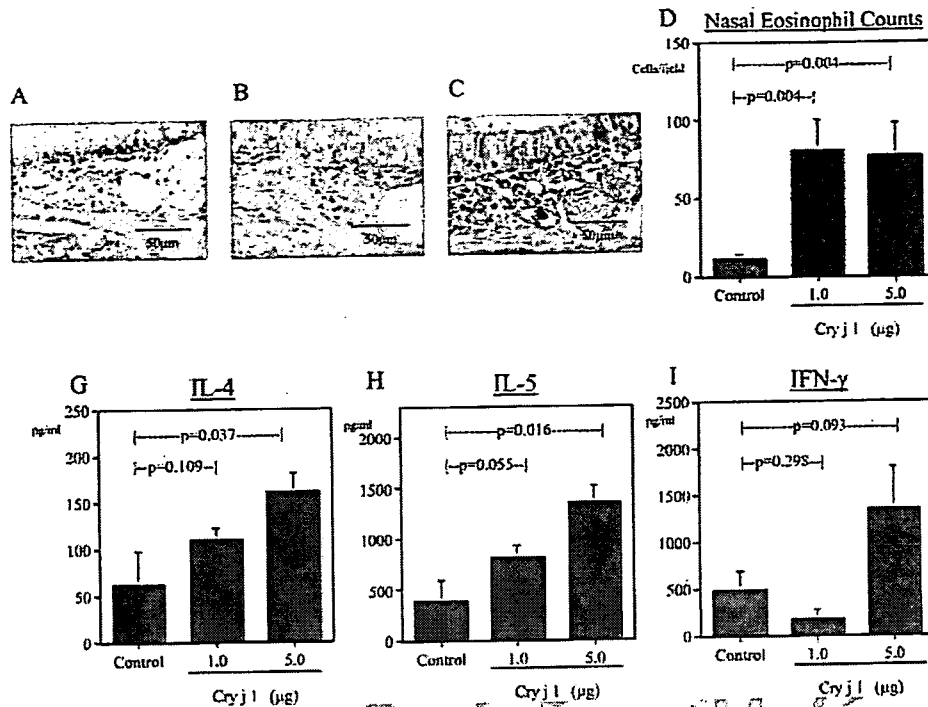


CRTH2 PLAYS A PROINFLAMMATORY ROLE IN MURINE POLLINOSIS



AQ: J FIGURE 3. Nasal eosinophilia and cytokine production by submandibular lymph node cells following intranasal sensitization and challenge with Cry j 1. Mice were sensitized and challenged by intranasal administration of PBS (A), low-dose Cry j 1 (B), or high-dose Cry j 1 (C) according to the schedule shown in Fig. 1. Sixteen hours after the final challenge, nasal sections were collected, fixed, and decalcified, and eosinophils in the nasal mucosa were detected by Luna stain. D, The numbers of eosinophils in the posterior portion of the nasal septum were determined per high-power (10 × 40) microscopic field. Mean numbers of infiltrating cells per field ± SEM are shown. Sixteen hours after the final challenge, submandibular lymph node cells were isolated and cultured in the absence or presence of Cry j 1 for 72 h. IL-4 (E), IL-5 (F), and IFN-γ (G) were measured by ELISA. Mean concentrations ± SEM are shown. Results are representative of two independent experiments.

IL-5 produced by the cells were in proportion to the doses used for in vivo sensitization (Fig. 3, E and F). IFN-γ production was slightly enhanced in lymph node cells from mice treated with a high dose of Cry j 1 compared with control mice, but the increase was not statistically significant (Fig. 3G).

CRTH2 mRNA expression in nasal mucosa of Cry j 1-sensitized mice

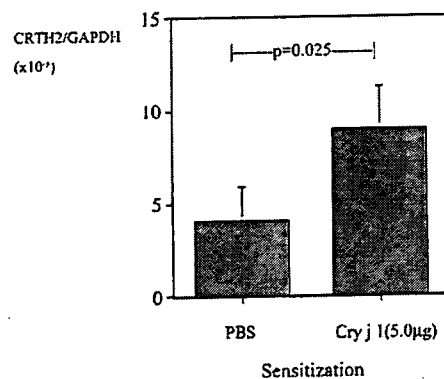
We next measured the expression of CRTH2 at sites of nasal inflammation. Control mice treated with PBS expressed a low level of CRTH2 mRNA in the mucosal tissue of the nasal septum. In mice treated with Cry j 1, the level of CRTH2 mRNA was significantly increased (Fig. 4). Thus, we further investigated whether CRTH2 is positively or negatively involved in the pathophysiology of pollinosis using CRTH2^{-/-} mice.

Impaired pathophysiology of pollinosis in Cry j 1-sensitized CRTH2^{-/-} mice

A high dose of Cry j 1 was administered to both wild-type (WT) and CRTH2^{-/-} mice, and the nasal hyperresponsive symptoms were examined immediately after the final nasal challenge. Notably, the number of sneezes in 10 min by the Cry j 1-sensitized mutant mice was significantly lower than by the WT mice (Fig. 5A). Nasal rubbing was also significantly lower in the CRTH2^{-/-} mice than in the WT mice (Fig. 5B).

The level of Cry j 1-specific IgE in serum samples collected on the day following the final Ag challenge was significantly lower for mutant mice than for WT mice (Fig. 5C). Production of Cry j 1-specific IgG1 was similarly reduced in CRTH2^{-/-} mice compared with WT mice (Fig. 5D). In contrast, serum levels of Cry j 1-specific IgG2a were the same in the two mouse strains (Fig. 5E).

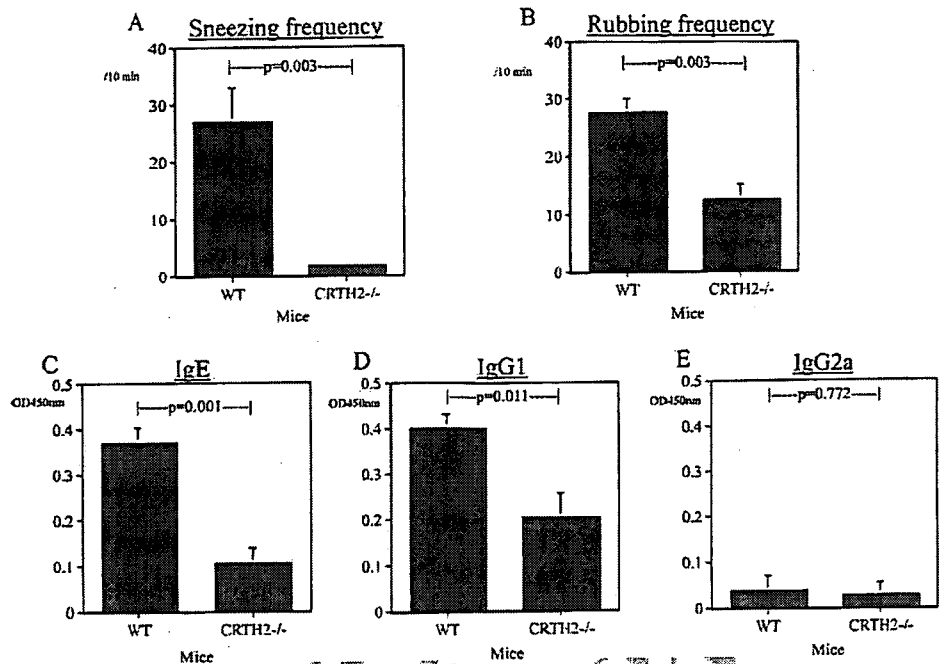
The number of eosinophils infiltrating into the nasal septum following administration of Cry j 1 was also significantly lower in the CRTH2^{-/-} mice than in the WT mice (Fig. 6A-C). Although the number of mononuclear cells infiltrating the nasal septum was not significantly different in the mutant and WT mice (Fig. 6D), the number of infiltrating CD3⁺ cells was significantly reduced in CRTH2^{-/-} mice as compared with WT mice (Fig. 6E). These



F4 FIGURE 4. Relative amounts of CRTH2 mRNA in nasal mucosa. Mice (6 per group) were sensitized by intranasal administration of 5.0 µg of Cry j 1 once a week for 3 wk. One week after the third sensitization, mice were challenged by intranasal administration of 1.0 µg of Cry j 1 each day for 7 consecutive days. Control animals were treated with PBS at all steps except for the final challenge, where they were treated with 1.0 µg of Cry j 1. Sixteen hours after the final challenge with Cry j 1, mucosal tissues were removed from the nasal septum. The CRTH2 mRNA levels were estimated using real-time quantitative PCR. Results are the mean amounts of mRNA ± SEM.

F5

FIGURE 5. Nasal symptoms and Ab production in WT and CRTH2^{-/-} mice following the final nasal challenge with Cry j 1. Mice were sensitized and challenged by intranasal administration of Cry j 1. Sneezing (A) and rubbing (B) frequency were measured for 10 min following the final nasal challenge (day 28). Mean frequencies ± SEM are shown. Sixteen hours after the final nasal challenge, blood was sampled from mice, and levels of serum Cry j 1-specific IgE (C), IgG1 (D), and IgG2a (E) were determined by ELISA. Mean ODs ± SEM are shown. Results are representative of two independent experiments.



results suggest that CRTH2 deficiency affects infiltration of not only eosinophils but also T cells.

To clarify the link between CRTH2 deficiency and the relief of allergic symptoms, we further investigated cytokine production in vitro by cells from submandibular lymph nodes obtained the day after the final Ag challenge. The amount of IL-4 was 5-fold lower in CRTH2^{-/-} mice than in WT mice (Fig. 6F). Additionally, there was a slight reduction in the amount of IL-5 (Fig. 6G) and a slight

increase in the amount of INF-γ (Fig. 6I) in the cells from CRTH2^{-/-} mice, but the differences were not significant. On the contrary, the levels of IL-13 were significantly higher in CRTH2^{-/-} mice as compared with WT mice (Fig. 6H).

Additionally, mRNA levels of Th2 cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13), Th1 cytokine (INF-γ), proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-6 and TNF-α), and eosinophil-chemotactic chemokines (RANTES and eotaxin) in nasal mucosa were determined. The

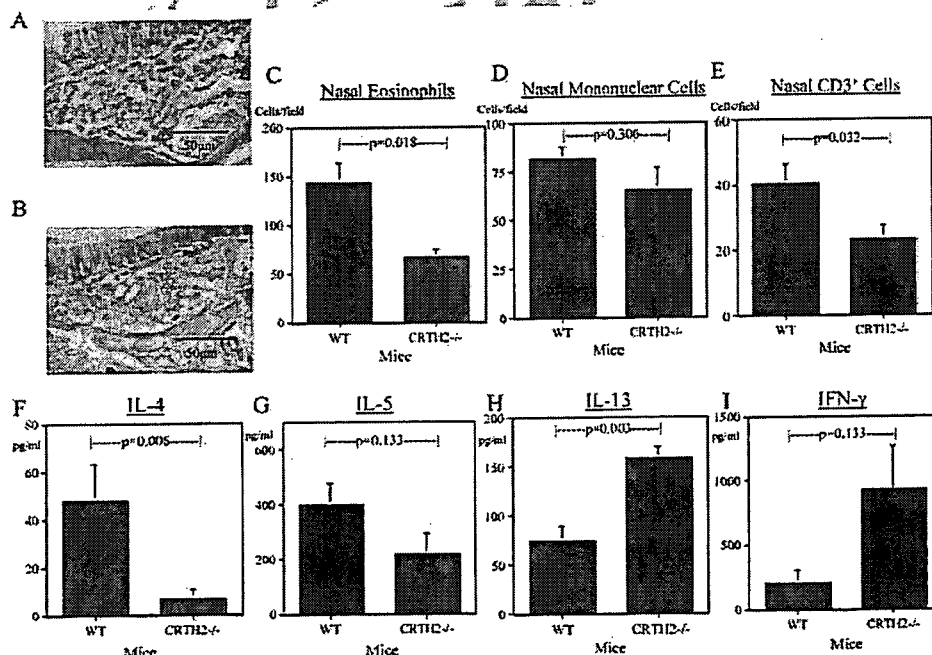
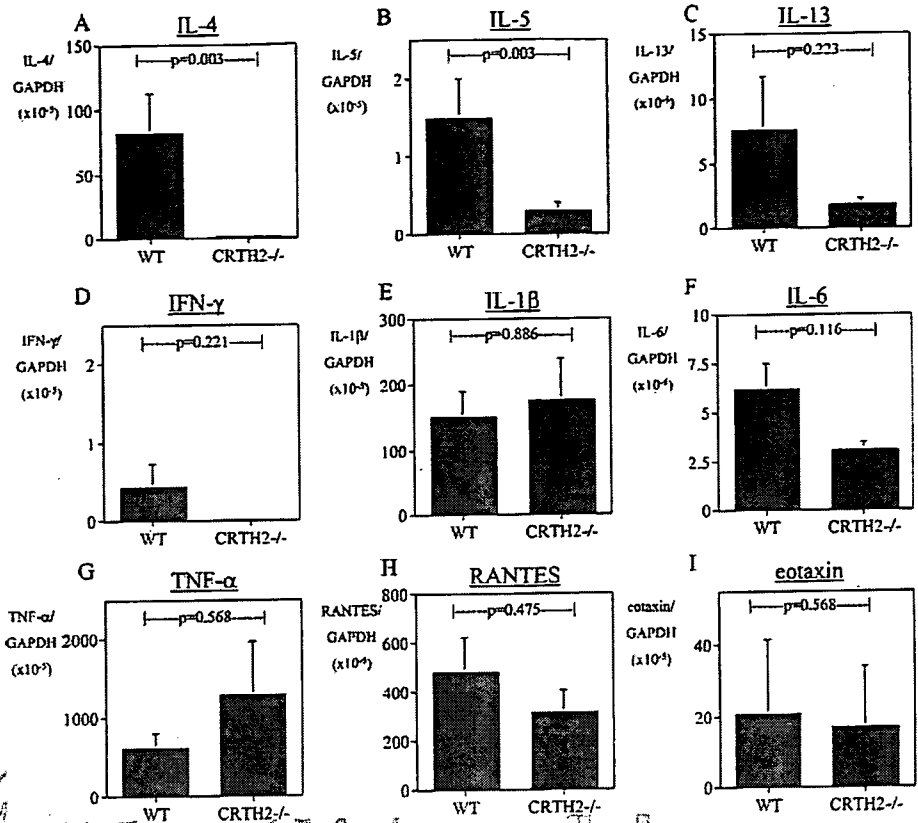


FIGURE 6. Histological changes and cytokine production by submandibular lymphocytes following nasal challenge with Cry j 1 in WT and CRTH2^{-/-} mice. WT (A) and CRTH2^{-/-} (B) mice were sensitized and challenged by intranasal administration of Cry j 1. Sixteen hours following the final nasal challenge with Cry j 1, nasal sections were collected, fixed, and decalcified, and eosinophils in nasal mucosa were detected by Luna stain. C, The number of eosinophils in the posterior portion of the nasal septum was determined per high-power (10 × 40) microscopic field. Mean numbers of infiltrating eosinophils per field ± SEM are shown. Numbers of mononuclear cells (D) and CD3⁺ cell (E) in the nasal septum were also determined. Sixteen hours after the final challenge with Cry j 1, submandibular lymph node cells were isolated and cultured with Cry j 1 for 72 h. IL-4 (F), IL-5 (G), IL-13 (H), and IFN-γ (I) were measured by ELISA. Mean concentrations ± SEM are shown. Results are representative of two independent experiments.

CRTH2 PLAYS A PROINFLAMMATORY ROLE IN MURINE POLLINOSIS

FIGURE 7. Relative amounts of cytokines/chemokines mRNA in nasal mucosa following nasal challenge with Cry j 1 in WT and CRTH2^{-/-} mice. Sixteen hours after the final nasal challenge with Cry j 1, mucosal tissues were removed from nasal septum. Relative amounts of IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C), IFN- γ (D), IL-1 β (E), IL-6 (F), TNF- α (G), RANTES (H), and eotaxin (I) mRNA were compared between WT and CRTH2^{-/-} mice. Results are the mean amounts of mRNA \pm SEM.



levels of IL-4 and IL-5 mRNA were significantly lower in CRTH2^{-/-} mice as compared with WT mice, whereas the levels of other cytokines/chemokines were similar between CRTH2^{-/-} and WT mice (Fig. 7). These results suggest that reduced nasal eosinophilia in CRTH2 deficiency is associated with reduced levels of IL-5 but not RANTES or eotaxin in this model. Additionally,

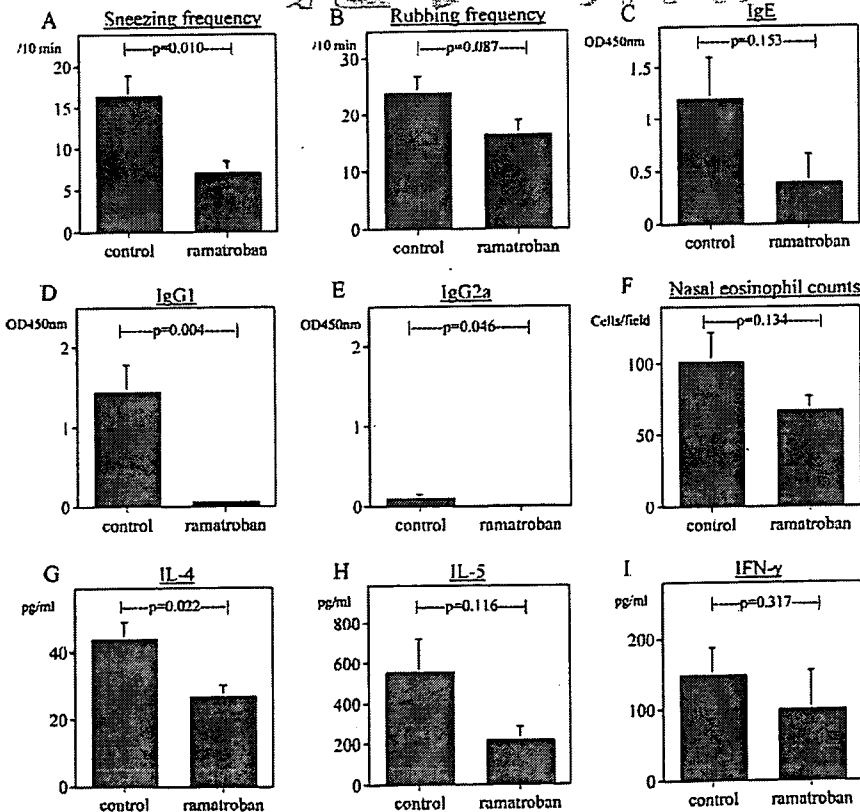


FIGURE 8. Effects of ramatroban on murine JCP. Ramatroban (30 mg/kg body weight), suspended in 5% methyl cellulose, was given orally once a day from 1 day before the first sensitization to the final challenge (day 0 to day 28). Control mice were given 5% methyl cellulose alone. After the final intranasal challenge, the frequencies of sneezing (A) and rubbing (B) were counted, and serum levels of Cry j 1-specific IgE (C), IgG1 (D), IgG2a (E), and nasal eosinophil count (F), as well as Cry j 1-induced IL-4 (G), IL-5 (H) and IFN- γ (I) were determined as described in *Materials and Methods*. Results are expressed as means \pm SEM.

AQ: K

it is suggested that CRTH2-mediated pathway may induce pathology without regulating local production of these proinflammatory cytokines.

Outcomes of pollinosis were compared between sensitized/challenged CRTH2^{-/-} mice and nonsensitized/single-challenged CRTH2^{-/-} mice. The levels of Cry j 1-specific IgE (0.159 ± 0.044 vs 0 ± 0 OD at 450 nm: *p* = 0.003), Cry j 1-specific IgG1 (0.638 ± 0.163 vs 0 ± 0 OD at 450 nm: *p* = 0.004), nasal eosinophilia (66.4 ± 8.2 vs 6.6 ± 1.1 cells/field: *p* = 0.005), and IL-4 production by submandibular lymph node cell (72.8 ± 31.1 vs 6.7 ± 3.8 pg/ml: *p* = 0.004) were significantly higher in sensitized and subsequently challenged CRTH2^{-/-} mice as compared with nonsensitized and single-challenged CRTH2^{-/-} mice. However, the frequencies of sneezing (1.7 ± 0.5 vs 0.6 ± 0.2 times in 10 min: *p* = 0.088) and rubbing (12.3 ± 2.6 vs 10.2 ± 3.1 times in 10 min: *p* = 0.516) were similar between two groups, suggesting that CRTH2 is particularly essential for the development of nasal symptoms.

Effect of ramatroban on Cry j 1-induced pollinosis

As seen in CRTH2-deficient mice, treatment with ramatroban significantly reduced several indicators of pollinosis including sneezing, Cry j 1-specific IgG1 production, and Cry j 1-induced IL-4 production by submandibular lymph node cells as compared with the control treatment (Fig. 8, A, D, and G). Although the differences did not reach to the statistical level, other parameters such as nasal rubbing, Cry j 1-specific IgE production, nasal eosinophilia, and Cry j 1-induced IL-5 production were also reduced by the treatment with ramatroban (Fig. 8, B, C, F, and H).

Discussion

In the present study, we analyzed the pathophysiological effects of nasal exposure to Cry j 1 in BALB/c mice. Mice sensitized with Cry j 1 without adjuvants showed not only allergic symptoms such as sneezing and rubbing but also produced Cry j 1-specific IgE and IgG1 and displayed nasal eosinophilia. Additionally, submandibular lymph node cells isolated from these mice produced IL-4 and IL-5 in recall response to Cry j 1. These results suggest that intranasal sensitization with Cry j 1 induces pollinosis in BALB/c mice.

To investigate the initiation of allergic rhinitis *in vivo*, administration of Ags via the natural route (i.e., through the nostril) is desirable. In fact, it is known that administration of Ags through different routes results in different degrees of IgE production (27, 28). Also, murine models of allergic rhinitis have been generated by intranasal or aerosol-mediated sensitization (8, 29), but these models generally employ adjuvants such as cholera toxin, which have immunoregulatory effects that may distort the physical sensitization (30, 31). Therefore, we and others have established murine models of allergic rhinitis by intranasal sensitization with Ags including *Schistosoma mansoni* egg Ag, phospholipase A₂ from honeybee venom, extracts of *Aspergillus fumigatus*, OVA, and trimellitic anhydride in the absence of adjuvants (5–7, 9, 32). We think that our current model is the first in which murine pollinosis was induced by intranasal sensitization with pollen allergen in the absence of an adjuvant. This model may be useful not only for understanding the pathophysiology of pollinosis but also for developing and/or testing new therapies for allergic rhinitis, especially JCP.

BALB/c mice sensitized with Cry j 1 showed an increase in the expression of CRTH2 mRNA in the nasal septum compared with control mice. This agrees with our recent report demonstrating that the amount of CRTH2 mRNA in nasal mucosa is significantly higher in patients with allergic rhinitis than in control subjects not

showing hypertrophy of inferior turbinates (12). These results suggest that the expression of CRTH2 may play a role in the pathogenesis of allergic rhinitis both in humans and in mice. In fact, it is known that the expression of CRTH2 in eosinophils and CD4⁺ T cells is elevated in atopic patients (33–35). CRTH2 is expressed by eosinophils and a subset of CD3⁺ T cells in nasal mucosa, especially in patients with allergic rhinitis (23). Because a mAb against murine CRTH2 that can be used for immunohistochemistry is not currently available, we could not investigate the phenotype of cells expressing CRTH2 in mice.

The pathophysiology of allergic rhinitis was clearly impaired in CRTH2^{-/-} mice. Following repeated intranasal sensitization and nasal challenge with Cry j 1, CRTH2^{-/-} mice displayed reduced nasal symptoms, production of Cry j 1-specific IgE and IgG1, and nasal eosinophilia compared with WT mice. Additionally, submandibular lymph node cells from Cry j 1-sensitized CRTH2^{-/-} mice produced significantly less IL-4 and IL-5 in response to Cry j 1 than those from WT mice. We think that the present results are the first demonstration of the *in vivo* role of CRTH2 in the initiation of Th2 responses in the upper airway.

We also found that Cry j 1-specific IgE and IgG1 but not IgG2a production was impaired in CRTH2^{-/-} mice. Ag-specific IgE/IgG1 and IgG2a production is known to be positively regulated by Th2 and Th1 responses, respectively, in mice (36). Thus, our results indicate that signals mediated by CRTH2 selectively enhance Th2-type Ab production. The decreased production of IL-4 by submandibular lymph node cells from CRTH2^{-/-} mice in response to Cry j 1 restimulation supports this result because IL-4 plays a critical role in IgE synthesis *in vivo* (37). Although whether CRTH2 activation directly leads to IL-4 production in mice remains unclear, recent investigations have demonstrated that PGD₂ causes the preferential induction of IL-4 production by Th2 cells in humans by binding to CRTH2 (38, 39). Additionally, our recent report showing that CRTH2 signals up-regulate CD40L in resting human Th2 cells supports our conclusions because the engagement of CD40 by CD40L is also essential for IgE isotype switching (39, 40).

After intranasal sensitization with Cry j 1, CRTH2^{-/-} mice developed a weaker eosinophilia than did WT BALB/c mice. This suggests that CRTH2 mediates local eosinophil recruitment in this model, which agrees with reports showing that CRTH2 activation leads to changes in eosinophil shape, chemotaxis, and degranulation *in vitro* (16, 18, 41). Additionally, recent investigations have revealed that CRTH2 plays a proinflammatory role in eosinophil chemotaxis into inflamed tissue *in vivo* (11, 12, 21, 24, 42). On the other hand, submandibular lymph node cells from WT and CRTH2^{-/-} mice produced similar amount of IL-5 after intranasal sensitization with Cry j 1. It is well known that IL-5 plays a critical role in eosinophilic inflammation, especially in mice (43). Although little is known about whether CRTH2 activation enhances IL-5 production in mice, CRTH2 activation on Th2 cells is known to induce IL-5 production in humans (38, 39). One explanation of why nasal eosinophilia was reduced in CRTH2^{-/-} mice irrespective of IL-5 production is that cognate interaction between PGD₂ and CRTH2 on eosinophils may have an additive effect on local eosinophil recruitment, primarily due to the action of IL-5. In fact, in a mouse model of asthma, nebulized DK-PGD₂, a CRTH2 agonist, exacerbates eosinophilic lung inflammation without changes in IL-5 content in lung (21).

CRTH2^{-/-} mice displayed a significantly lower frequency of both sneezing and nasal rubbing after the nasal challenge compared with the WT mice. Several molecules, including IL-5, CD80/CD86, H1, and CD39, have been shown to contribute to these symptoms via different mechanisms (38, 44–46). The present result suggests that activation of CRTH2 is also involved

in the symptoms of nasal hyperreactivity. In humans, nasal challenge with PGD₂ induces a sustained nasal obstruction but not sneezing or rhinorrhea (47). Whether murine mast cells express CRTH2 is not well known, and further investigations are needed to determine whether the effect of CRTH2 on nasal hyperreactivity is due to the control of Th2 responses or to a direct effect on mast cells.

Treatment with ramatroban, a CRTH2/TP dual antagonist, induced a reduction in several indicators of JCP such as sneezing, Cry j 1-specific IgG1 production, and Cry j 1-induced IL-4 production. It is known that ramatroban suppresses allergic responses including nasal signs both in vivo and in vitro (11, 24, 46, 48). For example, ramatroban significantly inhibited sneezing and nasal rubbing induced by Ag in actively sensitized C57BL/6 mice and guinea pigs (46, 48). Our present results are consistent with these reports and support the findings seen in CRTH2^{-/-} mice that suggest a proinflammatory role of CRTH2 in allergic rhinitis. On the other hand, treatment with ramatroban was less effective than CRTH2 deficiency in all parameters of investigation. One of the possible reasons is that ramatroban antagonizes not only CRTH2 but also TP. Since it is not fully elucidated whether signals through TP, especially in mice, are proinflammatory or antiinflammatory in allergic rhinitis, simultaneous blockage with TP may affect changes of the outcomes induced by CRTH2 antagonism.

In conclusion, we developed a novel model of murine allergic rhinitis that mimics pollinosis. Additionally, we found that CRTH2 plays an essential role in the initiation of allergic rhinitis in mice. These results suggest that this murine model will be useful for elucidating the pathophysiology of allergic rhinitis, especially JCP. These observations may provide a basis for developing therapeutic approaches for managing allergic rhinitis, specifically by inhibiting PGD₂-CRTH2 interactions in the nose of individuals with allergic rhinitis.

Acknowledgments

The authors thank Yuko Okano for her editorial assistance, and Ryohei Oya and Fumika Uno for their technical assistance in immunohistochemistry.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Bousquet, J., V. P. Cauwenberge, and N. Khaltaev. 2001. ARIA Workshop Report. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108 (Suppl.): S153-S161.

2. Asher, M. I., S. Montefort, B. Björkstén, C. K. Lai, D. P. Strachan, S. K. Weiland, H. Williams, and the ISSAC Phase Three Study Group. 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood. ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 368: 733-743.

3. Okuda, M. 2003. Epidemiology of Japanese cedar pollinosis throughout Japan. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 91: 288-296.

4. Harold, S. N. 2005. Advances in upper airway diseases and allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 676-684.

5. Okano, M., K. Nishizaki, M. Abe, M. M. Wang, T. Yoshino, A. R. Satoskar, Y. Masuda, and D. A. Harn. 1999. Strain-dependent induction of allergic rhinitis without adjuvant in mice. *Allergy* 54: 593-601.

6. Van de Rijin, M., P. D. Mehlhop, A. Judkins, M. E. Rothenberg, A. D. Luster, and H. C. Oettgen. 1998. A murine model of allergic rhinitis: studies on the role of IgE in pathogenesis and analysis of the eosinophil influx elicited by allergen and cotaxin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102: 65-74.

7. Farraj, A. K., J. R. Harkema, and N. E. Kaminski. 2004. Allergic rhinitis induced by intranasal sensitization and challenge with trimellitic anhydride but not with dinitrochlorobenzene or oxazolone in A/J mice. *Toxicol. Sci.* 79: 315-325.

8. Murasugi, T., Y. Nakagami, T. Yoshitomi, K. Hirahara, M. Yamashita, Y. Taniguchi, M. Sakaguchi, and K. Ito. 2005. Oral administration of a T cell epitope inhibits symptoms and reactions of allergic rhinitis in Japanese cedar pollen allergen-sensitized mice. *Eur. J. Pharmacol.* 510: 143-148.

9. Wang, Y., and C. T. McCusker. 2005. Interleukin-13-dependent bronchial hyper-responsiveness following isolated upper-airway allergen challenge in a murine model of allergic rhinitis and asthma. *Clin. Exp. Allergy* 35: 1104-1111.

AQ: E

10. Harris, S. G., J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, and R. P. Phipps. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 23: 144-150.

11. Shiraishi, Y., K. Asano, T. Nakajima, T. Oguma, Y. Suzuki, T. Shiomi, K. Sayama, K. Niimi, M. Wakaki, and J. Kagyo. 2005. Prostaglandin D₂-induced eosinophilic airway inflammation is mediated by CRTH2 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312: 954-960.

12. Okano, M., T. Fujiwara, Y. Sugata, D. Gotoh, M. Yoshihisa, M. Sogo, W. Tanimoto, M. Yamamoto, R. Matsumoto, N. Eguchi, et al. 2006. Presence and characterization of PGD₂-related molecules in nasal mucosa of patients with allergic rhinitis. *Am. J. Rhinol.* 20: 342-348.

13. Fujitani, Y., Y. Kanaoka, K. Aritake, N. Uodome, K. Okazaki-Hatake, and Y. Urade. 2002. Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J. Immunol.* 168: 443-449.

14. Honda, K., M. Arima, G. Cheng, S. Taki, H. Hirata, F. Eda, F. Fukushima, B. Yamaguchi, M. Hatano, T. Tokuhisa, and T. Fukuda. 2003. Prostaglandin D₂ reinforces Th2 type inflammatory responses of airways to low-dose antigen through bronchial expression of macrophage-derived chemokine. *J. Exp. Med.* 198: 533-543.

15. Okano, M., T. Fujiwara, M. Yamamoto, Y. Sugata, R. Matsumoto, K. Fukushima, T. Yoshino, K. Shimizu, N. Eguchi, M. Kuniwa, et al. 2006. Role of prostaglandin D₂ and E₂ terminal synthases in chronic rhinosinusitis. *Clin. Exp. Allergy* 36: 1028-1038.

16. Hirai, H., K. Tanaka, O. Yoshie, K. Ogawa, K. Kenmotsu, Y. Takamori, M. Ichimasa, K. Sugamura, M. Nakamura, S. Takano, and K. Nagata. 2001. Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J. Exp. Med.* 193: 255-261.

17. Kostenis, E., and T. Ulven. 2006. Emerging roles of DP and CRTH2 in allergic inflammation. *Trends Mol. Med.* 12: 148-158.

18. Gervais, F. G., R. P. G. Cruz, A. Châteauneuf, S. Gale, N. Sawyer, F. Nantel, K. M. Metters, and G. P. O'Neill. 2001. Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD₂ receptors CRTH2 and DP. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 982-988.

19. Heinemann, A., R. Schullig, L. Sabroe, A. Harnell, and B. A. Peskar. 2003. Δ¹²-Prostaglandin J₂, a plasma metabolite of prostaglandin D₂, causes eosinophil mobilization from the bone marrow and primes eosinophils for chemotaxis. *J. Immunol.* 170: 4752-4758.

20. Shichij, M., H. Sugimoto, K. Nagao, H. Inabe, J. A. Encinas, K. Takeshita, and K. B. Bacon. 2003. Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells activation in vivo increases blood leukocyte counts and its blockade abrogates 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin D₂-induced eosinophilia in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 518-525.

21. Spik, H. C., Brenuçon, V., Angeli, D., Staumont, S., Fleury, M., Capron, F., Trottein, and D. Dombrowicz. 2005. Activation of the prostaglandin D₂ receptor DP2/CRTH2 increases allergic inflammation in mouse. *J. Immunol.* 174: 3703-3708.

22. Chevalier, E., J. Stock, T. Fisher, M. Dupont, M. Fric, H. Fargeau, M. Lepoint, S. Soler, S. Fabien, M. P. Pruniaux, et al. 2005. Cutting edge: Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells plays a restricting role on IL-5 production and eosinophil recruitment. *J. Immunol.* 175: 2056-2060.

23. Nantel, F., C. Fong, S. Lamontagne, D. H. Wright, A. Gaiad, M. Desrosiers, K. M. Metters, G. P. O'Neill, and F. G. Gervais. 2004. Expression of prostaglandin D synthase and the prostaglandin D₂ receptors DP and CRTH2 in human nasal mucosa. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 73: 87-101.

24. Satoh, T., R. Moroi, K. Aritake, Y. Urade, Y. Kanai, K. Sumi, H. Yokozaki, H. Hirai, K. Nagata, T. Hara, et al. 2006. Prostaglandin D₂ plays an essential role in chronic allergic inflammation of the skin via CRTH2 receptor. *J. Immunol.* 177: 2621-2629.

25. Okano, M., Y. Sugata, T. Fujiwara, R. Matsumoto, M. Nishibori, K. Shimizu, M. Maeda, Y. Kimura, S. Kariya, H. Hattori, et al. 2006. E prostanoic acid (EP2)/EP4-mediated suppression of antigen-specific human T cell responses by prostaglandin E₂. *Immunology* 118: 343-352.

26. Okano, M., H. Hattori, T. Yoshino, Y. Sugata, M. Yamamoto, T. Fujiwara, A. R. Satoskar, A. A. Satoskar, and K. Nishizaki. 2005. Nasal exposure to Staphylococcal enterotoxin enhances the development of allergic rhinitis in mice. *Clin. Exp. Allergy* 35: 506-514.

27. Enander, B., and S. Ahlstedt. 1983. Regional and systemic immune responses to trinitrophenyl derivatives after intranasal and subcutaneous sensitization of mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71: 293-299.

28. Sakurai, K., H. Takenaka, Y. Yoneda, J. Tashiro-Yamaji, Y. Yamamoto, K. Lee, S. Yamaguchi, M. Miyoshi, Y. Kubota, and R. Yoshida. 2005. IgE production after four routes of injections of Japanese cedar pollen allergen without adjuvant: crucial role of resident cells at intraperitoneal or intranasal injection site in the production of specific IgE toward the allergen. *Microbiol. Immunol.* 49: 433-441.

29. Tamura, S., Y. Shoji, K. Hashiguchi, C. Aizawa, and T. Kurata. 1994. Effects of cholera toxin adjuvant on IgE antibody response to orally or nasally administered ovalbumin. *Vaccine* 12: 1238-1239.

30. Bomford, R. 1980. The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. I. Effect of the antibody response to bovine serum albumin and sheep red blood cells of Freund's incomplete and complete adjuvants, alhydrogel, *Corynebacterium parvum*, Bordetella pertussis, muramyl dipeptide and saponin. *Clin. Exp. Immunol.* 39: 426-434.

31. Valensi, J. P. M., J. R. Carlson, and V. G. A. Nest. 1994. Systemic cytokine profiles in BALB/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants. *J. Immunol.* 153: 3929-3939.

32. Okano, M., K. Nishizaki, A. R. Satoskar, T. Yoshino, Y. Masuda, and D. A. Ham. 1999. Involvement of carbohydrate on phospholipase A2, a bee-venom allergen, in *in vivo* antigen-specific IgE synthesis in mice. *Allergy* 54: 811-818.
33. Cosmi, L., F. Annunziato, M. Iasaki, G. Galli, R. M. E. Maggi, K. Nagata, and S. Romagnani. 2000. CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur. J. Immunol.* 30: 2972-2979.
34. Iwasaki, M., K. Nagata, S. Takano, K. Takahashi, N. Ishii, and Z. Ikezawa. 2002. Association of a new-type prostaglandin D₂ receptor CRTH2 with circulating T helper 2 cells in patients with atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 119: 609-616.
35. Hijinen, D., E. Nijhuis, M. Bruin-Weller, F. Holstege, M. G. Koerkamp, I. Kok, C. Bruijnzeel-Koomen, and E. Knol. 2005. Differential expression of genes involved in skin homing, proliferation, and apoptosis in CD4⁺ T cells of patients with atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 125: 1149-1155.
36. Snapper, C. M., and W. E. Paul. 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236: 944-947.
37. Okano, M., T. Yoshino, K. Nishizaki, A. R. Satoskar, F. Brombacher, A. A. Satoskar, M. Abe, Y. Takeda, and D. A. Ham. 2000. Interleukin-4 independent production of Th2 cytokines by nasal lymphocytes and nasal eosinophilia in murine allergic rhinitis. *Allergy* 55: 723-731.
38. Xue, L., S. L. yles, F. R. Wetley, L. Gazi, E. Townsend, M. G. Hunter, and R. Petipher. 2005. Prostaglandin D₂ causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells. *J. Immunol.* 175: 6531-6536.
39. Tanaka, K., H. Hirai, S. Takano, M. Nakamura, and K. Nagata. 2004. Effects of prostaglandin D₂ on helper T cell functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316: 1009-1014.
40. Hattori, H., M. Okano, S. Kariya, K. Nishizaki, and A. R. Satoskar. 2006. Signals through CD39 play a critical role in the pathophysiology of *Schistosoma mansoni* egg antigen-induced allergic rhinitis in mice. *Am. J. Rhinol.* 20: 165-169.
41. Monneret, G., S. Gravel, M. Diamond, J. Rokach, and W. S. Powell. 2001. Prostaglandin D₂ is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. *Blood* 98: 1942-1948.
42. Almishri, W., C. Cossette, J. Rokach, J. G. Martin, Q. Hamid, and W. S. Powell. 2005. Effects of prostaglandin D₂, 15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J₂, and selective DP₁ and DP₂ receptor agonists on pulmonary infiltration of eosinophils in Brown Norway rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313: 64-69.
43. Foster, P. S., S. P. Hogan, A. J. Ramsay, K. I. Maestrelli, and I. G. Young. 1996. Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 183: 195-201.
44. Asakura, K., H. Saito, M. Watanabe, H. Ogasawara, T. Matsui, and A. Kataura. 1998. Effects of anti-IL-5 monoclonal antibody on the murine model of nasal allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 116: 49-52.
45. Sato, J., K. Asakura, M. Murakami, T. Ueda, and A. Kataura. 1999. Suppressive effects of CTLA4-Ig on nasal allergic reactions in presensitized murine model. *Life Sci.* 64: 785-795.
46. Kayasuga, R., Y. Sugimoto, T. Watanabe, and C. Kamci. 2002. Participation of chemical mediators other than histamine in nasal allergy signs: a study using mice lacking histamine H₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 449: 287-291.
47. Doyle, W. J., S. Boehm, and D. P. Skoner. 1990. Physiologic responses to intranasal dose-response challenges with histamine, methacholine, bradykinin, and prostaglandin in adult volunteers with and without nasal allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 86: 924-935.
48. Narita, S., K. Asakura, and A. Kataura. 1996. Effects of thromboxane A2 receptor antagonist (Bay u 3395) on nasal symptoms after antigen challenge in sensitized guinea pigs. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 109: 161-166.

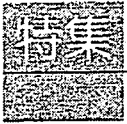
© AAAI
DISTRIBUTION
PROHIBITED

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

1

- A—AU: Please confirm that the title and all author names appear as intended.
- B—AU: Please indicate the correct surname (family name) of each author for indexing purposes.
- C—AU: Supplier okay as set? (as Hamilton Medical site)?
- D—AU: Cite panels *E* and *I* of Fig. 8 in text?
- E—AU: Please verify the bibliographic information in Ref. 1.
- F—AU: Please verify address for correspondence.
- G—AU: Please check that abbreviations/definitions are okay as added?
- H—AU: Please rephrase sentence for improved clarity with regard to the “respective” relationship established.
- I—AU: Change 27 to 28? (as in *Materials and Methods*)
- J—AU: On the proofs, please stipulate that panels *G*, *H*, and *I* be changed to *E*, *F*, and *G*, respectively, on the figure proper (in accordance with the caption and text citations of Fig. 3). Note that the changes can be made digitally at the press (i.e., there is no need to supply new files; instead, mark/annotate the changes on the proofs on Fig. 3).
- K—AU: Phrasing okay as changed to specify that IL-4, IL-5, and IFN- γ were all induced by Cry j
1?
-



IV. 耳鼻科

3) アレルギー性鼻炎の新しい治療薬開発の現状 —免疫療法薬を中心に—

Okano Mitsuhiro

岡野 光博

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学准教授

Summary

アレルギー性鼻炎に対して現在開発が進んでいる免疫療法薬は、抗原特異的な治療薬と非特異的な治療薬に大別できる。抗原特異的な治療薬はアレルゲンエキスの開発ということになるが、非アナフィラキシー型の治療エキスとしてペプチド、化学修飾アレルゲン、キメラタンパクなどが展開されている。さらに治療効率を高めるアジュバントとして、MPLやCpG-DNAが利用されている。抗原非特異的な治療薬としては、アレルギー性鼻炎の病態関連分子を標的とした抗体医薬や衛生仮説を背景とした微生物ワクチンなどが期待されている。

Key Words

ペプチド/化学修飾アレルゲン/アジュバント/抗体医薬/微生物ワクチン

はじめに

現時点でアレルギー性鼻炎の治癒、または長期寛解を期待できる唯一の治療法は特異的免疫療法(減感作療法)である。しかしながら、長期にわたる治療を要する上に効果発現が遅い点や、稀にアナフィラキシーなどの重篤な副反応を生じることから、一般の普及に至っていないのが現状である。現在、これらのデメリットを改善すべく、治療用抗原エキスやアジュバントの開発が進んでいる。また基礎的な検討を介してアレルギー性鼻炎の制御に重要な分子が明らかになりつつあり、非特異的免疫療法として抗体医薬や微生物ワクチ

ンなどの臨床研究が展開されている(表1)。本稿では、古典的な免疫療法に代わりうる、より即効性でかつ安全性が高く新しい根治療法となりうる治療薬を紹介し、その臨床応用の可能性および考えられる問題点について概説する。

I. 特異的免疫療法薬の開発

1. 治療用抗原エキスの開発

WHO見解書などのガイドラインでは、抗原特異的免疫療法においては一回あたり5~20 μ gの抗原投与が推奨されている。一方、高用量の抗原投与はアナフィラキシーなどの重篤な副反応を生じるリスクを高める。そこで高い安全性をもちア

表1 研究開発が進んでいる免疫療法薬

特異的免疫療法薬	非特異的免疫療法薬
<ul style="list-style-type: none"> ・治療用抗原エキスの開発 <ul style="list-style-type: none"> ・ペプチド ・化学修飾アレルゲン ・キメラタンパク など ・アジュバントの開発 <ul style="list-style-type: none"> ・ Monophosphoryl lipid (MPL) ・ DNA ・ Alum ・ リボソーム など 	<ul style="list-style-type: none"> ・抗体医薬 <ul style="list-style-type: none"> ・抗 IgE 抗体 ・抗 CCR4 抗体 など ・微生物ワクチン <ul style="list-style-type: none"> ・プロバイオティクス ・抗酸菌製剤 (<i>M. vaccae</i> など) など

レルゲン投与量を増加させるための戦略として、原則としてアナフィラキシーをおこさないアレルゲンエキスの開発が進められている。

1) ペプチド

免疫応答の司令塔である T 細胞はアレルゲン全体を認識するのではなく、抗原提示細胞に捕捉されアミノ酸 10 個前後に分解されたアレルゲンペプチド (T 細胞エピトープ) を MHC (major histocompatibility complex) クラス II 分子と共に認識する。ペプチド免疫療法とはこの T 細胞エピトープとなるペプチドを用いた免疫療法である (図 1)。IgE (immunoglobulin E) はアレルゲンの 3 次元的な構造を認識するとされ、アミノ酸残基 15 前後のペプチドは、通常 IgE に認識されない。また抗原やペプチドの高用量投与は免疫寛容を誘導することが実験的・臨床的に知られている。

スギ花粉症においては、Cry j 1 および Cry j 2 上の主要 T 細胞エピトープが同定され、これらをアルギニンダイマーではさみ直列につないだ多重ペプチド (Cry- コンセンサス) が合成され、臨床試験が進められている¹⁾。

一方、ペプチド療法の問題点もいくつか挙げられている。例えば個々の患者 T 細胞が認識するペプ

チドが必ずしも同一でないことがあり、将来はオーダーメイドのペプチド療法が必要かもしれない。さらにネコアレルゲンペプチド (ALLERVAX[®] CAT) など現在までに示された臨床試験ではペプチド投与による気道症状の発現が少なからずみられることから、アナフィラキシーを完全に克服する戦略、例えば後述する抗 IgE 抗体との併用療法の構築も必要であろう²⁾。

2) 化学修飾アレルゲン

グルタルアルデヒドなどによりアレルゲンを重合 (polymerization) させると、IgE への結合性が著明に減弱する。従って短期間に高用量の投与が期待されている。

カモガヤとオリーブのみに花粉症を有する鼻炎患者を対象にした二重盲検試験が報告されている³⁾。投与の翌シーズンにおいてグルタルアルデヒド重合アレルゲンワクチンを投与した群 (n = 28) ではプラセボ群 (n = 25) に比較して、花粉飛散期の症状スコアおよび薬物スコアが有意に低値を示した (p < 0.001)。さらに花粉飛散期の QOL (quality of life) もグルタルアルデヒド重合アレルゲンワクチン投与群で有意に良好であった (p < 0.05)。

MHC (major histocompatibility complex) IgE (immunoglobulin E) QOL (quality of life)

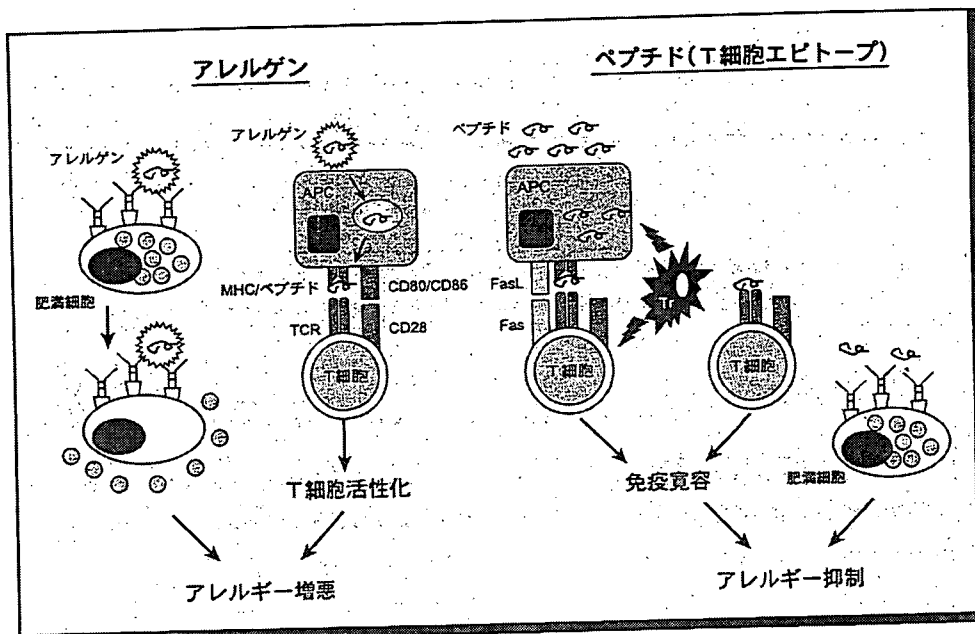


図1 ペプチド免疫療法の作用機序
 アレルゲンペプチドの投与は、原則的には肥満細胞の脱顆粒をおこすことなく、免疫寛容を誘導する。

多くの報告で全身的な副反応はみられないか軽度であり、10倍量換算の投与でも安全性は通常のアレルゲンエキスと同等であるとの報告もみられる⁴⁾。一方、通常法を含む他の免疫療法との有効性の比較を行った報告はほとんどなく、化学修飾による有効性の改善に関しては今後の検討が必要である。

3) キメラタンパク

より抗原特異的な免疫抑制を誘導する目的で、アレルゲンに抑制シグナルを誘導する分子を遺伝子工学的に結合させたキメラタンパクが考案されている。肥満細胞、好塩基球、あるいは好酸球などには抑制性IgG受容体であるFcγRIIbが発現している。FcγRIIbは細胞質内ドメインにITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) を有しており、この受容体を介するシグナ

ルは肥満細胞/好塩基球の脱顆粒や好酸球性炎症を抑制する⁵⁾。この特性を利用して、ヒトIgGのFc部分にネコ主要アレルゲンであるFel d1を結合させたキメラ抗体gamma-Fel d1 (GFD) が考案されている。GFDはFcγRIIbおよびIgEの両者に結合する。さらにGFDはFel d1によって誘発される局所および全身反応を抑制し、一方GFD自身はアナフィラキシー反応を誘導しないことから、ネコアレルギーに対する新規治療エキスとしての有効性が示された⁶⁾。本キメラタンパクは、花粉やダニなど他の吸入系アレルゲンへの応用も理論的には可能であり、一層の研究の進展が期待されている。

2. アジュバントの開発

アレルゲンエキスの活性を増強することにより有効性を向上することを目的としている。また投

ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) GFD (gamma-Fel d1)

与アレルギー量を減弱できることから、副反応の防止にもつながる。特に、細菌由来のアジュバントのなかには自然免疫の活性化を介してTh2からTh1への免疫偏向を誘導し、有効性をより向上できることが期待できるものがある。MonophospholipidとCpG-DNAがその代表である。

1) Monophosphoryl lipid (MPL)

Monophosphoryl lipid (MPL)はサルモネラ菌(*S. Minnesota* R595株)リポ多糖(LPS)より抽出し、無毒化したものである。Toll-like receptor (TLR)-4アゴニストとして働き、Th2からTh1への免疫偏向を誘導する。欧州では、アレルギー性鼻炎—MPL結合エキス(Pollinex® Quattro)が開発され、イネ科花粉やブタクサ花粉などで臨床応用されている。イネ科花粉症を対象とした二重盲検試験(n=124)では、花粉飛散前にイネ科花粉—MPL結合エキスを投与(4回皮下注射)したところ、花粉飛散期の鼻症状、眼症状および症状薬物スコアを有意に改善している⁷⁾。局所反応はPollinex® Quattro投与群で高率であったが、全身反応は二群の間で差を認めなかった。本邦での開発は未だなく、スギやヒノキなど樹木アレルギーにおける有効性の検討が望まれる。

2) CpG-DNA

細菌には、樹状細胞などに発現するTLR-9に結合するDNA配列であるCpGモチーフが選択的かつ豊富に含まれる。TLR-9を介する自然免疫はTh1への免疫偏向を強力に誘導するため、アレルギー治療薬としてCpG-DNA、すなわちTLR-9アゴニストを利用したワクチン開発が進められている。

ただしCpG自身は抗原非特異的に作用し、さらに強力なTh1誘導作用による副作用(自己免疫

疾患の発生など)が危惧される。そこで抗原特異性を持たせ、かつCpG量を減らすために、CpGとアレルギーを混合するか、あるいは結合する試みがなされている。海外ではブタクサ花粉症患者を対象にブタクサアレルギーAmb a 1にCpGを結合させたワクチン(Amb a 1-immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide conjugate; AIC)を用いた臨床試験が行われている。花粉飛散前に一週おき6回の漸増注射を行うことにより2シーズン目の鼻症状の軽快傾向と鼻粘膜局所でのTh1への免疫偏向が誘導される⁸⁾。また最近報告された二重盲検試験では、同様の注射で初年度のみならず2シーズン目の症状をも有意に抑制し、長期にわたる有効性が示された。またAIC投与群ではプラセボ群に比較して、皮膚反応の抑制、飛散期のブタクサ特異的IgE抗体価上昇の抑制、IL(interleukin)-4陽性好塩基球比率の低下がみられた⁹⁾。

II. 非特異的免疫療法薬の開発

1. 抗体医薬

抗体医薬は各種疾患の病態に関連した分子に特異的な抗体を利用した新規治療法である。利点として、作用が標的分子に特異的であること、ヒト化させることにより毒性が少ないこと、血中半減期が長いことなどが挙げられる。一方、欠点としては、高コストであること、および標的となりうる分子が有限(300~400分子)と予想され、対象疾患としては癌、免疫疾患、感染症などに限定していることなどが挙げられる(表2)。アレルギー性鼻炎は免疫疾患のひとつとして、その罹患率の多さからも研究開発のターゲットとなっている。現在までに抗IgE抗体および抗CCR4抗体に

MPL (Monophosphoryl lipid)	LPS (リポ多糖)	TLR (Toll-like receptor)	
AIC (Amb a 1-immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide conjugate)			IL (interleukin)

表2 本邦での抗体医薬の現状

一般名	製品名	標的	適応症
上市済み抗体			
トラスツマブ	ハーセプチン	HER2	乳癌
リツキシマブ	リツキサン	CD20	非ホジキンリンパ腫
バシリキシマブ	シムレクト	CD25	急性拒絶反応
バリヒスマブ	シナジス	Fタンパク	RS ウイルス感染症
インフリキシマブ	レミケード	TNF- α	関節リウマチ
トシリスマブ	アクテムラ	IL-6	キャッスルマン病
ゲムツマブオゾガマイシン	マイロターグ	CD33	急性骨髄性白血病
ベシスマブ	アバスタ	VEGF	結腸・直腸癌
申請中抗体			
アダリムマブ	ラヒーラ/ヒュミラ	TNF- α	関節リウマチ
オマリスマブ	ゾレア	IgE	気管支喘息
セツキシマブ	アービタックス	EGFR	結腸・直腸癌
開発中(国内)抗体			
マツマブ		EGFR	胃・肺小細胞・大腸癌
KW-0761		CCR4	血液癌・アレルギー性鼻炎(欧州)
ゴリムマブ		TNF- α	関節リウマチ
BIW-8405		IL-5	気管支喘息

ついて臨床試験が行われている。

1) 抗IgE抗体

アレルギー性鼻炎はI型アレルギーであり、アレルギー特異的IgE抗体が発症に中心的に作用することは論をまたない。

抗IgE抗体(オマリスマブ)は、血中のIgEレベルを減少させ、IgEの肥満細胞や好塩基球への固着を阻止することによるI型アレルギーの抑制を目的としている。作用機序としては、血中のIgEレベルを減少することの他に、肥満細胞、好塩基球、あるいは樹状細胞のFc ϵ R1発現を抑制することが知られている。

花粉症患者を対象とした検討で、抗IgE抗体の

投与によって、花粉飛散期の血中IgEを低下させるのみならず、鼻粘膜内のEPX(eosinophil protein X)陽性好酸球数やIgE陽性細胞数の有意な減少がみられる¹⁰⁾。本邦でもスギ花粉症を対象に二重盲検試験が行われた。花粉飛散約1カ月前からの皮下注射によりプラセボ群と比べ有意に鼻症状の改善(軽症化)がみられ、レスキュー薬の使用も有意に少ないことが示された(図2)。一方、注射局所の紅斑や浮腫はプラセボに比べ有意に高率に認め、また因果関係は不明であるが実薬投与群で潰瘍性大腸炎の合併を一例に認めた¹¹⁾。I型アレルギー反応を抑える究極の治療法とも言えるが、厳密な意味での根治療法ではなく、また長期

EPX (eosinophil protein X)

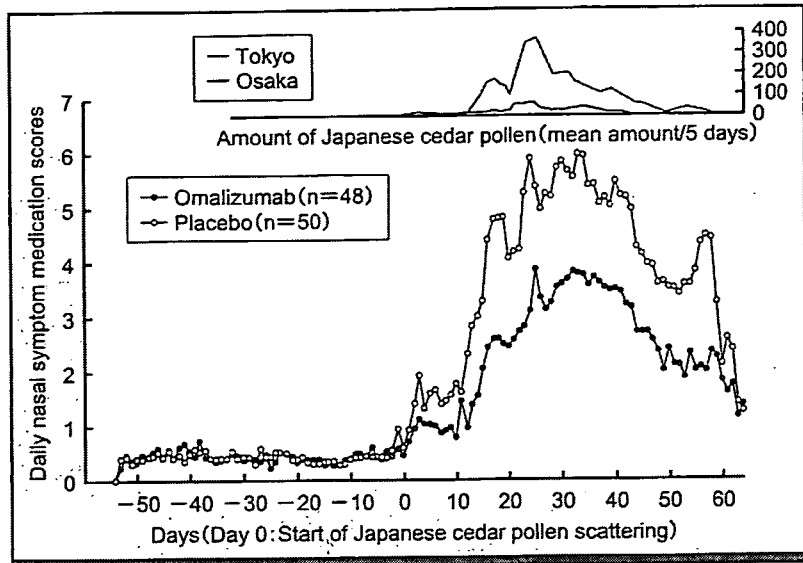


図2 スギ花粉症に対する抗IgE抗体の効果
抗IgE抗体の投与は、スギ花粉飛散期の症状薬物スコアを有意に改善する。
(文献11より引用)

的な安全性と有効性は確立していない。

2) 抗CCR4抗体

CCR4はケモカイン受容体であり、リガンドはTARC(CCL17)およびMDC(CCL22)である。これらケモカインのアレルギー性鼻炎における重要性が明らかになっている。例えばアレルギー性鼻炎患者由来の樹状細胞は健康人由来の樹状細胞に比較してMDCの産生能が有意に高く、さらにMDCはアレルギー性鼻炎患者由来のT細胞を選択的に遊走させる¹²⁾。また末梢ではCCR4はTh2細胞に選択的に発現されることから、CCR4をブロックする薬剤はTh2型の疾患に対する治療薬となる可能性が期待されている。抗CCR4抗体(KW-0761)はこれらの炎症細胞の血流から鼻粘膜局所への移行を阻止し、アレルギー性炎症を制御することを目的としている。本邦では成人T細胞白血病やリンパ腫を対象に開発しているが、欧州ではアレルギー性鼻炎を対象に臨床試験を計

画中である。

2. 微生物ワクチン

アレルギー疾患が増加した要因として“衛生仮説(hygiene hypothesis)”，すなわち衛生環境の改善による感染症リスクの低下がアレルギー増加の一因であるという仮説が提唱されている。ガイドラインにも、アレルギー性鼻炎増加の主因のひとつとして副鼻腔炎や幼児期の感染の減少による鼻粘膜Th1からTh2へのバランスの傾斜が挙げられている。そこで、免疫偏向/抑制を誘導するような微生物や菌体成分を利用したワクチンをアレルギー性鼻炎の治療に用いる試みがなされている(表3)。

1) プロバイオティクス

プロバイオティクスは、腸内フローラのバランスを改善することによりヒトに有益な生理作用をもたらす生きた微生物と定義される。乳酸菌やビフィズス菌がその代表である。出生前後の乳酸菌

表3 微生物ワクチン

微生物ワクチン	菌種	受容体	作用
プロバイオティクス	<i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcus</i>	TLR-2?	IL-10 腸内細菌叢の正常化
CPG-DNA		TLR-9	Treg > Th1
エンドトキシン		TLR-4	Th1 (IL-12)
抗酸菌	BCG <i>M. vaccae</i>	TLR-2	Th1 CD4 ⁺ CD45 ⁺ Rb ^{low}
蠕虫		TLR-3?	IL-10

(*Lactobacillus rhamnosus* LGG 株) 摂取がアトピー性皮膚炎の発症を半減させることが報告され、アレルギー疾患に対する予防および治療効果が注目されるようになった¹³⁾。スギ花粉症患者においても、腸球菌 (*Enterococcus faecalis* FK-23 株) や乳酸菌 (*L. acidophilus* L-92 株)、あるいはビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum* BB536 株) の摂取が花粉飛散期の鼻炎症状を軽減させることが報告されている。なかでも BB536 入りのヨーグルト摂取は鼻漏と鼻閉を有意に改善し、さらに花粉飛散に伴う血清 TARC 値の上昇を有意に抑制し、スギ特異的 IgE 抗体価の上昇を抑制する傾向を示した¹⁴⁾。

2) 抗酸菌製剤

結核菌などの抗酸菌は強力な Th1 誘導物質である。榎本らによりツベルクリン反応(ツ反)と血清総 IgE 量が有意に逆相関することが示され、抗酸菌を利用したアレルギー疾患の予防・治療が試みられている¹⁵⁾。マウスアレルギー性鼻炎モデルでは、ツ反試薬 PPD (purified protein derivative) の点鼻投与は抗原特異的 IgE 産生や鼻粘膜内好酸球浸潤を抑制し、予防効果がみられた¹⁶⁾。

花粉症に関しては、非病原性の抗酸菌である

Mycobacterium vaccae や BCG を用いた臨床試験が国内外で進められている。臨床効果に関する結論は未だ示されていないが、少なくともマウスモデルと同様に本製剤投与により血清中アレルギー特異的 IgE 抗体価の抑制が示された¹⁷⁾。

このように微生物ワクチンのアレルギー性鼻炎への効果は期待されるが、一方でいくつかの問題点も指摘されている。例えば BCG 接種による予防効果は、人種など遺伝的素因により左右される可能性が指摘されている。CpG に関してもマウスではその効果に系統差がみられる。臨床効果をより普遍的にするためには pharmacogenetics 的解析により適応となる患者を選択できるような方法を開発する必要があるかもしれない。さらに用いる菌種・菌株の処理方法(生菌または死菌)、投与経路、投与量(菌数)および投与時期(花粉症であれば予防効果か治療効果か)などの詳細な検討が望まれる。

まとめ

以上、アレルギー性鼻炎に対する新しい免疫治療薬として、ペプチド、化学修飾アレルギー、キメラタンパク、アジュバント (MPL, CpG-

PPD (purified protein derivative)

DNA), 抗体医薬, 微生物ワクチンなどを取り上げた。紙面の都合で今回は省いたが, これら以外にも注目される新規治療法として, 抗IL-5などの抗サイトカイン療法, IL-12などをターゲットにした遺伝子治療, あるいはリポソームや Alum をアジュバントとして用いる試みがなされている。また古典的な特異的免疫療法に関しても不便で不快さを伴う経皮的免疫療法から, 自己投与ができれば不快さの少ない経口, 舌下, あるいは経鼻といった局所免疫療法の開発も進みつつある。今回述べた治療法の中には近い将来実用化されるものがあるであろう。その時までには我々は患者の要求に応えられるだけの情報を集積し, その適応について十分に吟味し準備しておく必要がある。

文 献

- 1) Sone T, Morikubo K, Miyahara M et al : T cell epitopes in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens: choice of major T cell epitopes in Cry j 1 and Cry j 2 toward design of the peptide-based immunotherapeutics for the management of Japanese cedar pollinosis. *J Immunol* 161 : 448-457, 1998
- 2) Cassale TB, Busse WW, Kline JN et al : Omalizumab pre-treatment decreases acute reactions after rush immunotherapy for ragweed-induced seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 117 : 134-140, 2006
- 3) Alvarez-Ceusta E, Aragonese-Gilsanz E, Martin-Garcia C et al : Immunotherapy with depigmented glutaraldehyde-polymerized extracts : changes in quality of life. *Clin Exp Allergy* 35 : 572-578, 2005
- 4) Casanovas M, Sastre J, Fernandez-Neito M et al : Double-blind study of tolerability and antibody production of unmodified and chemically modified allergen vaccines of *Phleum pratense*. *Clin Exp Allergy* 35:1377-1383, 2005
- 5) Watanabe T, Okano M, Hattori H et al : Roles of Fc γ R I B in nasal eosinophilia and IgE production in murine allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 169 : 105-112, 2004
- 6) Zhu D, Kepley CL, Zhang K et al : A chimeric human-cat fusion protein blocks cat-induced allergy. *Nat Med* 11 : 446-449, 2005
- 7) Drachenberg KJ, Wheeler AW, Stuebner P, Horak F : A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy* 56 : 498-505, 2001
- 8) Tulic MK, Fiset P-O, Christodoulouopoulos P et al : Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* 113 : 235-241, 2004
- 9) Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG et al : Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Eng J Med* 355 : 1445-1455, 2006
- 10) Plewako H, Arvidsson M, Petruson K et al : The effect of omalizumab on nasal allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 110 : 68-71, 2002
- 11) Okubo K, Ogino S, Nagakura T, Ishikawa T : Omalizumab is effective and safe in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int* 55 : 376-386, 2006
- 12) Yanai M, Sato K, Aoki K et al : The role of CCL22/macrophage-derived chemokine in allergic rhinitis. *Clin Immunol* 125 : 291-298, 2007
- 13) Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H et al : Probiotics in primary prevention of atopic diseases : a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 357 : 1076-1079, 2001
- 14) Xiao J-Z, Kondo S, Yanagisawa N et al : Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis : a double-blind placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy* 36 : 1425-1435, 2006
- 15) Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S et al : The inverse association between tuberculin response and atopic disorder. *Science* 275 : 77-79, 1997
- 16) Hattori H, Okano M, Yamamoto T et al : Intranasal application of purified protein derivative (PPD) suppresses the initiation but not the exacerbation of allergic rhinitis in mice. *Clinical and Experimental Allergy* 32 : 951-958, 2002
- 17) Cavallo GP, Elia M, Giordano D et al : Decrease of specific and total IgE levels in allergic patients after BCG vaccination : preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128 : 1058-1060, 2002

中等症以上の小児スギ花粉症患者に炭酸ガスレーザーによる下鼻甲介表面蒸散術を週1回3週間連続して施行した。第2世代抗ヒスタミン薬での治療症例を薬物療法群とした。2007年度の症状スコアはレーザー群と薬物療法群に有意差はなかった。最重症時の薬物症状スコアはレーザー群 3.0 ± 1.4 、薬物療法群 5.2 ± 2.6 であった。アンケート結果は、著効 24%、薬物療法群では、著効 28%であった。JRQLQ による QOL の評価では両群間に有意差はなかった。手術の越年効果はみられなかったが、抗原誘発による鼻腔容積変化率には差が認められた。

A 研究目的

通年性アレルギー性鼻炎に対するレーザー治療は1983年我々が初めて報告した治療であり、その有効性は確立されてきている²⁾。これまでの通年性アレルギー性鼻炎症例への検討からは、本治療は重症症例への効果は不十分だが中等症症例への有効性は高かった。症状別評価では鼻閉に対する長期成績に優れ、7年成績56%であった。また1年以上有効であった症例への再照射は同程度の期間有効であった。従って、薬物療法や免疫療法との比較においても、患者数の最も多い中等症鼻閉型の症例に関しては時間的経済的費用対効果に優れた治療といえた。炭酸レーザー以外にも今日ホットナイフと呼ばれる多くの手術装置が開発されている。炭酸ガスレーザーと同様の非接触型ホットナイフで、同様の作用機序をもつアルゴンプラズマ凝固装置 (APC) の通年性アレルギー性鼻炎の外科的治療の有効性を報告されてきている^{3) 4) 5)}。我々も一昨年の本補助金によって通年性アレルギーに対する APC の QOL 評価とアンケートによる有効性を検討し、炭酸ガスレーザーと同程度の有効性が認められることを報告してきた。一方、レーザーによる花粉症治療は、十分な臨床研究のないまま、現在多くの耳鼻咽喉科医療施設で行われ、マスコミにも頻繁にとりあげられている。時間的空間的に変動する花粉飛散量に伴って重症度も変動する花粉症に対する治療有効性の検討は同一施

設同一時期に行う必要があり、さらに手術療法の場合は同一術者が同一装置を用いて行わねばならず一層の困難を伴い、これまで我々の点鼻ステロイド薬との比較試験以外見られなかった。また、小児症例での検討は患者およびの同意を確認する点でさらに困難である。薬物療法においても、小児症例でのスギ・ヒノキ花粉症に対する臨床効果の検討を行わず、データのとりやすい通年性アレルギーの有効性を根拠に、スギ・ヒノキ花粉症治療にも投薬されている場合が多い。これらの問題点に対し、昨年度の本研究では炭酸ガスレーザーによる下鼻甲介粘膜表面の蒸散手術の花粉症に対する有効性を症状と QOL から評価し、季節前に炭酸ガスレーザー治療を行った症例が1年後の翌年度の花粉症に対し、どの程度効果が持続したかといういわゆる越年効果をアンケートと季節外の抗原誘発検査から検討した。本年度は小児スギ・ヒノキ花粉症症例に対する炭酸ガスレーザー治療の効果を検討した。さらに、炭酸ガスレーザー以外のホットナイフの検討として、炭酸ガスレーザーとは作用機序の異なる接触型ホットナイフのラジオ波凝固装置による下鼻甲介粘膜 ablation と粘膜凝固手術の通年性アレルギー症例およびスギ・ヒノキ花粉症症例への効果を検討した。

B 対象と方法

① 小児花粉症に対するレーザー治療の検討
前年度中等症以上のスギ花粉症症状を有し、保護者

および本人がレーザーによる花粉症治療を希望した8才から12才の学童24名(男児10名、女児14名)を対象とした。原則的に抗ヒスタミン薬の内服と点鼻ステロイドの薬物治療は禁止したが、rescue drugとして症状増悪期のエピナスチン錠の頓用内服はみとめ、日記への記載を指示した。点眼用抗ヒスタミン薬、マスクの装用は認めた。鼻中隔彎曲の高度な症例、通年性アレルギー性鼻炎や喘息を発症している症例は除外した。但し、RAST法でダニ抗体陽性でも鼻炎症状や喘息症状のない症例は対象とした。対象症例には2006年11月中旬から2007年1月中旬までの間に炭酸ガスレーザーによる下鼻甲介表面蒸散術を週1回3週間連続して施行した。8名は術前にスギ花粉ディスクによる症状誘発ができ、うち4名には2007年10月にも抗原誘発による症状誘発ができた。また、前年度度中等症以上の症状が発症した10才から12才の学童で、本年度は抗ヒスタミン薬であるエピナスチン錠(10mg)を2月1日から飛散終了まで服用した20人をコントロール群とした。

レーザー照射の方法は局所麻酔剤と血管収縮剤を等量混合した液に浸した綿花片にて鼻粘膜を30分表面麻酔し、炭酸ガスレーザー装置(モリタ社製)を用いて出力3.0ワットで下鼻甲介粘膜を可及的広範囲に焼灼した。両側鼻粘膜への治療時間は約5分で術後ガーゼタンポンは挿入せず全例同様の手技で治療は終了した。

スギ花粉症への治療効果への評価は、花粉日記から奥田の分類により symptom score を、薬物併用例では symptom medication score で行った。それ以外にシーズンを通しての評価をアンケートした。アンケート調査により、鼻症状に関して、花粉シーズン中ほとんど症状がなかった場合を著効、シーズン中たまに症状があったが生活に支障のなかった場合を有効、rescue drugが必要だったが生活に支障はなかったものを無効1、レーザー治療は効果がなく、いつものシーズンと変わりなく生活に支障があり苦痛であったものを無効2とした。2週間以上感冒やインフルエンザを合併した2症例は対象から除外した。コントロール群では、ほとんど症状がなかった場合を著効、たまに症状があっても生活に支障がなかった場合を有効、エピナスチン以外の薬物療法が必要

だったが、生活に支障はなかったものを無効1、エピナスチンは効果がなくいつものシーズンと変わりなく生活に支障があり苦痛であったものを無効2とした。QOLの評価はJRQLQによって最も重症であった日の症状別領域別によって行った。抗原誘発試験は2003年11月にレーザー照射を施行した症例に対し照射前、照射1ヶ月後、翌年および翌々年10月に行った。スギ標準化抗原エキス(トリイ)原液0.1mlを抗原ディスク(トリイ)に浸し、両側下鼻甲介に置き、症状を誘発させた。くしゃみは回数、鼻汁は重量、鼻閉は音響鼻腔通気度(オーチコン社)を用いて下鼻甲介後端までの鼻腔容積の両側の和の誘発前値および、誘発前値と誘発15分後の変化率にて評価した。術前の抗原誘発は12例で行ったが4例では誘発できなかった。誘発できた8例中6例に翌年10月にoff season provocationを行ったが、うち2例で誘発できず、4例で越年効果が検討できた。

② ラジオ波凝固装置による通年性アレルギー性鼻炎への治療効果の検討

成人通年性アレルギー性鼻炎(男性15名、女性9名、平均30才)のラジオ波凝固装置(CELON, オリンパス)による下鼻甲介粘膜のablationと粘膜凝固手術を行い、術後3ヶ月の時点での症状をアンケート調査した。重症度はガイドラインに従い、重症度2段階改善をあるいは症状消失を著効、一段階改善を有効、改善なしを無効とした。QOLの評価はJRQLQによった

C 結果

① アンケート結果

2007年度の関西地方の花粉飛散はスギ、ヒノキともに例年を下回った。symptom scoreはレーザー群とエピナスチン群に優位差はなかった。最重症時のsymptom medication scoreはレーザー群 3.0 ± 1.4 、エピナスチン群 5.2 ± 2.6 であり、レーザー治療群ではエピナスチン群に較べて平均score 1, 2低く推移した。従って、レーザー治療のmedication scoreは1, 2であり、抗ヒスタミン薬とほぼ同程度といえる。レーザー照射群のアンケート結果は、著効24%、有効36%、無効(1)22%、無効(2)18%であった。コントロール群では、著効28%、

有効 41%、無効 (1) 21%、無効 (2) 15%であった。両群間に明らかな違いはなかった。2007 年よりやや飛散量の多かった 2006 年度に行った成人に対するレーザー治療のアンケート調査では、著効 62%、有効 22%、無効 16%であった。

② QOL 評価

JRQLQ による QOL の評価ではレーザー群とエピナスチン群両群間に、総括的状态、眼症状を含む症状別スコア、臓器別スコアでも両群間に有意差はなかった。項目別評価では屋外活動ではエピナスチン群が、睡眠ではレーザー群が有意にまさっていた。

③ 季節外抗原誘発検査

季節外抗原誘発試験での誘発率は術前、術後 1 年ともに 67%であった。結果的に 4 例でのみ季節外抗原誘発試験の結果が比較できた。くしゃみ回数では術前 6.2 ± 3.7 、術後 1 年で 5.5 ± 1.4 、鼻汁重量 (g) は術前 8.2 ± 3.8 が術後 8.4 ± 3.7 、音響鼻腔通気度計による両側鼻腔容積の誘発後変化率 (%) は術前 188 ± 46 が術後 120 ± 25 であった。誘発前の安静時鼻腔容積は術前 18.1 ± 10.2 、術後 18.0 ± 10.7 であった。くしゃみ、鼻汁、鼻閉症状には越年効果はみられなかったが、抗原誘発による鼻腔容積変化率にはみとめられた。

④ ラジオ波凝固装置 (CELON) の術後 3 ヶ月時点でのアンケート結果

鼻閉への効果は、著効 67% (うち症状なし 42%)、有効 21%、無効 13%。鼻汁への効果は、著効 63% (うち症状なし 63%)、有効 25%、無効 13%。くしゃみへの効果は、著効 71% (うち症状なし 71%)、有効 21%、無効 8%。総合評価では、著効 67% (うち症状なし 25%)、有効 21%、無効 13%。であった。術後 15 ヶ月以上経過している 12 名中 10 名で著効、有効 2 名であった。QOL 評価では、日常生活への支障がない 83%、日常生活への支障がたまにある 13%、日常生活への支障がある 4%、仕事、勉強に支障がある 0%であった。

D 考察

2007 年度の小児スギ・ヒノキ花粉症に対する炭酸ガスレーザー下鼻甲介蒸散術の有効率は著効 24%、有効 36%であり、エピナスチン投与群とほぼ同様であった。medication score も 1.2 であり、抗ヒ

スタミン薬とほぼ同様であった。2007 年よりやや花粉量の多かった 2006 年度に行った成人における検討では著効 62%、有効 22%であり、medication score は 2.2 であり、点鼻ステロイドとほぼ同程度の有効率がみとめられた。レーザー治療の花粉症に対する有効率において、小児症例は成人症例に較べかなり劣っていた。以前の我々の検討では通年性アレルギー性鼻炎では 12 才以下でより有効であった。通常、通年性アレルギー性鼻炎の蒼白で浮腫状の下鼻甲介粘膜は抗原誘発への反応性が低い。一方、花粉症の鬱血した下鼻甲介は抗原誘発への反応性が高い。鼻腔の狭い小児では急速な容積血管の拡張をきたす花粉症を粘膜上皮の変性で局所的に制御することが困難であることを示唆している。炭酸ガスレーザーの重症度改善率は我々の検討では照射後 1 ヶ月で 78%、2 年で 76%であり 1)、一昨年度の本研究で行った APC の検討では長期成績において APC はややレーザーより劣った。今回の季節外抗原誘発の結果からも、炭酸ガスレーザーと APC の主な作用機序は扁平上皮化生、上皮下層の瘢痕組織形成と考えている⁶⁾。またこの結果からは炭酸ガスレーザー下鼻甲介粘膜蒸散術そのものには粘膜の減量効果はなく、抗原刺激に対する反応性の低下が作用機序と思われる、通年性アレルギーの関する我々の以前の検討とも一致した²⁾。炭酸ガスレーザーの有効性が、花粉症よりも通年性、小児よりも成人で有効なのはこの機序のためと思われる。昨年の本研究では、成人における炭酸ガスレーザーのスギ・ヒノキ花粉症に対する有効性には平年並みの飛散量であれば越年効果が見られないと報告した。本年の小児における検討では、4 例しか評価できなかったが、抗原誘発症状での越年効果はみられなかったが、抗原誘発時の鼻腔容積の変化率の低下は翌年もみられた。昨年度の APC 治療の越年効果に関するアンケート調査では、花粉量が平年並みであれば越年効果は困難と考えられた事と、通年性アレルギー性鼻炎に対する APC の効果が 1 年を過ぎると落ちてくる事も考え合わせて、薬物抵抗性の花粉症の患者には花粉量が平年並みより少ない年以外は毎年レーザーを受ける事が望ましいと考えた。

これまでは、手術法としては非接触型ホットナイフである炭酸ガスレーザーと APC による下鼻甲介手

術の検討を行ってきたが、今回は接触型ホットナイフであるラジオ波凝固装置の針電極による容積血管凝固術と粘膜表面の ablation の通年性アレルギー性鼻炎に対する術後成績を検討した。術後3ヶ月の短期成績のアンケート調査ではあるが、重症例対象であったが極めて高い有効性を示した。ラジオ波は高周波にたいし、熱凝固作用は弱い、遅発性の細胞壊死が誘導されるため、針電極による凝固術は術中の疼痛や術直後の組織侵襲は軽い、数週間後にはコンパクトな下鼻甲介粘膜になる。従来の接触型ホットナイフによる粘膜表面の ablation 手術は出血や痂皮形成が著しく外来手術としては望ましいものではなかったが、熱エネルギーの少ないラジオ波凝固装置はその問題点の多くを解決している。今後は長期成績と花粉症に対する成績を検討していきたい。

E 結論

小児スギ・ヒノキ花粉症に対する炭酸ガスレーザーの有効性と越年効果を重症度評価とともに、QOL および抗原誘発試験によって評価した。小児の有効性は昨年行った成人の有効性に比較して劣っていた。通年性アレルギー性鼻炎では小児症例の方が有効性が高かったことえると、小児の鼻腔の狭さ、花粉症の抗原量の多さ、粘膜の鬱血による鼻閉と浮腫による鼻閉の違いがこの原因と思われた。成人症例ではみられなかった越年効果は小児症例でもみられなかったが、少数例での検討であったこと、抗原誘発時鼻腔容積変化率は一年も見られたことからさらに検討が必要である。新たな手術法として、成人通年性アレルギー性鼻炎症例に対し、接触型ホットナイフであるラジオ波凝固装置による容積血管凝固と粘膜表面の ablation 手術の短期成績を検討した。アンケート調査結果であるが、炭酸ガスレーザーと APC を上回る短期成績がみられた。長期成績や花粉症への検討は今度の課題である。

F 健康危険情報

小児への炭酸ガスレーザー手術でも成人へのラジオ波凝固装置による手術でも、照射当日の鼻閉と数日間の粘膜表面の scab の形成を除けば季節前照射に関して、問題となる副作用はなかった。

G 研究発表

- 久保伸夫 花粉症と周辺アレルギー疾患（手術治療が必要なとき、82-85）診断と治療、2007
- 久保伸夫 アレルギー性鼻炎 レーザー効果持続時間と適応 小児科臨床、59 2673-2677 2006
- 久保伸夫 花粉症の外科治療 臨床検査、50 183-187 2006
- 学会発表
- 久保伸夫 アレルギー性鼻炎のレーザー治療、第19回レーザー治療学会 東京 2007

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

II. 調査概要

街頭QOLアンケート調査