu, R., Nigo, Y., Kimura, M., Hasegawa, A., Taniguchi, M., and **Nakayama, T.**: Interleukin (IL)-4-independent maintenance of histone modification of the IL-4 gene loci in memory Th2 cells. *J. Biol. Chem.* 279:39454-39464 (2004).
 8. Nakai, Y., Iwabuchi, K., Fujii, S., Ishimori, N., Dashtsoodol, N., Watano, K., Mishima, T., Iwabuchi, C., Tanaka, S., Bezbradica, J. S., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Miyake, S., Yamamura, T., Kitabatake, A., Joyce, S., Van Kaer, L., and Onoe, K.: Natural killer T cells accelerate atherosclerosis in mice. Short title: NKT cells and atherosclerosis in mice. *Blood* 104:2051-2059 (2004).
 9. Diao, H., Kon, S., Iwabuchi, K., Kimura, C., Morimoto, J., Ito, D., Segawa, T., Maeda, M., Hamuro, J., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Yagita, H., Van Kaer, L., Onoe, K., Denhardt, D., Rittling, S., and Uede, T.: Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 21:539-550 (2004).
 10. Katsumoto, T., Kimura, M., Yamashita, M., Hosokawa, H., Hashimoto, K., Hasegawa, A., Omori, M., Miyamoto, T., Taniguchi, M., and **Nakayama, T.**: STAT6-dependent differentiation and production of IL-5 and IL-13 in murine NK2 cells. *J. Immunol.* 173:4967-4975 (2004).
 11. Kimura, Y. M., Hosokawa, H., Yamashita, M., Watarai, H., Hasegawa, A., Iwamura, C., Taniguchi, M., Takagi, T., Ishii, S., and **Nakayama, T.**: Regulation of Th2 cell differentiation by murine Schnurri-2. *J. Exp. Med.* 201:397-408 (2005).
 12. Ishikawa, A., Motohashi, S., Ishikawa, E., Fuchida, H., Higashino, K., Otsuji, M., Iizasa, T., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., and Fujisawa, T.: A phase I study α -galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin. Can. Res.* 11:1910-1917 (2005).
 13. Ishikawa, E., Motohashi, S., Ishikawa, A., Ito, T., Uchida, T., Kaneko, T., Tanaka, Y., Horiguchi, S., Okamoto, Y., Fujisawa, T., Tsuboi, K., Taniguchi, M., Matsumura, A., and **Nakayama, T.**: Dendritic cell maturation by CD11c⁻ T cells and V α 24⁺ NKT cell activation by α -Galactosylceramide. *Int. J. Cancer* 117:265-273 (2005).
 14. Yamashita, M., Shinnakasu, R., Asou, H., Kimura, M., Hasegawa, A., Hashimoto, K., Hatano, N., Ogata, M., and **Nakayama, T.**: Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2 differentiation through ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 280:29409-29419 (2005).
 15. Kojo, S., Seino, K., Harada, M., Watarai, H., Wakao, H., Uchida, T., **Nakayama, T.**, and Taniguchi, M.: Induction of regulatory properties in dendritic cells by V α 14 NKT cells. *J. Immunol.* 175:3648-3655 (2005).
 16. Kimura, Y. M., and **Nakayama, T.**: Differentiation of NK1 and NK2 cells. *Crit. Rev. Imm.* 25:361-374 (2005).
 17. **Nakayama, T.**, Yamashita, M., Kimura, M., Hasegawa, A., Omori, M., Inami, M., Motohashi, S., Kitajima, M., Hashimoto, K., Hosokawa, H., and Shinnakasu, R.: Chromatin remodeling of the Th2 cytokine gene loci. *International Congress Series 1285* 137-144 (2005).
 18. Watarai, H., Hinohara, A., Nagafune, J., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., and Yamaguchi, Y.: Plasma membrane-focused proteomics: Dramatic changes in surface expression during the maturation of human dendritic cells. *Proteomics* 5:4001-4011(2005).
 19. Hasegawa, A., Miki, T., Hosokawa, H., Hossain, M. B., Shimizu, C., Hashimoto, K., Kimura, Y. M., Yamashita, M., and **Nakayama, T.**: Impaired GATA3-dependent chromatin remodeling and Th2 cell differentiation leading to attenuated allergic airway inflammation in aging mice. *J. Immunol.* 176: 2546-2554(2006).
 20. Nigo, I. Y., Yamashita, M., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Inami, M., Kimura, M., Hasegawa, A., Kohno, Y., and **Nakayama, T.**: Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2286-2291 (2006).
 21. Meyer, E. H., Goya, S., Akbari, O., Berry, G. J., Savage, P. B., Kronenberg, M., **Nakayama, T.**, DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T.: Glycolipid activation of invariant T cell receptor⁺ NKT cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2782-2787 (2006).
 22. Kunisaki, Y., Tanaka, Y., Sanui, T., Inayoshi, A., Noda, M., **Nakayama, T.**, Harada, M., Taniguchi, M., Sasazuki, T., and Fukui, Y.: DOCK2 is required in T cell precursors for development of V α 14 natural killer T (NKT) cells. *J. Immunol.* 176:4640-4645 (2006).
 23. Yamashita, M., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Norikane, S., Kimura, Y. M., Hasegawa, A., and **Nakayama, T.**: Crucial role of MLL for the maintenance of memory T helper type 2 cell responses. *Immunity* 24:611-622 (2006).
 24. Seino, K., Motohashi, S., Fujisawa, T., **Nakayama, T.**, and Taniguchi, M.: Natural killer T cell-mediated

- antitumor immune responses and their clinical applications. *Cancer Sci.* 97:807-812 (2006).
25. Tenda, Y., Yamashita, M., Kimura, Y. M., Hasegawa, A., Shimizu, C., Kitajima, M., Onodera, A., Suzuki, A., Seki, N., and **Nakayama, T.**: Hyperresponsive T_H2 cells with enhanced nuclear factor- κ B activation induce atopic dermatitis-like skin lesions in Nishiki-nezumi Cinnamon/Nagoya mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118:725-733 (2006).
 26. Motohashi, S., Ishikawa, A., Ishikawa, E., Otsuji, M., Iizasa, T., Hanaoka, H., Shimizu, N., Horiguchi, S., Okamoto, Y., Fujii, S., Taniguchi, M., Fujisawa, T., and **Nakayama, T.**: A phase I study of *in vitro* expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin. Can. Res.* 12:6079-6086 (2006).
 27. Shinnakasu, R., Yamashita, M., Shinoda, K., Endo, Y., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Ikemizu, S., and **Nakayama, T.**: Critical YxKxHxxxRP motif in the C-terminal region of GATA3 for its DNA binding and function. *J. Immunol.* 177:5801-5810 (2006).
 28. Hosokawa, H., Kimura, Y. M., Shinnakasu, R., Suzuki, A., Miki, T., Koseki, H., van Lohuizen, M., Yamashita, M., and **Nakayama, T.**: Regulation of Th2 cell development by *Polycomb* group gene *bmi-1* through the stabilization of GATA3. *J. Immunol.* 177:7656-7664 (2006).
 29. Harada, M., Magara, K. K., Watarai, H., Nagata, Y., Ishii, Y., Kojo, S., Horiguchi, S., Okamoto, Y., **Nakayama, T.**, Suzuki, N., Yeh, W. C., Akira, S., Kitamura, H., Ohara, O., Seino, K., and Taniguchi, M.: IL-21-induced Be cell apoptosis mediated by natural killer T cells in the suppression of IgE responses. *J. Exp. Med.* 203:2929-2937(2006).
 30. Kaneko, T., Hosokawa, H., Yamashita, M., Wang, C. R., Hasegawa, A., Kimura, Y. M., Kitajima, M., Kimura, F., Miyazaki, M., and **Nakayama, T.**: Chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci in human type 2 helper T cells. *Mol. Immunol.* 44:2249 (2007).

G. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表