

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

アレルギー性疾患に対する代替医療の実態と有効性の科学的評価に関する研究

分担研究者：黒野祐一 鹿児島大学大学院歯学総合研究科 先進治療科学専攻感覚器病学
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授
研究協力者：松根彰志 鹿児島大学大学院歯学総合研究科 先進治療科学専攻感覚器病学
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 准教授

研究要旨

アレルギー疾患では、多くの患者さんやその家族が、通常の病院や診療所での医師からの治療以外の「治療」を受けている。(以下、代替医療)一方、これらに関して、効果がないばかりか副作用が問題となり、トラブルに発展する例も見られる。そこで、今回、代替医療のアンケートによる実態調査に続いて、本年度は以下の内容を実施した。

1. 平成21年3月からのスギ花粉シーズンに行う、ヨーグルトやスギ花粉エキス舌下の効果に関する臨床的検討の準備。
2. アレルギー性鼻炎における薬物治療の実態の解析、検討。
3. アレルギー性鼻炎における血管内皮細胞増殖因子の鼻汁中への分泌に関する検討。

各抗ヒスタミン薬の強力型とバランス型などの特徴を十分理解し、患者さんのニーズにあった診療を医療機関で行うことは、必要以上に代替医療に頼ることを予防しうる。また、既に腫瘍の分野で治療にも応用されている VEGF は、アレルギー性炎症においても重要な役割を果たしていると考えられ、代替医療の有効性を検討する際の有用な指標の1つとなりうる。

A. 研究目的

アレルギー疾患では、多くの患者さんやその家族が、通常の病院や診療所での医師からの治療以外の「治療」を受けているといわれている。(以下、代替医療)その一方で、これらに関して、効果がないばかりか副作用が問題となり、トラブルに発展する例も見られる。ことが報告されており、その実態や効果を調査することが重要な課題となっている。

これまで、アレルギー性鼻炎の代替医療の実態をアンケートなどに基づいて調査し報告を行ってきたが、平成20年度は、ヨーグルトとスギ花粉エキス舌下の効果の検討開始の準備と並行して、以下の如く、実際にわれわれが日常的に行っている(代替ではない)医療行為の内容に関して最近の実態を調査する目的で解析、検討を行った。

代替医療に過度に頼る原因の1つとして、既存の第2世代抗ヒスタミン薬を中心とした医療機関での薬物療法に対する不満があるのかもしれない。また、代替医療の効果を評価する為に良い指標になりえないかの観点で血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を有望と

考えた。以下に具体的に列記する。

1. アレルギー性鼻炎における薬物治療の実態の解析、検討。
2. アレルギー性鼻炎における血管内皮細胞増殖因子の鼻汁中への分泌に関する検討。

B. 研究方法

当研究施設は、引き続きアレルギー疾患の中でも特に、アレルギー性鼻炎・花粉症を対象として検討を行うこととする。

1. アレルギー性鼻炎における薬物治療の実態

鹿児島大学病院およびその関連施設の耳鼻咽喉科を受診したスギ・ヒノキ花粉症127例に対する抗ヒスタミン薬の機能を「強力型」(効果は高いが眠気を発現することがある)と「バランス型」(効果はマイルドであるが、副作用は少ない)にわけてその使用実態について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたり、調査対象者あるいは対象患者から十分な了解を得ることとし、文書による同

意を得て行うこととする。研究の方法、必要性、危険性および有用性、さらに拒否しても不利益にならないことを十分説明した後、同意の得られた場合にのみ行うこととする。これらの検討は鹿児島大学病院、臨床研究倫理委員会及び鹿児島大学動物実験委員会に申請し、許可を得て行われる。

C. 研究結果

1. アレルギー性鼻炎における薬物治療の実態の解析、検討

- ① 強力型は70例、55.1%、バランス型は57例、44.9%に処方されていた。
- ② 両方とも80%以上の症例で継続処方がなされ、中止や変更は20%以下であり両群間に有意差は認められなかった。
- ③ 薬剤を変更した理由は、強力型では「眠気」が多く、バランス型では「症状不変」、「症状悪化」が多かった。
- ④ 「眠気」を理由に薬剤を変更した例では、すべてバランス型に変更されていた。また、症状の悪化を理由に薬剤を変更した例では、すべて強力型に変更されていた。
- ⑤ 10歳代では男女ともに、バランス型が処方される傾向にあった。40～60歳代では強力型が処方される傾向にあった。

2. アレルギー性鼻炎における血管内皮細胞増殖因子の鼻汁中への分泌に関する検討

- ① 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は、正常の鼻汁と比べて慢性副鼻腔炎の鼻汁で産生が亢進し、アレルギー性鼻炎では慢性副鼻腔炎よりもさらに産生が亢進する。末梢血中の VEGF はいずれの鼻汁よりも、圧倒的に少ない。
- ② 抗原誘発試験で、鼻腔洗浄液中の VEGF は抗原誘発後に誘発前とくらべて明らかに産生が亢進する。
- ③ アレルギー性鼻炎の下鼻甲粘膜の粘液腺よりも嗅液腺で多くが産生される。
- ④ 5種類のサブタイプのうち、VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅が多く産生される。これは腫瘍も含め他の領域の検討と一致する。

D. 考察

代替医療の普及の原因の1つとして、医師や医療機関が行う治療に対して必ずしも満足していないと

いう実態がある。医療機関で医師の処方を受けて行われる治療の中心は、薬物治療でありその中心は、現在わが国では第2世代の抗ヒスタミン薬である。欧米ではかなり抗ヒスタミン薬の OTC 化が進んでおり、花粉症の患者さんの多くは、医師の処方箋なしで入手している。今回、代替医療の調査と並行して、わが国における第2世代抗ヒスタミン薬の使用状況に関わる調査を実施した。わが国では、強力型にせよバランス型にせよ第2世代の抗ヒスタミン薬が医療機関での処方の中心であるが、患者さんの満足を得るには世代別、男女別のニーズに則した処方を行う必要があることがはっきりした。そして、しばらく使ってみて効果その他に不満点があれば必要に応じて変更することも弾力的におこなわれる必要がある。そうしたきめ細かな医療を行うことで、十分なエビデンスが蓄積されていない代替医療に過度に頼る状況を予防することになると考えられる。

VEGF は、もともとは腫瘍の浸潤、増殖の際に腫瘍細胞から産生される、血管増殖と血管透過性亢進に関わる重要な因子として発見され、現在大腸がんなどが治療の前線での抗体 (抗 VEGF 抗体) が商品化されて使われるに至っている。我々は、これまでも鼻副鼻腔炎病態にも VEGF が重要な因子であることを報告してきたが、今回アレルギー性鼻炎においても重要であることを臨床サンプルを用いて初めて報告した。代替医療にとってエビデンスが十分でないことが最大の欠点であるが、今後種々の代替医療の有効性を検討する際、VEGF の増減は良い指標の一部になると考えられる。

E. 結論

1. 代替医療の実態調査の実施を受けて抗ヒスタミン薬の使用実態や VEGF のアレルギー性鼻炎病態への関与の可能性に関する検討をおこなった。
2. 各抗ヒスタミン薬の特徴を十分理解し、患者さんのニーズにあった診療を医療機関で行うことは、必要以上に代替医療に頼ることを予防する。
3. 既に腫瘍の分野で治療にも応用されている VEGF は、アレルギー性炎症においても重要な役割を果たしていると考えられ、代替医療の有効性を検討する際の有用な指標の1つとなる。
4. 平成21年のスギ花粉症の時期を通じて、ヨーグルトやスギ花粉エキスの舌下などが実際にどの程度効果があるか検討のする準備を整えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 松根彰志 耳疾患とアレルギー. 特集/耳鼻咽喉科領域とアレルギー

アレルギーの臨床 28: 370-373, 2008.

2) 宮之原郁代, 松根彰志, 黒野祐一. 特集II/花粉症をめぐる現状と将来 使用実態調査からみた花粉症に対する第2世代抗ヒスタミン薬の選択基準.

臨床免疫・アレルギー科 49: 420-425, 2008.

3) Matsune S, Ohori J, Sun D, Yoshifuku K, Fukuiwa T, Kurono Y. Vascular endothelial growth factor produced in nasal glands of perennial allergic rhinitis.

Am J Rhinology 22: 365-370, 2008.

4) 宮之原郁代, 松根彰志, 大堀純一郎, 黒野祐一. スギ花粉症に対するプラシルカスト初期療法の有用性 耳鼻と臨床 55: 31-38, 2009.

5) 松根彰志, 大堀純一郎, 吉福孝介, 黒野祐一. 好酸球性副鼻腔炎の病態と診断に関する問題点. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科, 81: 11-17, 2009.

6) Sekigawa T, Tajima A, Hasegawa T, Hasegawa Y, Inoue H, Sano Y, Matsune S, Kurono Y, Inoue I. Gene-expression profiles in human nasal polyp tissues and identification of genetic susceptibility in aspirin intolerant asthma.

Clin Exp Allergy (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

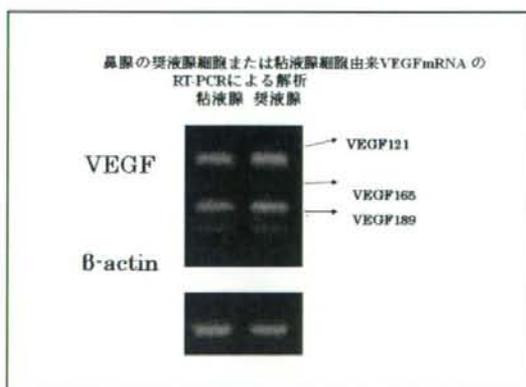
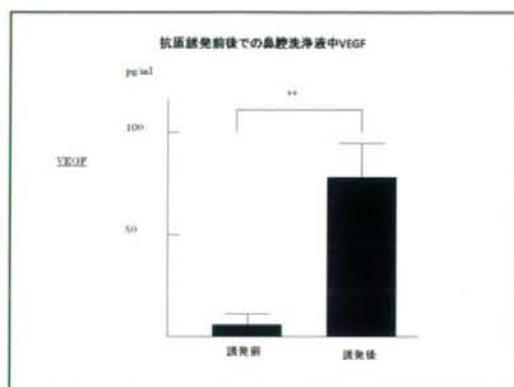
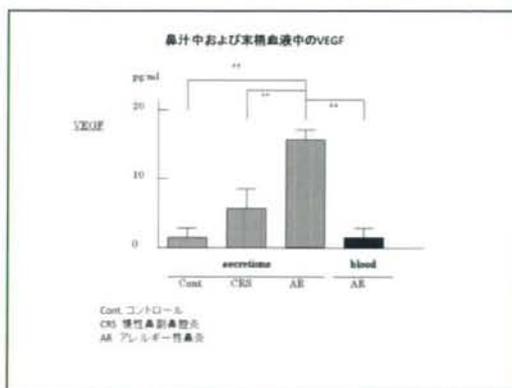
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



細菌製剤とヒノキ入浴剤による代替医療の可能性に関する検討

研究分担者	藤 枝 重 治	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科教授
研究協力者	山田 武千代	福井大学医学部付属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 講師
	大澤 陽子	福井大学医学部付属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 医員
	窪 誠 太	福井大学医学部付属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 医員

研究要旨

CpG DNA は、細菌に含まれる非メチル化 DNA であり、強力な抗アレルギー作用がある。今回 CpG DNA が B 細胞の共刺激分子の発現、鼻粘膜由来線維芽細胞の BlyS、RANTES 産生にどのように影響するか検討した。その結果、B タイプの CpG DNA (CpG-B) は、T 細胞刺激性の ICOS-L (B7, RP1) の発現を抑制し、T 細胞抑制性の PD-L1 (B7-H1) の発現を促進させた。さらに機能的解析として、T 細胞からの IL-5 産生を測定すると CpG-B 処理 B 細胞は、IL-5 産生を抑制する一方、IL-10 産生を亢進させた。抗 IL-10 抗体添加での実験から IL-5 産生抑制は、IL-10 が関与していることが判明した。また鼻粘膜由来線維芽細胞において、ウイルス感染を模倣した poly-IC 刺激での BlyS、RANTES 産生は、CpG-B によって両者とも抑制され、ウイルス感染によるアレルギー症状増悪も CpG DNA で改善される可能性も見つかった。ヒノキ花粉症患者に対するヒノキ樹木抽出エキスによる入浴剤の効果は、患者 10 名で行ったが、3 名が皮膚の掻痒感で脱落し、2 名がかなりのヒノキのにおいとべたつき感で脱落した。5 名のヒノキ花粉ピーク時の症状スコアは 34.7 ± 5.3 であったが、入浴剤を使用なかったコントロール (10 名) の 28.1 ± 2.7 に比較して全く有意差がなかった。以上の結果から CpG-B を含む細菌製剤、乳酸菌・ビヒズ配合飲料などは、アレルギー反応を抑制したり、ウイルス感染時のアレルギー症状増悪を抑制したりする有効性が示された。今回使用の入浴剤はさらなる改良が必要であると思われた。

A. 研究目的

細菌に含まれる DNA は、哺乳動物の DNA と異なりメチル化を受けていない非メチル化 DNA である。ヒトでは、細菌の非メチル化 DNA を免疫担当細胞が認識し活性化することにより、細菌を排除する。樹状細胞は、非メチル化 DNA を認識し、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IL-12 を産生し、Th1 細胞を誘導する。この非メチル化 DNA は、シトシン (C) とグアニン (G) が順に結合した塩基配列しており、CpG DNA (もしくは CpG モチーフを含む DNA) と呼ばれる。この CpG DNA が、T 細胞の Th1, Th2 バランスを Th1 に傾け、アレルギー病態を改善させる可能性が示されている。B 細胞は、T 細胞や抗原提示細胞からの刺激、IL-4、IL-13、CD40L、BlyS によって、Ig クラススイッチを起こし、IgE を産生するが、B タイプ CpG DNA (CpG-B、TCG 配列を S 化していることが特徴) は IgE 産生を抑制させることを報告してきた。しかし他の機能に関しては、ほとんど調べられていない。B 細胞は、MHC クラス I、クラス II を細胞表面に発現して、抗原提示細胞としても機能する。抗原提示細胞は共刺激分子リガンドを発現し、T 細胞上の T 細胞共刺激分子に影響を与える。今回 CpG-B を B 細胞に直接作用させると、B 細胞上に発現している共刺激分子の発現がどのように変化し、機能に影響を及ぼすか検討した。

さらに他の細胞への CpG DNA の影響を検討するため、鼻由来線維芽細胞を使用し、BlyS と RANTES 発現を指標にして検討した。これらの検討により、細菌製剤もしくは乳酸菌などの代替医療の可能性を探索した。

もう一つのプロジェクトとして、ヒノキ花粉症に対して経皮的免疫療法を行う意味からヒノキから抽出したエキスをを用いた入浴剤を開発し、ヒノキ花粉症に効果があるか検討した。

B. 研究方法

ヒト末梢血及び口蓋扁桃から単核球を分離し、Auto MACS を用いて B 細胞を分離した。CpG DNA は、ODN2006 (CpG-B) 5' -tcgtcgtttttgtcgtttttgtcgtt- 3' (小文字はチオール化部位) を添加して培養した。対照として A タイプ ODN2216 (CpG-A) を用いた。培養前後で RNA を抽出、real time PCR にて PD-L1、ICOS-L の発現量を観察した。また機能的検索のため T 細胞に CpG-B で刺激した B 細胞とスギ抗原 (Cry-j-1) を混合培養し、培養液中の IL-5 と IL-10 の濃度を ELISA で測定した。線維芽細胞を培養し、PolyIC 刺激後 48 時間後の上清を採取し ELISA キットで BlyS、RANTES を測定した。同じ系に培養開始時から CpG DNA を添加し、その影響を検討した。ヒノキから抽出したエキスをを用いた入浴剤は、

福井大学産学官連携に加入の家具メーカーから提供された。秋から 25ml の入浴剤を風呂に添加し、普通に入浴してもらった。本研究は、福井大学倫理審査委員会の承認後（倫審 19 第 32 号）行った。試験はオープン試験とし、対象者はスギ舌下免疫療法施行患者でヒノキ花粉症を有する 10 名とした。対照者もヒノキ花粉症を有するスギ舌下免疫療法施行患者で、なにも入浴剤を使用しない 10 名とした。この 20 名はスギ舌下免疫療法がスギに対して効果を認めているが、ヒノキには前年効果がなかった人を選んだ。

C. 研究結果

末梢血 B 細胞、扁桃 B 細胞とも、CpG-B の刺激により、6 時間から 12 時間後で ICOS-L の発現が、CpG-B 濃度依存的に有意に減少した。一方 PD-L1 の発現は、末梢血 B 細胞、扁桃 B 細胞とも濃度依存的に亢進した。また B 細胞の細胞株である R2G6 細胞においても CpG-B 刺激によって ICOS-L 発現低下と PD-L1 発現亢進を認めた。これららの現象は CpG-B 濃度 1 μ M で十分であった。機能的解析として CpG-B 1 μ M で刺激した B 細胞と auto の T 細胞、Cryj1 10 μ g/ml と混合培養すると無刺激 B 細胞との混合培養での IL-5 産生に比べ、有意に抑制された。また同じ系での IL-10 産生を調べると、有意に亢進していた。そこで抗 IL-10 抗体を添加して調べると IL-5 産生の低下は解消され、すなわち IL-10 がこの IL-5 産生低下の機序であることが判明した。B 細胞において CpG-B 1 μ M 刺激では、細胞形態や生存に何ら影響がなかった。

下甲介鼻粘膜由来線維芽細胞において、BlyS 発現は、Poly IC 刺激 6 時間後で、無刺激より 100 倍に増加した。CpG-A と CpG-B 共に BlyS 発現誘導は検出されなかった。Poly IC 刺激と同時に、CpG-A、CpG-B をそれぞれ同時に作用させ BlyS 発現を観察すると、CpG-B が Poly IC 誘導 BlyS 発現誘導をほぼ消失させることが判明した。この作用は濃度依存性であり、CpG-A ではみられなかった。CpG-B による Poly IC 誘導 BlyS 発現誘導阻害効果は NF κ B 阻害剤により減弱した。RANTES 産生を観察すると、同様に CpG-B で Poly IC 誘導 RANTES 産生が強く抑制された。この作用は CpG-A ではみられなかった。

ヒノキ抽出入浴剤は、使用した 10 名中 3 名が皮膚の掻痒感で脱落し、2 名がかなりのヒノキのおいとべたつき感で脱落した。5 名のヒノキ花粉ピーク時の症状スコアは 34.7 \pm 5.3 であったが、コントロールの 28.1 \pm 2.7 に比較して全く有意差がなかった。対象者 20 名は全員ヒノキ花粉飛散時期に症状を認めていた。

D. 考察

ヒト B 細胞では、T 細胞への亢進シグナルとして B7.1/B7.2、ICOS-L (B7, RP1)、OX-40L などがある。一方逆に抑制性のシグナルとして B7.1/B7.2、PD-L1 (B7-H1)、B7X などが存在する。B タイプ CpG DNA は、ヒト B 細胞において T 細胞の活動を促進する共刺激分子である ICOS-L の発現を抑制し、逆に T 細胞の活動を抑制する共刺激分子である PD-L1 の発現を亢進させた。さらに B 細胞の機能解析として Cryj1 刺激による T 細胞からの IL-5 産生は、B タイプ CpG DNA 処理により抑制された。このことは、B タイプ CpG DNA が B 細胞の IgE 産生抑制のみならず、B 細胞から T 細胞への刺激においても抑制する方向に働き、最終的に抗アレルギー作用を及ぼしうることを示している。T 細胞へのシグナル抑制には IL-10 が関与していた。これまで抗原特異的免疫療法などでは、IL-10 が免疫寛容に深く関与しているという報告が多く散見されるが、その機序と同じ可能性がある。

アレルギーが発症していると RNA ウィルス (RS ウィルス、ライノウィルス、インフルエンザウィルス) 感染による気道上皮から BlyS などを介して病態が悪化することになる。CpG DNA は IFN- γ や IFN- α 産生で炎症を惹起する一方で、Poly IC 誘導 BlyS 及び RANTES 産生阻害効果を示したことから、RNA ウィルス感染時のアレルギー症状の悪化を軽減する可能性が示唆された。

ヒノキ入浴剤は、皮膚を介した抗原特異的免疫療法として試みたが、入浴剤自体の完成度が低く、半数も脱落してしまった。今後もっと溶剤などの研究を進める必要がある。

E. 結論

B タイプ CpG DNA を含む細菌製剤、乳酸菌・ビヒズ配合飲料などは、アレルギー反応を抑制したり、ウィルス感染時のアレルギー症状増悪を抑制したりする有効性が示された。入浴剤などは、まだまだ品質の点において検討の必要があると結論づけられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okubo K, Gotoh M, Fujieda S, Okano M, Yoshida H, Morikawa H, Masuyama K, Okamoto Y, Kobayashi M. A randomized double-blind comparative study of sublingual immunotherapy for cedar

pollinosis. Allergol Int. 2008
Sep;57(3):265-275.

2) Enomoto H, Hirata K, Otsuka K, Kawai T, Takahashi T, Hirota T, Suzuki Y, Tamari M, Otsuka F, Fujieda S, Arinami T, Noguchi E. Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population: a family and case-control study. J Hum Genet. 2008;53(7):615-621.

3) Sakashita M, Yoshimoto T, Hirota T, Harada M, Okubo K, Osawa Y, Fujieda S, Nakamura Y, Yasuda K, Nakanishi K and Tamari M. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. Clin Exp Allergy. 2008;38:1875-1881.

4) Hirota T, Harada M, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Noguchi E, Saito H, Nakamura Y, Tamari M. Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. J Allergy Clin Immunol. 2008;121(3):769-70.

5) 藤枝重治 花粉症の診断 日医雑誌 136(10):1971-1974, 2008.

6) 山田武千代、窪誠太、高橋昇、藤枝重治 鼻由来線維芽細胞に対するCpG DNAの作用 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 26:140-141, 2008.

7) 山田 武千代 上皮からのBLyS産生とアレルギー 臨床免疫・アレルギー科 49(4):447-451, 2008.

2. 学会発表

1) Shigeharu Fujieda and Hideyuki Yamamoto. Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor/Thymidine Phosphorylase Enhanced Human IgE Production. AAAAI 2008 annual meeting. 2008.3. Philadelphia

2) 山田武千代、窪誠太、高橋昇、藤枝重治 鼻粘膜由来線維芽細胞に対するCpG DNAの作用 第26回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2008.2. 大阪

3) 山田 武千代：B細胞と気道病態-B細胞の機能について-：第8回鎌倉カンファレンス，2008，4. 横浜

4) 山田武千代、窪誠太、藤枝重治 B細胞とアレルギー -B細胞からみた免疫寛容と花粉症治療へのアプローチ- 第44回鼻科学会基礎問題研究会 2008，9. 名古屋

5) 山田 武千代、窪 誠太、藤枝 重治 B細胞抗原受容体とIL-4誘導クラススイッチについて 第58回日本アレルギー学会 2008,11. 東京

6) 窪 誠太、山田 武千代、大澤 陽子、高橋 昇、藤枝 重治 CpGによるヒトB細胞ICOS-L発現抑制第26回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2008.2. 大阪

7) 窪 誠太、山田 武千代、大澤 陽子、藤枝 重治 CpGによるB細胞PD-L1発現促進とその機能 第47回日本鼻科学会総会 2008.9. 名古屋

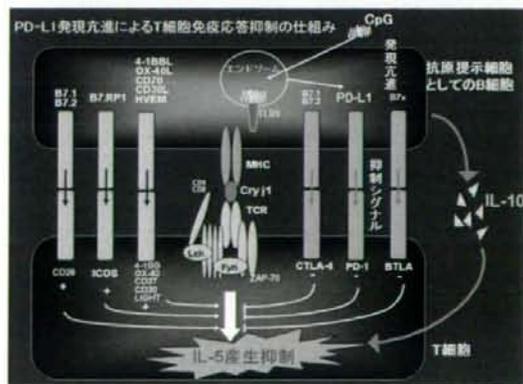
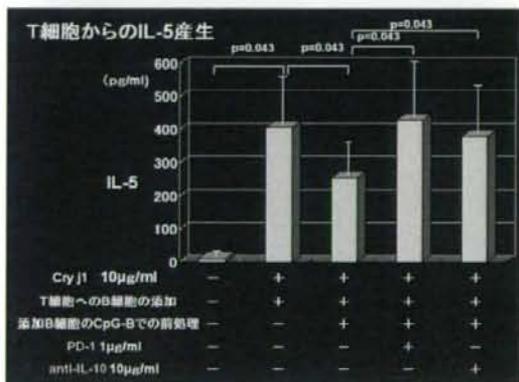
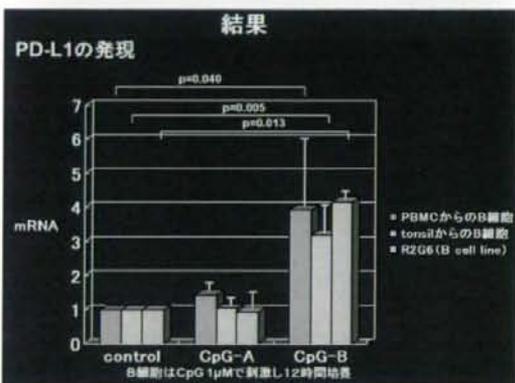
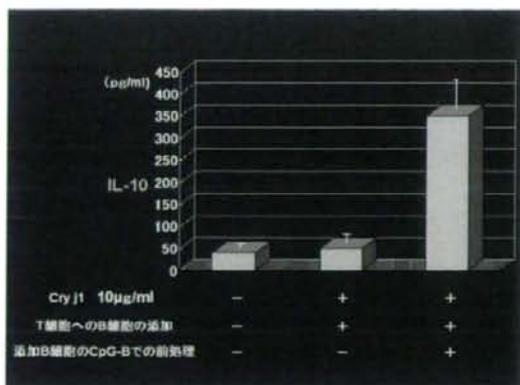
8) 窪 誠太、山田 武千代、大澤 陽子、藤枝 重治 CpG処理したB細胞のT細胞活動抑制に関する因子について 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008.11. 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし



乳酸菌の免疫調整作用の基礎検討から

分担研究者 堀口 茂俊 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 講師
研究協力者 稲嶺 絢子 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科 グローバル COE フェロー
米倉 修二 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員

研究要旨

代替医療として広く用いられている乳酸菌についてヒト末梢血細胞を用いた *in vitro* での検討、実験的アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いた検討を行い、その結果からヒトでの臨床試験を計画し開始した。まず、*In vitro* でヒト末梢血より誘導した未熟樹状細胞 (DC) の分化への乳酸菌の及ぼす影響を検討したところ、乳酸菌の株によって分化 DC のサイトカイン産生に大きな違いがみられた。卵白アルブミン (OVA) を抗原として実験的アレルギー性鼻炎モデルマウスを作成して、DC の IL-12 産生誘導能が最も高かった乳酸菌を摂取した際の影響を検討したところ、IgE 産生抑制、OVA 誘発鼻症状の改善がみられた。特に乳酸菌の舌下投与は胃管投与と比較して少量、短期間で有効な抑制効果が認められた。以上より、乳酸菌の投与により DC の DC-1 への分化が有効に期待されることが示唆され、これに基づいてスギ花粉症の免疫治療への有効なアジュバントとしての機能を期待した臨床試験が開始された。

A. 研究目的

アレルギー疾患に対して安全性が高く、安価な機能性食品の効果が期待される。乳酸菌を対象にして意義を科学的に明らかにするために、ヒト末梢血細胞を用いた *in vitro* での検討を昨年より発展させ、本年度はアレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて至適投与方法について検討を行い、並行して行われているスギ花粉症患者を対象とした臨床試験への展開を目指す。

B. 研究方法

- (1) スギ花粉症患者末梢血より *negative selection* により分離した CD14 陽性細胞から誘導した未熟樹状細胞に対して、スギ花粉抗原 cry j 1 刺激による成熟樹状細胞への分化に乳酸菌がどのような影響を及ぼすかについて検討した。
- (2) Balb/c マウスに ovalbumin (OVA) を抗原として腹腔内感作及びその後の経鼻感作によりアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製し、乳酸菌 (死菌) の経胃管投与による一次免疫応答、二次免疫応答への影響、OVA 点鼻誘発による鼻症状に及ぼす影響を検討した。また、腹腔内感作後の経鼻感作時に乳酸菌の舌裏面への舌下投与を行い、IgE 免疫応答、OVA 点鼻誘発

による鼻症状、頸部リンパ節リンパ球、脾細胞のサイトカイン産生、蛍光標識乳酸菌の移動試験を行い、経胃管投与との違いを検討した。

- (3) スギ花粉症患者ボランティア 109 名を対象に、スギ花粉エキスによる舌下免疫療法時の乳酸菌口内投与によるアジュバント効果を明らかにするため、スギエキス舌下ならびに乳酸菌口内連日投与群、スギエキス舌下ならびにプラセボ乳酸菌口内連日投与群、プラセボエキス舌下ならびに乳酸菌口内連日投与群、プラセボスギエキス舌下ならびにプラセボ乳酸菌口内連日投与の 4 群に分けて二重盲検試験を千葉大学附属病院 IRB の認可を受け、臨床試験部の管理下で平成 20 年 12 月から開始した。

(倫理面への配慮)

本臨床研究を遂行するにあたり、参加者から十分な了解を得ることとし、文書による同意を得て行った。これらの検討は学内の倫理委員会に申請し、許可を得て行われた。

C. 研究結果

- (1) 未熟樹状細胞の分化に及ぼす影響は乳酸菌の株

により大きな違いがみられ、IL-12(p70)の産生が著しいもの、TGFβ・IL-10産生の著しいもの、IL-6以外にはこれらのサイトカイン産生誘導がほとんどみられないものが確認された。

(2) 実験的アレルギー鼻炎モデルマウスでは高いIL-12産生が *in vitro* で認められたマウスの経胃管投与により、OVA 特異的 IgE 抗体価の有意な抑制とOVA点鼻誘発後の鼻症状の有意な改善がみられた。また、乳酸菌の舌下投与はマウスで0.5mg/回、計7回という少量の投与であっても有意なOVA特異的IgE抗体抑制、鼻症状の軽減作用がみられ、経胃管投与と比較して1/10量で同等の効果が認められた。脾臓リンパ節リンパ球のサイトカイン産生の解析ではIL-4に変化はなくIL-13の著しい抑制が確認された。

(3) スギ花粉症に対するスギ花粉エキス連日大量投与による舌下免疫療法への乳酸菌口内投与のアジュバント効果を明らかにする二重盲検試験が進んでいる。

D. 考察

In vitro で乳酸菌は未熟DCの分化に大きな影響を与え、その内容は乳酸菌の株により大きな差異が認められた。DC-1誘導能がみとめられた乳酸菌を用いて実験的アレルギー鼻炎モデルマウスへの影響を検討したところ、IgE産生抑制、抗原誘発による鼻症状の改善効果が認められた。特にマウスに乳酸菌を口内投与した場合にヒトでの投与量としても可能な少量投与でこれらの作用が明らかに認められた。この機序として乳酸菌刺激でDC-1に分化した樹状細胞がIgE産生部位である頸部リンパ節へ移行して、IgE産生の亢進に必要なIL-13産生の抑制に関与していることが示唆された。これらの基礎検討を基に、スギ花粉症患者に対してスギ花粉エキスによる連日舌下免疫療法への乳酸菌口内併用投与によるアジュバント効果の臨床検討が進んでいる。

E. 結論

乳酸菌の口内投与により有効にDC-1の分化が期待されること、スギ花粉症の抗原特異的舌下免疫療法への有効なアジュバントとしての機能が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

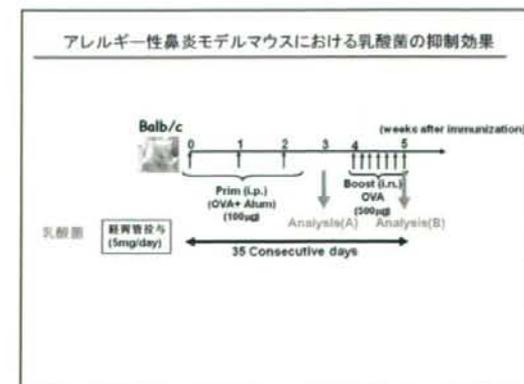
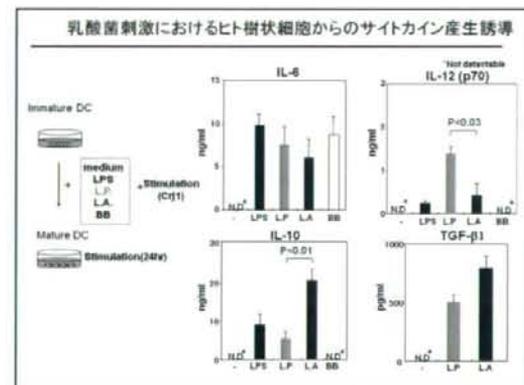
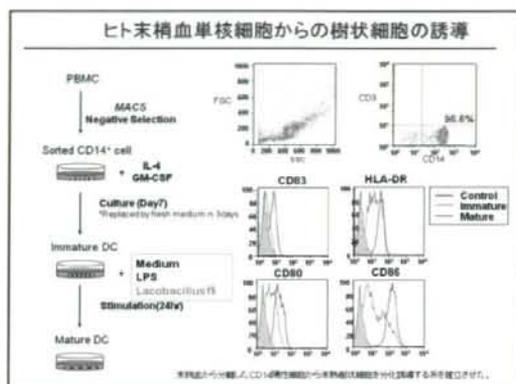
・大川翼、稲嶺絢子、岩佐拓幸、黒崎元良、堀口茂俊、中

山俊憲、岡本美孝、アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける乳酸菌の抗アレルギー効果の検討。第58回日本アレルギー学会秋季学術大会、ミニシンポジウム、東京 2008年11月。

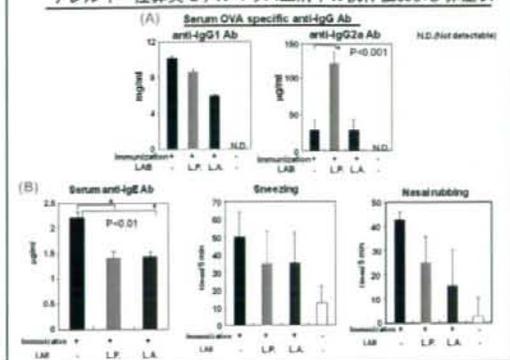
・稲嶺絢子、堀口茂俊、岡本美孝、乳酸菌におけるスギ花粉舌下免疫療法に対するアジュバントとしての効果検討。第27回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、指定口演、千葉 2009年2月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



アレルギー性鼻炎モデルマウス血清中の抗体価および鼻症状



花粉症における乳酸菌の効果の基礎的研究

研究分担者	大久保公裕	日本医科大学耳鼻咽喉科准教授
研究協力者	後藤穰	日本医科大学千葉北総病院耳鼻咽喉科講師
	指原紀宏	明治乳業研究本部 食機能科学研究所

研究要旨

スギ花粉症はここ 10 年で約 10%増加している。ほかのアレルギーと比較し、明らかに抗原が増加していることが大きな原因であるが、実際にはほかのアレルギー疾患の増加と同様に生活様式や環境の変化、感染機会の減少なども大きな原因と考えられるが、一元的ではない。罹患人口が多いため一般医療とは別に代替医療が花粉症では特に広く行われている。この代替医療の 2 大勢力がお茶に代表されるフラボノイド系物質による抗酸化作用を用いるものと免疫変換を望む乳酸菌を代表とするプロバイオティクスである。乳酸菌には、便秘や下痢の改善だけでなく、感染防御(免疫賦活)効果等の多岐に亘る保健効果が報告されているが、近年になり特に注目されているのがアレルギー予防、または改善効果である。

今回我々は現在アレルギー性鼻炎に対して有効であるとの評価が一部されている *Lactobacillus* 属乳酸菌の評価を行った。スギ花粉で感作したマウスを用いて腹腔内に遊走する好酸球を指標として検討を行った。その結果、好酸球比率は *L. gasser* 8.7%、*L. paracasei* 4.7%、*L. acidophilus* 10.2%と変動した。また好酸球抑制率はそれぞれ 50%、12%、56%であり、それぞれの乳酸菌は好酸球浸潤を抑制した。しかし感作・誘発群と有意差があったのは *L. gasser* の好酸球比率との *L. acidophilus* の好酸球抑制率であった。

臨床試験での結果は評価期間途中で評価不能であるが、日本医科大学の被検者 5 名では軽度なもの、重篤な副作用とも生じていない。

A. 研究目的

花粉症は世界中で増加しているアレルギー疾患である。現在アレルギー疾患に対して免疫療法以外には有効な根治療法はなく、現在行われている治療の殆どは対症療法である。これらは副作用の問題や、緩解に長期間を要するため、アレルギー予防の取り組みや、症状を抑えると同時にその原因を根本的に治していく治療が望まれる。

プロバイオティクスの代表である乳酸菌には、便秘や下痢の改善だけでなく、感染防御(免疫賦活)効果等の多岐に亘る保健効果が報告されているが、近年になり特に注目されているのがアレルギー予防、または改善効果である。アレルギー発症のメカニズムは現在までに Th1/Th2 バランス、制御性 T 細胞、Th17 細胞などの関与が報告されているが、これらは互いに独立したものではなく、様々な要因が複雑に作用していると考えられる。*Lactobacillus* 属乳酸菌の中には、Th1/Th2 バランスを Th2 側から Th1 側にシフトさせることができるものが存在している。このような免疫調節活性の強い乳酸菌は Th1/Th2 バランスの改善を介した IgE の抑制効果により、アレルギーを予防、または根本的に軽減する能力を有する事が考えられ、機能性食品としての利用が期待される。

今回、我々はこの *Lactobacillus* 属乳酸菌のいくつかをマウスのスギ花粉症モデルを作成し、基礎的な検討を行った。また乳酸菌とスギ花粉抗原エキスの舌下免疫療法を平成

20 年 12 月より千葉大学をセンターとする多施設共同研究として代替療法としての乳酸菌の評価を行った。

B. 方法

(1) BALB/c マウスにスギ花粉抽出抗原液を、実験開始から 0、1、6、8、14 日目に背部皮下に投与し、抗原感作を行った。20 日目に同様のスギ花粉抽出抗原液を腹腔内投与して好酸球の増多を誘発した。陰性対照として非感作・誘発群を設定し、感作を行わず、誘発のみを行った。各群に蒸留水(非感作・誘発群および感作・誘発群)または 2mg の *L. gasser* OLL2809 (1×10^9 cells)、*L. paracasei* KW3110 (1.2×10^9 cells)、*L. acidophilus* L-92 (8.6×10^9 cells) を蒸留水に懸濁して 21 日間、経口投与し、21 日目に腹腔洗浄液を採取した。

(2) スギ花粉症患者対象にスギ花粉エキス連日舌下免疫治療と乳酸菌死菌の口内投与を併用してアジュバント効果をプラセボ対照にランダム化試験により明らかにする臨床試験を企画した。

C. 結果

(1) 感作・誘発群において腹腔洗浄液中の総細胞濃度、好酸球濃度および好酸球比率(好酸球数/総細胞数)は有意に ($p < 0.01$) 増加し、好酸球増多モデルマウスが

作製された。この腹腔内細胞数はどの乳酸菌を添加しても変化しないが、好酸球比率は *L. gasseri* 8.7%、*L. paracasei* 4.7%、*L. acidophilus* 10.2%と変動した。また好酸球抑制率はそれぞれ 50%、12%、56%であり、それぞれの乳酸菌は好酸球浸潤を抑制した。しかし感作・誘発群と有意差があったのは *L. gasseri* の好酸球比率との *L. acidophilus* の好酸球抑制率であった。

プロバイオティクス乳酸菌の好酸球増多抑制効果

群	総細胞濃度 ($\times 10^4$ cells/ml)	好酸球濃度 ($\times 10^4$ cells/ml)	好酸球比率 (%)	好酸球抑制率 (%)
非感作・誘発群	11.7 \pm 1.8	0.30 \pm 0.14	2.0 \pm 0.6	100 \pm 6
感作・誘発群	17.1 \pm 2.3*	2.75 \pm 0.70**	14.7 \pm 2.5**	0 \pm 29**
OLL2809	17.1 \pm 1.9	1.53 \pm 0.28	8.7 \pm 1.2**	50 \pm 12
KW3110	15.3 \pm 2.1	2.43 \pm 0.79	14.7 \pm 3.1	13 \pm 32
L-92	13.0 \pm 1.5	1.38 \pm 0.22†	10.2 \pm 0.8	56 \pm 9†

平均値 \pm 標準偏差 (n=10/群)。

*、**、P < 0.1, 0.05 (Student's t test, vs 非感作・誘発群)。

†、‡、P < 0.1, 0.05 (Student's t test, vs 感作・誘発群)。

好酸球(増多)抑制率(%) =

$$\left[1 - \frac{(\text{各菌株の好酸球濃度} - \text{非感作・誘発群の好酸球平均濃度})}{(\text{感作・誘発群の好酸球平均濃度} - \text{非感作・誘発群の好酸球平均濃度})} \right] \times 100$$

(2) 日本医科大学の5名のスギ花粉症患者に千葉大と合同で多施設共同での舌下免疫療法への乳酸菌アジュバント効果についてのランダム化試験が開始された。

D. 考察

今回検討した乳酸菌はいずれも *Lactobacillus* 群であったが、それ以外の乳酸菌にもその効用は検証されている。しかし、アレルギーの症状の部分を修飾できるのは現状では *Lactobacillus* のみであると考えられ、その中でも *L. gasseri* と *L. acidophilus* は好酸球浸潤という花粉症でも生じる現象を抑制したものであり、その実際的な効果のメカニズムが一部ではあるが、証明できたと考える。これらのメカニズムが今後、どのように人のスギ花粉症において効果を示してゆくのか、またその時に最適な摂取量など検討しなければならない。舌下免疫療法のアジュバントとしての乳酸菌の有用性に関しては今後の臨床試験解析結果に関わるものであり、現在では未だ不明である。

E. 結論

増加する花粉症を含むアレルギー性鼻炎に対して医療の占める部分は重要であるが、医療経済などの問題から代替医療の必要性は疑う余地がない。今回は乳酸菌の検討を行い、その好酸球浸潤に与える影響が承継された。しかし未だ基礎的な検討であり、臨床的エビデンスレベルは低く、国民に推奨するまでにはいかない。今後は臨床試験の精度を向上させ、より高いレベルのエ

ビデンスにより国民へ正しい代替医療の情報を伝えなければならない。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Review

- Okubo K, Nagakura T: Anti-IgE antibody therapy for Japanese cedar pollinosis. *Allergology International* 57: 205-209, 2008
- Hashiguchi K, Tang H, Fujita T, Suematsu K, Tsubaki S, Nagakura H, Kitajima S, Gotoh M, Okubo K: Pilot study of Japanese cedar pollen exposure using a novel artificial exposure chamber (OHIO chamber). *Clin Exp Allergy Rev* 8: 30-36, 2008
- 大久保公裕: 医科からみた上顎洞。日歯先技研会誌 14: 139-141, 2008

Original Article

- Okubo K, Baba K: Therapeutic effect of montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, on Japanese patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergology International* 57: 247-255, 2008
- Okubo K, Gotoh M, Fujieda S, Okano M, Yoshida H, Morikawa H, Masuyama K, Okamoto Y, Kobayashi M: A randomized double-blind comparative study of sublingual immunotherapy for cedar pollinosis. *Allergology International* 57: 265-275, 2008
- Okubo K, Nakashima M, Miyake N, Komatsubara M, Okuda M: Dose-ranging study of fluticasone furoate nasal spray for Japanese patients with perennial allergic rhinitis. *Curr Med Res Opin* 24: 3393-3403, 2008.
- Sakashita M, Yasuda K, Hirota T, Harada M, Okubo K, Osawa Y, Fujieda S, Nakamura S, Nakanishi K, Yoshimoto T, Tamari M: Association of serum IL-33 level and the IL-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy* 38: 1875-1881, 2008.
- Okano M, Otsuki N, Azuma M, Fujiwara T, Kariya S, Sugata Y, Higaki T, Kino K, Tanimoto Y, Okubo K, Nishizaki K: Allergen-specific immunotherapy alters the expression of BTLA, a co-inhibitory molecule, in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 38: 1891-1900, 2008.
- 大久保公裕、馬場廣太郎: システイニルロイコトリ

エン受容体1拮抗薬モンテルカストナトリウムの通年性アレルギー性鼻炎に対する長期投与試験。臨床医薬

7. Okubo K, Nakashima M, Miyake N, Komatsubara M, Okuda M: Comparison of fluticasone furoate and fluticasone propionate for the treatment of Japanese cedar pollinosis. *Allergy Asthma Proc* 2009; 29: 1-11.
8. Sashihara T, Ikegami S, Sueki N, Yamaji T, Kino K, Takemoto N, Gotoh M, Okubo K: Oral administration of heat-killed *Lactobacillus gasseri* OLL2809 reduces cedar pollen antigen-induced peritoneal eosinophilia in mice. *Allergol Int* 2008; 57: 397-403.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

特になし

アロマ療法ならびに鼻孔開大テープの有効性の検討

研究分担者 花澤 豊行 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 准教授
研究協力者 茶菌 英明 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 助教
米倉 修二 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員
吉江うらら 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員
久満美奈子 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員

研究要旨

アレルギー性鼻炎患者で比較的高い頻度で用いられているアロマセラピー及び鼻孔拡大テープの意義を鼻腔通気抵抗および functional MRI (f-MRI) 検査を用いて行った。軽度～中等度鼻閉を訴えるアレルギー性鼻炎患者への1分間のペパーミントオイルの吸入にて26名中12名で有意な鼻腔通気抵抗の減少を認めた。また、7日間の就寝中のアロマランプを用いたペパーミントオイル吸入で中等度鼻閉の通年性アレルギー性鼻炎患者4名中2名で改善がみられた。f-MRI の検討結果からペパーミントオイル吸入により脳活動亢進領域が認められるが、この反応は嗅覚を介したのではなく、知覚神経を介したものである可能性が示唆された。鼻孔拡張テープによる鼻腔抵抗の改善効果はアレルギー性鼻炎患者より非アレルギー性鼻炎患者で高く認められた。

A. 研究目的

アレルギー疾患は増加がみられ、self-medication として代替医療に対する関心が高まっている。代替医療の科学的評価としてアレルギー性鼻炎に対して高い頻度で用いられているアロマセラピー、及び鼻孔拡張テープの臨床的意義について検討した。

B. 研究方法

(1) ペパーミントの鼻閉への効果を明らかにするため、軽度～中等度の鼻閉を訴えるアレルギー性鼻炎患者及び非アレルギー性鼻炎患者を対象にペパーミントオイルを10cmの距離で1分間吸入後の鼻腔抵抗の変化を鼻腔通気度計を用いて吸気時総鼻腔抵抗 (Mask-Active-Anterior 法) ならびに自覚症状から検討し、空気吸入と比較した。また、通年性アレルギー性鼻炎患者にペパーミントオイルをアロマランプで1晩吸入を7日間連続で行い、自覚症状ならびに鼻腔抵抗を測定した。さらに functional MRI (f-MRI) を用いてアロマ吸入による脳血流変化部位の検討とキシロカイン麻酔を用いて知覚神経、嗅覚神経の及ぼす影響についても検討した。

(2) 鼻孔拡張テープの鼻閉への効果について鼻閉を訴えるアレルギー性鼻炎及び非アレルギー性鼻炎患者

計18名を対象に鼻孔拡張テープ装着後の鼻腔抵抗及び自覚症状を、テープ非装着の鼻閉患者24名を対象に比較検討した。

(倫理面への配慮)

本臨床研究を遂行するにあたり、参加者から十分な了解を得ることとし、文書による同意を得て行った。これらの検討は学内の倫理委員会に申請し、許可を得て行われた。

C. 研究結果

(1) ペパーミントの1分間の吸入によりアレルギー性鼻炎患者26例では12例に鼻腔抵抗の減少が認められた。空気吸入群では24例中4例で同様の検討で nasal cycle による影響とみられる低下がみられたが、有意にペパーミント吸入群で高かった (Fisher 検定 0.0317)。ただ、自覚症状の改善はペパーミント吸入により高率に認められ、鼻腔抵抗で変化がない患者でも認めた。一方非アレルギー性鼻炎患者ではペパーミント吸入により鼻腔抵抗の改善例も認められたが、ペパーミント非吸入 (空気吸入) 群と差は認められなかった。

ペパーミントオイルのアロマランプを用いた吸入を7日間就寝中に行った中等症鼻閉のアレルギー性鼻炎

患者では、4 例中 2 例で自覚症状の改善と共に鼻腔抵抗の減少も認められた。ペパーミント吸入による f-MRI の検討ではペパーミント吸入に同期する明らかな脳活動を認める例が存在し、鼻粘膜キシロカイン麻酔にて反応の減弱が認められたが、一方で嗅覚消失者においても f-MRI による反応が認められた。

(2) 鼻孔拡張テープによりアレルギー性鼻炎患者での鼻腔抵抗の改善効果は明らかではなかった。一方、鼻中隔湾曲症などの非アレルギー性鼻炎患者では鼻腔抵抗には有意な改善が認められ、その効果は 60 分以上比較的長時間認められた。

D. 考察

ペパーミント吸入によりアレルギー性鼻炎の中等症の鼻閉患者でも鼻腔抵抗の改善を認める症例がみられた。自覚症状の改善と鼻腔抵抗の改善は一致しないことがあり、ペパーミントの清涼感の影響と考えられた。f-MRI の検討から、ペパーミントの吸入による鼻閉改善は鼻粘膜への直接作用、及び知覚神経を介したものと示唆される。

一方、鼻孔拡張テープでアレルギー性鼻炎患者でも、鼻腔抵抗の改善がみられた症例もあったが、改善は軽度であり、対象群と比較して差はみられなかった。鼻粘膜の広範囲な腫脹によるアレルギー性鼻炎患者の鼻閉には拡張テープの効果は少ないものと考えられる。

E. 結論

ペパーミント吸入により、軽症～中等症のアレルギー性鼻炎鼻閉患者では、一過性ではあるが改善が期待される。一方、鼻翼拡張テープのアレルギー性鼻炎による鼻閉への効果は少ないと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

投稿中

2. 学会発表

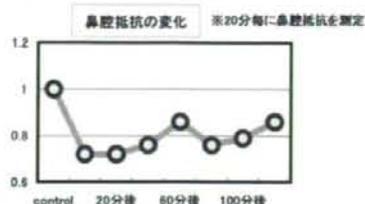
吉江うらら、米倉修二、久光美奈子、櫻井大樹、堀口茂俊、花澤豊行、岡本美孝. アレルギー性鼻閉患者におけるアロマセラピー効果の検討、ミニシンポジウム第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京 2008 年 6 月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

鼻腔通気抵抗に及ぼす影響

対象：軽度～中等度の鼻閉を有する症例 (23～42歳)
 ・ペパーミントオイル1分間吸入：26名
 ・鼻孔拡張テープ装着：18名
 ・鼻スチーム療法10分間吸入：8名



鼻腔通気抵抗の改善効果 (吸入後20分)

アレルギー性鼻炎患者	ペパーミント吸入		アレルギー性鼻炎患者	ペパーミント吸入	
	する	しない		する	しない
改善あり	10	2	2	2	
改善なし	8	11	6	8	

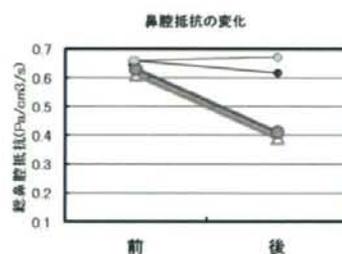
Fisher検定 0.0317

Fisher検定 1.0

アレルギー性鼻炎患者にペパーミントの吸入による鼻閉の改善効果

ペパーミントオイル就眠吸入 (7日間アロマランプ使用)

対象：中等度の鼻閉を有するアレルギー性鼻炎患者



鼻腔通気度改善効果 (20分後)

全鼻閉患者	鼻孔拡張テープ装着	
	する	しない
改善あり	11	4
改善なし	7	20

Fisher検定 0.0042

プロバイオティクスによる遺伝子発現変化の網羅的解析

分担研究者 岡野光博 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科准教授

研究要旨

衛生仮説を背景として、アレルギー疾患における代替医療として乳酸菌などのプロバイオティクスが注目されている。今回はプロバイオティクスの免疫学的作用機序を解明する目的で、乳酸菌抗原刺激による末梢血単核細胞 (PBMC) からの遺伝子発現の変化を cDNA マイクロアレイにて解析した。PBMC を 100 $\mu\text{g/ml}$ の乳酸菌抗原にて刺激し、培養 12 間後に細胞より mRNA を分離した。検討した 37,584 の遺伝子うち、乳酸菌刺激に対して有意な発現亢進を認めた遺伝子は 276 個(0.73%)、発現抑制を認めた遺伝子は 132 個 (0.35%)であった。最も発現が亢進した遺伝子の中には、Short transient receptor potential channel 1 (28.57 倍)、GM-CSF (18.07 倍)、SLAM (17.19 倍)、interferon-induced protein (12.88 倍) などがあり、また最も発現が低下した遺伝子の中には、osteopontin (0.09 倍)、IL-1R (0.11 倍)、CXCL6 (0.13 倍) などがみられた。パスウェイ解析を行うと、検討した 432 の遺伝子群のうち、乳酸菌の刺激に対して有意な発現亢進を認めた遺伝子群は 18、発現抑制を認めた遺伝子群は 36 認めた。発現が亢進した遺伝子群として、IL-10 や IL-19 などの制御性サイトカインを含む cytokine ($p=0.0025$) や IL-12RB2 や IL-2RA などを含む cell surface receptor ($p=0.0033$) などが同定された。また発現が抑制した遺伝子群として、CCL2 や CCR1 などの chemotaxis ($p<0.0001$) や inflammatory response ($p<0.0001$) などが同定された。乳酸菌抗原は、ヒト PBMC レベルにおいてサイトカイン産生や受容体発現の亢進、あるいは炎症反応や細胞遊走を抑制することによりプロバイオティクス作用を発揮し、花粉症の緩和や軽症化に寄与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

衛生仮説を背景に、代替医療のひとつとして乳酸菌などのプロバイオティクスがアレルギー疾患の予防や緩和に効果を示す可能性が報告されている。しかしながらその作用機序に関する検討は未だ十分ではない。

そこで今回我々は、プロバイオティクスの免疫系への作用を網羅的に解析することを目的として、乳酸菌抗原刺激による末梢血単核細胞 (PBMC) からの遺伝子発現の変化を cDNA マイクロアレイにて解析した。

B. 研究方法

乳酸菌として KW3110 株を入手した。KW3110 株は凍結融解を繰り返し、粗抗原を抽出した。花粉症患者を含むボランティア ($n=7$) より採血を行い、PBMC を分離した。PBMC を 100 $\mu\text{g/ml}$ の乳酸菌抗原にて刺激した。培養 12 間後に細胞を回収し、mRNA を分離した。蛍光標識 cDNA に変換した後、OptArray

Human V4.01 (37,584 プローブ) にハイブリダイズした。乳酸菌抗原非存在下での遺伝子発現を比較した。ノイズデータを除去した後、コントロールと比べ 2 倍以上の発現亢進を認めた遺伝子、あるいは 0.5 以下に発現低下を認めた遺伝子を抽出した。統計学的に有意な変動を認めた遺伝子に関してはパスウェイ解析を行い、変動遺伝子群を同定した。

(倫理面への配慮) ボランティアからの検体(鼻・副鼻腔粘膜、末梢血)採取に関しては、学術的な意義について十分な説明を行い、同意・協力が得られた上で採取保存する。本研究の一部は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・倫理委員会による審査を受け(課題名:アレルギー性鼻炎に対する乳酸菌(KW株)摂取の有効性の検討:承認番号071201)、承認されている。

C. 研究結果

検討した 37,584 の遺伝子うち、KW3110 株

の刺激に対して有意な発現亢進を認めた遺伝子は 276 個(0.73%)、発現抑制を認めた遺伝子は 132 個 (0.35%)であった。最も発現が亢進した遺伝子の中には、Short transient receptor potential channel 1 (28.57 倍)、GM-CSF (18.07 倍)、SLAM (17.19 倍)、interferon-induced protein (12.88 倍) などがあり、また最も発現が低下した遺伝子の中には、osteopontin (0.09 倍)、IL-1R (0.11 倍)、CXCL6 (0.13 倍) などがみられた。パスウェイ解析を行うと、検討した 432 の遺伝子群のうち、KW3110 株の刺激に対して有意な発現亢進を認めた遺伝子群は 18、発現抑制を認めた遺伝子群は 36 認められた。発現が亢進した遺伝子群として、IL-10 や IL-19 などの制御性サイトカインを含む cytokine ($p=0.0025$) や IL-12RB2 や IL-2RA などを含む cell surface receptor ($p=0.0033$) などが同定された。また発現が抑制した遺伝子群として、CCL2 や CCR1 などの chemotaxis ($p<0.0001$) や inflammatory response ($p<0.0001$) などが同定された。

D. 考察

以上の結果より、乳酸菌抗原は PBMC レベルにおいて約 1% の遺伝子の発現を制御し、プロバイオティクス作用を発揮する可能性が示された。変動遺伝子群の中には、IL-10 などのサイトカイン遺伝子群が発現亢進を示している。われわれは昨年度の研究で乳酸菌抗原は短時間での IL-10 を産生することを報告しており、矛盾しない。その一方で Short transient receptor potential channel 1 や GM-CSF などはプロバイオティクス作用への関与に関しては十分な検討はなく、今後網羅的解析により抽出された変動遺伝子の免疫病態的な意義付けを今後行い必要がある。

E. 結論

乳酸菌抗原は、ヒト PBMC レベルにおいてサイトカイン産生や受容体発現の亢進、あるいは炎症反応や細胞遊走を抑制することによりプロバイオティクス作用を発揮し、花粉症の緩和や軽症化に寄与する可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomiya R, Okano M, Fujiwara T, Maeda M, Kimura Y, Kino K, Yokoyama M, Hirai H, Nagata K, Hara T, Nishizaki K, Nakamura M. CRTH2 plays an essential role in the pathophysiology of Cry j 1-induced pollinosis in mice. *Journal of Immunology* 180 (8): 5680-5688, 2008.
- 2) Okano M. Current status of intranasal glucocorticoids in the management of allergic rhinitis. *Clinical and Experimental Allergy Reviews* 8: 57-62, 2008.
- 3) Okubo K, Goto M, Fujieda S, Okano M, Yoshida H, Morikawa H, Masuyama K, Okamoto Y, Kobayashi M. A randomized-double-blind comparative study of sublingual immunotherapy for cedar pollinosis. *Allergology International* 57 (3): 265-275, 2008.
- 4) Okano M, Otsuki N, Azuma M, Fujiwara T, Kariya S, Sugata Y, Higaki T, Kino K, Tanimoto Y, Okubo K, Nishizaki K. Allergen-specific immunotherapy alters the expression of BTLA, a co-inhibitory molecule, in allergic rhinitis. *Clinical and Experimental Allergy* 38 (12) 1891-1900, 2008.
- 5) 岡野光博. 通年性アレルギー性鼻炎に対する新規アプローチ. *アレルギーの臨床* 28: 840-845, 2008.
- 6) 岡野光博. アレルギー性上気道炎. *アレルギーの臨床* 29: 24-30, 2009.
- 7) 岡野光博. 花粉症の薬物治療. 診断・治療の実態と QOL の重要性について. *Clinic Magazine* 472: 49-53, 2009.

2. 学会発表

- 1) 春名威範、岡野光博ら: アレルギー性鼻炎に対する代替医療の実態に関する調査. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨

床大会. 2008. 6.

- 2) 檜垣貴哉、岡野光博ら：プロバイオティクスの末梢血単核細胞に対する作用の網羅的解析と免疫制御機構の機能解析. 第 47 回日本鼻科学会. 2008. 9.
- 3) 岡野光博：スギ花粉症に対する免疫療法の現状と限界、そして未来. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会（イブニングシンポジウム 3）. 2008. 11.

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

アレルギー治療の作用機序の解析

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

アレルギー疾患に対する代替医療について、科学的評価が可能なものについては作用機序の検討を行い、代替医療の問題点を明らかにすると同時に有用である可能性を明らかにする。実際には、基礎免疫学の立場から、アレルギーに対する代替医療（乳酸菌等プロバイオティクス投与など）の作用機序の解明に向けた基礎研究を行う。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おり、まずは Th1/Th2 のバランスの制御に注目し、これらに作用するかどうか等の検討を行う。また、Th2 免疫反応に関与する樹状細胞、マスト細胞、レギュラトリ-T細胞、NKT細胞などの関与に関して検討を行う。これによって、作用機序の解明を目指す。また、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、ならびに CD69 分子をターゲットにしたアレルギー性炎症の制御に関する基礎研究をおこなう。総合的な細胞レベル及び分子レベルの研究により、乳酸菌等プロバイオティクス等の作用機序を明らかにしたい。

A. 研究目的

基礎免疫学の立場から、アレルギーに対する代替医療（乳酸菌等プロバイオティクス投与など）の作用機序の解明に向けた基礎研究を行う。本年度は、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、ならびに CD69 分子をターゲットにしたアレルギー性炎症の制御に関する基礎研究をおこなうことを目的とした。

B. 研究方法

前年度までに確立した、抗原(アレルギー)特異的な TCR を持つエフェクター-Th2細胞から生体内で大量のメモリー-T細胞を作る系を用いて、ポリコム遺伝子の一つである RING1B のコンディショナルノックアウトマウスでのメモリー-T細胞の形成に注目してフローサイトメトリー、定量的 PCR を中心に解析を行った。ノックアウトマウスの T細胞での、肺内浸潤 Th2細胞のアポトーシスに関する分子機構を、特に BH3 only protein の発現を中心に解析した。エフェクター-Th2細胞ではなく、メモリー-Th2細胞のみによって誘導される、アレルギー性気道炎症発症の実験系を樹立し、CD69 ノックアウトマウスを用いてアレルギー

性気道炎症発症・病態形成における CD69 の役割を解析した。抗 CD69 抗体を用いてアレルギー性気道炎症の治療効果を解析した。

（倫理面）

千葉大学の動物実験指針にしたがって動物実験を行った。

C. 研究結果

次の3点の結果が得られた。1. ポリコム分子の一つである RING1B のノックアウトマウスでは、Th1/Th2ともにメモリー細胞が形成されないことが分かった。2. その機序として細胞の生存に関わる分子 BIM と BID の発現調節ができなくてアポトーシスが亢進しているためであることが分かった。生体レベルでの解析で、メモリー-Th2細胞によるアレルギー性気道炎症発症が起らないことも分かった（論文投稿中）。3. CD69 ノックアウトマウスでは気道炎症反応が低いこと、Th2細胞の浸潤が弱いこと。また、抗 CD69 抗体の投与によって喘息が抑制される（治療効果がある）ことが分かった。アレルギーの吸入によって一度炎症が起こった後に抗体を投与しても、症状の改善効果が鮮明に見られることが明らかになった（論文投稿中）。