

200802028A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

リアルタイムモニター飛散数の  
情報のあり方の研究と  
舌下ペプチド・アジュバント療法の  
臨床研究

平成20年度 総合研究報告書

主任研究者 大久保 公裕

平成21年(2009)年3月

## 目 次

### I. 総合研究報告

リアルタイムモニター飛散数の情報のあり方の研究と舌下ペプチド・アジュバント療法の臨床研究 大久保公裕 .....	1
自動花粉測定器の測定精度の改善に向けての検討 岡本美孝 .....	7
A Randomized Controlled Trial of Sublingual Immunotherapy for Japanese Cedar Pollinosis Shigetoshi Horiguchi, et al .....	9
Cedar and Cypress Pollinosis and Allergic Rhinitis: Quality of Life Effects of Early intervention with Leukotriene Receptor Antagonists Keita Sasaki, et al .....	18
Seasonal changes in antigen-specific T-helper clone sizes in patients with Japanese cedar pollinosis: a 2-year study S. Horiguchi, et al .....	27
自動花粉測定器を用いたリアルタイム花粉測定とその問題点* 岡本美孝 .....	35
山形県における花粉症の地域特異性 太田伸男 .....	42
Development of electron spin resonance radical immunoassay for measurement of airborne orchard grass ( <i>Dactylis glomerata</i> ) pollen antigens Yuichi Takahashi, et al .....	46
花粉症の薬物治療 太田伸男 .....	53
内視鏡下鼻副鼻腔手術のための支援機器 レーザー 太田伸男 .....	59
スギ花粉症患者における薬物療法の効果検証 - 花粉曝露室を用いて - 大久保公裕 .....	63
A Randomized Double-Blind Comparative Study of Sublingual Immunotherapy for Cedar Pollinosis Kimihiro Okubo, et al .....	66
Oral Administration of Heat-Killed <i>Lactobacillus gasseri</i> OLL2809 Reduces Cedar Pollen Antigen-Induced Peritoneal Eosinophilia in Mice Toshihiro Sashihara, et al .....	77
Re-Treatment with Omalizumab at One Year Interval for Japanese Cedar Pollen-Induced Seasonal Allergic Rhinitis Is Effective and Well Tolerated Satoshi Ogino, et al .....	84
Anti-IgE Antibody Therapy for Japanese Cedar Pollinosis: Omalizumab Update Kimihiro Okubo, et al .....	91
スギ花粉症のアレルゲン免疫療法における導入療法改良の試み 永田 真 .....	96

スギ特異的免疫療法のスギおよびヒノキ特異的IL-5産正への効果とヒノキ感作の意義 岡野光博	98
Allergen-specific immunotherapy alters the expression of B and T lymphocyte attenuator, a co-inhibitory molecule, in allergic rhinitis M. Okano, et al	101
CRTH2 Plays an Essential Role in the Pathophysiology of Cry J 1-Induced Pollinosis in Mice <sup>1</sup> Rie Nomiya, et al	111
Anging Exacerbates Restraint Stress-Induced Inhibition of Antigen-Specific Antibody Production in Mice Yumiko Ichihara, et al	120
スギおよびヒノキ花粉アレルゲンに結合する糖タンパク質糖鎖の構造特性と免疫活性 前田 恵, 他	126
アレルギー性鼻炎の新しい治療開発の現状 -免疫療法薬を中心に- 岡野光博	132
免疫療法の効果的な投与方法と作用機序に関する研究 湯田厚司	140
当科におけるスギ花粉症に対する舌下免疫療法の現状と2年間の治療成績 湯田厚司, 他	143
三重県におけるスギ・ヒノキ科花粉の2008年飛散結果と2009年飛散予想 湯田厚司, 他	148
スギ花粉症に対する舌下免疫療法-成人例の検討- Sublingual immunotherapy for cedar pollinosis in adults. 清水 優, 他	155
スギ花粉症に対する舌下免疫療法-小児例の検討 Sublingual immunotherapy for pediatric Japanese cedar pollinosis 押 正徳, 他	161
リアルタイムモニター飛散数の情報のあり方の研究と舌下ペプチド・アジュバント 療法の臨床研究 舌下免疫療法による扁桃上皮擦過片mRNAの変化 後藤 穰	170
スギ花粉症に対する舌下免疫療法* 後藤 穰	172
スギ花粉抗原とヒノキ花粉抗原の関連性 後藤 穰	179
舌下免疫療法における網羅的蛋白解析と経年的効果の検討 藤枝重治	183
Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population: a family and case-control study Hisako Enomono, et al	187
Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis M. Sakashita, et al	194

スギ精製抗原および抗原ペプチドに対する患者末梢血T細胞反応に関する研究 増山敬祐 .....	201
Patterns of Drug Prescription for Japanese Cedar Pollinosis Using a Clinical Vignette Questionnaire Goro Takahashi, et al .....	204
鼻噴霧用ステロイド薬 増山敬祐 .....	211
季節性アレルギー性鼻炎患者を対象としたフルチカゾンプロピオン酸エステル（フ ルナーゼ®）点鼻液とセチリジン塩酸塩（ジルテック®）との併用療法の検討（FEEL study） 増山敬祐 .....	217
花粉計測システムの運用 .....	235
街頭QOLアンケート調査 .....	363

## リアルタイムモニター飛散数の情報のあり方の研究と舌下ペプチド・アジュバント療法の臨床研究

主任研究者 大久保公裕 日本医科大学耳鼻咽喉科准教授

### 研究要旨

花粉の飛散を国民に伝えるリアルタイムモニターは黄砂や雪の影響を受けることが分かっている。多くの機器でこれらの影響を受けることが明らかになった。患者の症状予防に直結するこれらのデータをさらに正しい補正を行って、花粉情報を発信しなければならない。リアルタイムモニターの情報がどのように使用されなければならないか今後の課題であり、新しく導入した地域のデータも今後注目すべきである。

従来の皮下注射による免疫療法（SCIT）の効果は国際的に認められているが、日本では副作用や通院頻度の問題から頻用されていない。スギ花粉症の SCIT をクラスターと呼ばれる急速法で増量できたが、副作用もあるため専門施設での施行が望まれる。また SCIT の効果は PBMC からの IL-5 産生の抑制からも明らかになった。またスギ花粉の SCIT がヒノキ花粉症に効果を示す理由の一端も明らかになった。

新しい免疫療法である舌下免疫療法（SLIT）が小児に対し成人と同じプロトコールで安全に高い効果で施行できた。さらにより長期での検討や抗原量などの問題から治癒の可能性も探って行かねばならない。効果発現機序は制御性 T 細胞の増加、扁桃上皮細胞における遺伝子変化、血中のプロテオーム解析でのアポ A4 タンパクの増加などが示されてきた。今後、これらのメカニズムに関してのさらなる解析が今後のペプチド・アジュバント SLIT へ繋がるものと期待される。現状での SCIT、SLIT、ペプチドの反応性の研究から臨床試験を組んでゆきたいと思っている。

### 分担研究者

太田伸男 山形大学耳鼻咽喉科講師  
岡野光博 岡山大学耳鼻咽喉科准教授  
岡本美孝 千葉大学耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学教授  
後藤穰 日本医科大学耳鼻咽喉科講師  
永田真 埼玉医科大学呼吸器内科教授  
藤枝重治 福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科教授  
増山敬祐 山梨大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科教授  
湯田厚司 三重大学耳鼻咽喉科講師

### 研究協力者

石田晃弘 山形大学耳鼻咽喉科助教  
鈴木祐輔 山形大学耳鼻咽喉科大学院  
米倉修二 千葉大学耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学助手  
吉江うらら 千葉大学耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学医員

D Jean-Jacques 東京大学大学院工学系研究科機械工学専攻准教授

山口剛史 埼玉医科大学呼吸器内科助教  
中込一之 埼玉医科大学呼吸器内科講師  
杣知行 埼玉医科大学呼吸器内科助教  
野口恵美子 筑波大学人類遺伝学講師  
牧野友香 筑波大学人類遺伝学大学院  
松崎全成 山梨大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科准教授  
松岡伴和 山梨大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科講師

遠藤周一郎 山梨大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科助教

高橋吾郎 山梨大学大学院耳鼻咽喉科・頭頸部外科助教

安枝浩 独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター

横田匡彦 ウェザー・サービス株式会社

### A. 研究目的

スギ花粉症は、日本特有の花粉尘で急激な増加を示している。馬場廣太郎独協医科大学名誉教授の 2008 年に出された論文（Progress in Medicine 28(8):2001-2012, 2008）では 1998 年には 16.2% だったスギ花粉症の有病率が同じ全国耳鼻咽喉科医を対象とした調査で 26.5% となっていた。この増加は目を見張るものがあり、国民病とも呼ばれていた現状がより悪化したものと考えられる。このスギヒノキ花粉症患者の QOL は花粉飛散季節に障害され、また鼻や眼の以外の症状では皮膚の痒みや咽の症状が多く認められた。このスギ花粉症に対し、国民に多くの予防や治療の情報が必要である。我々研究班が全国に設置したリアルタイムモニターが示す飛散花粉量をどのように活用すれば、より正しい花粉症の予防や治療につながるかの検討が前年度までの科学研究に引き続き行う必要がある。これには花粉飛散のリアルタイムモニターの数値だけでなく、どのようにすれば正し

い情報となるか検討は必須である。さらにリアルタイムモニターの花粉飛散数がどの程度国民の花粉症の悪化に相関するかの検討も続けている。新しい治療法の検討も引き続き行われ、通常の抗原特異的免疫(減感作)療法だけではなく、先の研究結果から舌下免疫療法の根治的な花粉症の治療法を基礎的に研究した昨年度までの研究を進歩させる。今年度からは医師主導による舌下免疫療法(SLIT)の臨床試験として2005年秋から始まった試験の2006年、2007年の経年的効果について研究する。また現在行われている皮下注射による免疫療法(SCIT)の効果を検証する基礎的研究や今後のSLITの有効性の評価にも適応できるように評価方法などの臨床的研究を行った。このように最終的な目標のペプチド・アジュバントSLITを施行するための基礎研究を行っており、最終年度までに臨床試験を施行できるように検討を重ねる。

## B. 研究方法

### 1. 花粉症のリアルタイムモニターと花粉飛散の地域特異性(岡本、太田)

降雪や黄砂の影響がなく、測定全粒子数と花粉測定数の両値の表示が可能な機種(神栄)を用いて検討した。

### 2. 花粉暴露室の臨床試験(大久保)

中等症以上のスギ花粉症患者39症例に対してプラセボ対照クロスオーバー試験を行った。プランルカストカストあるいはプラセボを花粉暴露前後2日服用した。1m<sup>3</sup>中8000個の花粉を3時間暴露させ、15分ごとの症状をスコアで記入させ、暴露後3日までの症状を検討した。

### 3. 皮下注射による免疫療法(SCIT)の検討(永田、岡野)

方法論の検討は埼玉医科大学で行われた。気管支喘息合併例1症例を含む11例の成人スギ花粉症患者に前処置としてヒスタミンH1受容体拮抗薬を内服後、標準化アレルゲンの0.2JAU/mlの0.1mlから開始し、1時間ごとに1日3回皮下注射を反復し、週1回、5週で2000JAU/mlの0.1mlにまで到達させることを目標として行った。

### 4. 舌下免疫療法(SLIT)の臨床研究(大久保、後藤、湯田、藤枝)

小児スギ花粉症のSLIT15例の2008年のスギ花粉飛散期の臨床症状を解析した。プラセボ対照二重盲検比較試験(RCT)の試験ではSLITの治療前後で口蓋扁桃を擦過し扁桃上皮からtotal RNAを抽出し、cDNAを合成した。real time PCRで、GAPDH、

GUSBの発現に対するターゲット遺伝子の相対定量値を求めた。治療前後のプラセボ群(n=9)と実薬群(n=8)について46遺伝子の測定を行った。

福井大学ではSLIT前後の血漿を回収し、網羅的蛋白を行った。治療前後で変化を示している蛋白スポットについて質量分析を行った。

### 5. ペプチドに関連するスギ抗原特異的メモリーT(IL-4, IL-5, IL-10)細胞の研究(増山)

スギ花粉症患者5症例の末梢血よりリンパ球を分離し、樹状細胞(DCs)を誘導した。誘導したDCsにスギ抗原Cry j 1, 2またはスギ抗原由来ペプチド7種類を添加しさらに24時間培養した。DCsを同一患者の末梢血単核球と共培養しELISPOT assayを行い、Cry j 1, 2あるいはペプチド特異的IL-4, IL-5産生細胞数を測定した。

## C. 研究結果

1. 本年1月の花粉非飛散期の検討から花粉誤認率は、千葉市、成田市ともに0.111であった。ダークラム法による花粉カウント数との相関は、千葉市で0.80、成田市で0.78だった。一方、新たな補正式(新マトリックス)を用いた補正では、千葉市で0.76、成田市では0.87といずれも高い値を示した。2005年から2007年のそれぞれの年についても相関値に大きな変動はみられなかった。また2008年3月20日~21日は降雨のためダークラム法による測定が雨でスライドガラス上の花粉が洗われて過小評価になったこと、4月11日以降は黄砂の影響を受けたことが想定された。

山形で151例を対象にスクラッチテストを用いて陽性抗原の検討を行った。ハウスダスト、ダニの陽性率はそれぞれ79%、57%と高値を示した。スギ花粉は45%、イネ科花粉はカモガヤ51%、チモシー36%で、スギよりもイネ科が陽性率に高い傾向が認められた。またブタクサ30%、ヨモギ19%、カナムグラ37%、アルテルナリア7%、カンジタ5%、アスペルギルス5%であった。シラカンバ・クルミ・ヒメスイバ・コナラ・ヤナギはそれぞれ13%、8%、9%、11%、10%であり、真菌アレルギーより比較的高い陽性率であった。

2. プランルカスト群はプラセボ群に比較し「鼻閉スコア」「総合鼻症状スコア」を有意に減少させた。スギ花粉暴露後ではプランルカスト群は「鼻閉スコア」「鼻のかゆみスコア」「目のかゆみスコア」及び「総合鼻症状スコア」でプラセボを対照として有意に改善させた。花粉暴露室試験は薬剤治療や免疫療法などの効果検証に有用な方法であ

る。

3. その結果10例で、5週以内で目標維持量に到達し維持療法に移行できた。局所の腫脹は全例でみられた。3例でアナフィラキシーなどの全身的副作用を生じたがアドレナリンの皮下注射にて速やかに改善した。ただしこのうち2例は患者の意思で治療を中断した。

一方、効果のメカニズムの検討は岡山大学で行われ、皮下注射法による SCIT 施行 (SCIT 群, n=19) および非施行 (非 SCIT 群: n=46) のスギ花粉症患者で検討された。Cry j 1 あるいは Cha o 1、またスギおよびヒノキ粗抗原にて刺激し、培養上清中の IL-5 を測定した。SIT 群の Cry j 1-および Cha o 1-誘導 IL-5 産生量は非 SIT 群に比較して有意に低かった。スギ粗抗原特異的 IL-5 産生量も SCIT 群は非 SCIT 群と比較して有意な低値を示した。ヒノキに対する感作陰性例は、感作陽性例と同等の Cha o 1 およびヒノキヒノキ粗抗原に特異的な IL-5 産生を示し、そのメカニズムにつき今後の詳細な検討が必要である。

4. 自覚症状の平均スコアでは、くしゃみ・鼻汁・鼻閉・眼の痒みのすべてで 1 点未満であった。平均薬物スコアも 0.5 点未満と低く、効果は非常に高かった。また成人スギ花粉症はで、皮下注射免疫療法 (SCIT) (n=31)、SLIT (n=40)、薬剤による初期治療 (n=25) と飛散後治療 (n=40) の比較をおこなった。成人において SLIT は SCIT よりも劣っていた。しかし、薬物治療よりは効果が認められた。自覚症状と QOL とともに、SCIT > SLIT > 初期治療 > 飛散後薬物治療の順によいという新しい知見を得た。この成人 SLIT を行った例の末梢血を採取し、リンパ球を分離し、FACS での制御性 T リンパ球の解析とスギ花粉抗原刺激によるサイトカイン産生を検討した。制御性 T リンパ球のサブタイプの解析では SLIT による亢進が認められ、効果発現メカニズムの一つと考えられた。

RCT での扁桃の解析では 2 群間で変化のあった ABCA12 (ATP-binding cassette, sub family A, member 12), LGI4 (leucine-rich repeat LGI family, member 4), MESP1 (mesoderm posterior 1 homolog), WFDC2 (WAP four-disulfide core domain 2), WFDC5 について検討した。ABCA12、LGI4、MESP1、WFDC2 および WFDC5 の発現は、プラセボ投与群で治療後に減少する傾向を認めたが実薬群では増加していた。現在これら遺伝子のコードするプロテオームを解析する準備中である。

福井大学での結果では特異的に変動する 5 種類の

蛋白を同定しえた。そのうち Apolipoprotein A IV (アポ A4) が臨床効果と有意に相関し、症状が改善した者に高値を示し、改善が乏しかったものでは低値を示した。リコンビナントアポ A4 は、CryJ1 刺激によるヒト好塩基球のヒスタミン遊離率を抑制した。しかしヒト好酸球の IL-4 産生、ヒト CD4 陽性 T 細胞の IL-5 産生、ヒト好塩基球の IL-13 産生、末梢単核球の IgE 産生には影響を及ぼさなかった。SLIT で効果を認めた群では、末梢リンパ球での CryJ1 刺激によるヒスタミン遊離試験においても低値を示した。

5. スギ花粉症患者血液ではペプチド特異的 IL-4・IL-5 産生細胞と Cry j 1、2 特異的 IL-4・IL-5 産生細胞の間には相関が見られた。症例ごとに Cry j1、2 特異的細胞数に対するペプチド特異的細胞数の割合を算出すると、個体により差があり 80% 以上反応する患者もいれば 30% 程度しか反応しない患者もいた。また、同一患者においても産生するサイトカインの種類によって差が見られた。

#### D. 考察

リアルタイムモニターとしては最も頻用されている KH-3000 であるが、黄砂や雪の影響を受けることが分かっている。精度が高いと思われた神栄でもこれらの影響を受けることが明らかになった。患者の症状予防に直結するこれらのデータをさらに正しい補正を行って、花粉情報を発信しなければならない。リアルタイムモニターの情報がどのように使用されなければならないか今後の課題であり、埼玉、山形と増やした施設でのデータも今後注目すべきである。また山形ではスギ花粉抗原よりイネ科抗原に対する感作の率が高く、花粉症の地域特性性にも今後注意しなければならない。従来の皮下注射による免疫療法 (SCIT) の効果は国際的に認められているが、日本では副作用や通院頻度の問題から頻用されていない。埼玉医科大学ではスギ花粉症の SCIT をクラスターと呼ばれるラッシュの方法で増量できたが、副作用もあるため専門施設での施行が望まれる。また SCIT の効果は PBMC からの IL-5 産生の抑制からも明らかにおった。またヒノキ RAST 陰性でも PBMC レベルではヒノキ抗原に反応することが明らかになり、ヒノキ花粉症発症との関連性の検討が今後必要である。より副作用の少ない舌下免疫療法 (SLIT) の研究は RCT ではないが、小児に対する SLIT が成人と同じプロトコールで安全に高い効果で施行できた事は、増加している小児花粉症患者には朗報と

なる。またエビデンスレベルは高くないが、SCIT、薬物療法との効果の関連性も明らかになった。さらにより長期での検討や抗原量などの問題から治療の可能性も探って行かねばならない。

#### E. 結論

徐々に SLIT のメカニズムの検討は進み、制御性 T 細胞の増加、扁桃上皮細胞における遺伝子変化、血中のプロテオーム解析でのアポ A4 タンパクの増加などが示されてきた。今後、これらのメカニズムに関してのさらなる解析が今後のペプチド・アジュバント SLIT へ繋がるものと期待される。しかし各症例間におけるペプチド特異的 T 細胞と Cry j 1, 2 特異的 T 細胞数の比率は個体差が多く、ペプチドに対して反応性が高い患者と低い患者が存在することが示唆された。このことはペプチドの反応性が個々により異なり、ペプチド免疫療法についてはペプチド・アジュバント SLIT でも効果の違いが生じる可能性を示唆している。現状での SCIT、SLIT、ペプチドの反応性の研究から臨床試験を組んでゆきたいと思っている。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

- 岡本美孝、米倉修二、吉江うらら、黒崎元良、堀口茂俊、花澤豊行、高橋雪江、横田匡彦。花粉自動測定器の問題点とその改善に向けての検討。第 47 回日本鼻科学会、名古屋、2008 年 9 月。
- 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.
- 岡野光博：スギ花粉症に対する免疫療法の作用メカニズム。第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会（シンポジウム 免疫療法はどこまで解明されたか）。2009. 2.
- 岡野光博、檜垣貴哉、牧原靖一郎、野宮理恵、春名威範、西崎和則：スギ花粉症患者のヒノキ抗原に対する末梢血単核細胞応答。第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会。2009. 2.
- 山本卓典、近松一朗、松岡伴和、増山敬祐：Cry j 1-derived peptides に対する helper T cell response と Immunotherapy への peptide selection. 第 26 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2008.
- Kamijo A, Oyan Y, Endo S, Masuyama K, et al. : Expression of cysLY1 and cysLT2 receptors in chronic hyperplastic eosinophilic sinusitis. 22<sup>ND</sup> ERS & 27<sup>TH</sup> ISIAN, 2008.
- 松岡伴和、増山敬祐：スギ精製抗原および抗原ペプチドに対する患者末梢血 T 細胞反応について。第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2008.
- 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
- 藤枝重治 スギ花粉症における網羅的遺伝子・蛋白解析 第 20 回日本アレルギー学会 2008. 6. 東京
- 大澤陽子、高橋昇、窪誠太、小嶋章弘、山本英之、山田武千代、藤枝重治 スギ特異的舌下免疫療法の治療効果の検討 第 47 回日本鼻科学会総会 2008. 9. 名古屋
- 藤枝重治 アレルギー性鼻炎を考える：遺伝子・蛋白解析から治療まで 第 58 回日本アレルギー秋季学術大会 2008. 11. 東京
- 5) 意元義政、野口恵美子、有波忠雄、坂下雅文、広田朝光、玉利真由美、藤枝重治 フラグリン機能喪失変異とスギ花粉症の関連解析 第 58 回日本アレルギー学会秋季大会 2008. 11. 東
- 坂下雅文、広田朝光、大澤陽子、人見裕基、原田通成、玉利真由美、藤枝重治 酸化ストレス関連遺伝子 (CYP1A1) の成人スギ花粉症における影響 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008. 11. 東京
- 大澤陽子、高橋昇、窪誠太、小嶋章弘、山本英之、山田武千代、藤枝重治 スギ特異的舌下免疫療法の治療効果 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008. 11. 東京
- 大澤陽子、高橋昇、窪誠太、小嶋章弘、山本英之、山田武千代、藤枝重治 スギ特異的舌下免疫療法の治療効果の検討 第 311 回日本耳鼻咽喉科学会北陸地方部会連合会 2008. 12. 金沢
- 後藤穰、大久保公裕：シンポジウム「アレルギー性鼻炎の寛解と治療。」第 20 回日本ア



ルギー学会春期臨床大会.

17. 後藤穰、大久保公裕：プラナルカストのスギ花粉症に対する初期療法薬としての二重盲検比較試験—単独効果を中心に—. 第47回日本鼻科学会
  18. 後藤穰：ランチョンセミナー「スギ・ヒノキ花粉症に対する治療の実際」. 第72回日本皮膚科学会東京支部学術大会
  19. 山本卓典、近松一朗、松岡伴和、増山敬祐：Cry j 1-derived peptides に対する helper T cell response と Immunotherapy への peptide selection. 第26回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2008.
  20. Kamijo A, Oyan Y, Endo S, Masuyama K, et al. : Expression of cysLY1 and cysLT2 receptors in chronic hyperplastic eosinophilic sinusitis. 22<sup>ND</sup> ERS & 27<sup>TH</sup> ISIAN、2008.
  21. 松岡伴和、増山敬祐：スギ精製抗原および抗原ペプチドに対する患者末梢血 T 細胞反応について. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会、2008.
- 2 論文発表
1. 岡本美孝、自動花粉測定器を用いたリアルタイム花粉測定とその問題点、臨床免疫・アレルギー科 49 ; 408 - 414、2008.
  2. 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
  3. 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
  4. 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.
  5. Sakashita M, Yasudal K, Hirota T, Harada M, Ohkubo 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: 181875-1881, 2008.
  6. 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.
  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.
  9. Ogino S, Nagakura T, Okubo K, Sato N, Takahashi M, Ishikawa T: Re-Treatment with Omalizumab at One Year Interval for Japanese Cedar Pollen-Induced Seasonal Allergic Rhinitis Is Effective and Well Tolerated. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149:239-245
  10. 菅原一真、御厨剛史、橋本誠、大久保公裕、山下裕司：プラナルカスト水和物追加投与の花粉尘に対する短期 QOL 改善効果. *アレルギー・免疫* 16: 92-98, 2009.
  11. 湯田厚司、大久保公裕、服部玲子、押正徳、清水優、間島雄一：当科におけるスギ花粉症に対する舌下免疫療法の現状と2年間の治療成績. *耳鼻免疫アレルギー*. 26(4): 285-289. 2008. 12
  12. Sasaki K, Okamoto Y, Yonekura S, Okawa T, Horiguchi S, Chazono H, Hisamitsu, Sakurai D, Hanazawa T, Okubo K: Cedar and cypress pollinosis and allergic rhinitis: Quality of life effects of early intervention with leukotriene receptor antagonists. *Int*

- Arch Allergy Immunol 149: 350-358, 2009.
13. 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.
  14. Ichihara Y, Okano M, Nishioka K, Manabe N, Ichihara N, Jitsunari F, Fujiwara T, Nishizaki K. Aging exacerbates restraint stress-induced inhibition of antigen-specific antibody production in mice. *Allergology International* 58 (1); 119-124, 2009.
  15. 前田 恵、岡野光博、木村吉伸、大槻剛巳。スギおよびヒノキ花粉アレルゲンに結合する糖タンパク糖鎖の構造特性と免疫活性。職業・環境アレルギー誌 15: 24-29, 2008.
  16. 岡野光博。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-。アレルギー・免疫 15: 358-365, 2008.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 岡野光博。アレルギー性鼻炎の薬物治療 プロスタグランジン D2・トロンボキサン A2 受容体拮抗薬。医薬ジャーナル 44: 903-909, 2009.
  20. Takahashi Y, Aoyama M, Abe T, Aita T, Kawashima S, Ohta N, Sakaguchi M: Development of electron spin resonance radical immunoassay for measurement of airborne orchard grass (*Dactylis glomerata*) pollen antigens. *Aerobiologia*, 2008; 24:53-59
  21. 太田伸男:花粉症の薬物治療。アレルギーの臨床, 2008; 28(1):45-50
  22. 太田伸男:アレルギー性副鼻腔炎。アレルギーの臨床, 2008; 28(5):29-31
  23. 太田伸男:副鼻腔疾患の治療。ENTONI, 2008; 90:95-101
  24. Takahashi G, Matsuzaki Z, Nakayama T, Masuyama K. Patterns of Prescription for Japanese Cedar Pollinosis Using a Clinical Vignette Questionnaire. *Allergol Int* 57(4): 405-411, 2008.
  25. 増山敬祐、高橋吾郎、他：季節性アレルギー性鼻炎患者を対象としたフルチカゾンプロピオン酸エステル（フルナーゼ）点鼻液とセチリジン塩酸塩（ジルテック）との併用療法の検討（FEEL study）。アレルギー・免疫 15(2): 80-96, 2008.
  26. 後藤穰, 大久保公裕: スギ花粉症に対する舌下免疫療法. 臨床免疫・アレルギー科 51 巻 1 号. 37-43, 2009.
  27. 後藤穰, 大久保公裕他: 乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 のスギ花粉症改善効果. 指原紀宏, アレルギーの臨床 29 巻 2 号. 155-159, 2009.
  28. 後藤穰: スギ花粉抗原とヒノキ花粉抗原の関連性. アレルギーの臨床 29 巻 2 号. 109-112, 2009.
  29. 後藤穰: ペプチド免疫療法とその展望について教えてください(Q&A/特集). *JOHNS* 25 巻 3 号. 483-486, 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
藤枝重治、高橋 昇、大澤 陽子、窪 誠太、有波 忠雄、野口 恵美子、牧野 友香、内田 和彦、大久保 公裕 アレルギー疾患の治療薬且つ治療効果マーカー（特願 2008-053768 平成 20 年 3 月 4 日提出）
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## リアルタイムモニター飛散数の情報のあり方の研究と舌下ペプチド・アジュバント療法の臨床研究 自動花粉測定器の測定精度の改善に向けての検討

分担研究者 岡本 美孝 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 教授  
研究協力者 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  
横田 匡彦 ウェザー・サービス株式会社  
Delanay Jean-Jacques 東京大学大学院工学系研究科 機械工学専攻 助教授

### 研究要旨

詳細な花粉飛散状況の把握、花粉飛散予報の精度向上に自動花粉測定器の活用は期待されているが、現状では空中浮遊粒子との識別に問題があり、実際の測定の信頼性は十分ではない。測定精度の向上を目指して、空中浮遊粒子を花粉と識別してしまう誤認率を算定し、同時に花粉見逃し率の測定から新たな補正マトリックスを作成することで、測定精度の向上がはかれるかの検討を継続した。その結果、花粉誤認率は地域により異なり、地域毎に算定する必要があること、また年度によっても違いがある可能性、さらに黄砂の影響も検討に加える必要性が示された。

### A. 研究目的

リアルタイムで花粉測定が可能な自動花粉測定器の活用には大きな期待が持たれている。ただ、現状では空中浮遊粒子との識別に大きな課題を残しており、実際の使用にあたっては測定の信頼性が十分とはいえない。機種によっては降雪の影響を依然として受けていたり、感度の低さも問題となっている。自動花粉測定器の精度向上を目指した研究とその普及を図ることを目的とした。

### B. 研究方法

自動花粉測定器としてこれまでの検討から降雪や黄砂の影響がなく、測定全粒子数と花粉測定数の両値の表示が可能で他機種に比較して安価な機種（神栄）を用いて検討した。本年1月の千葉市及び成田市での花粉非飛散期の測定データから空中浮遊粒子を花粉と識別してしまう誤認率を算出し、花粉見逃し率から新たな補正マトリックスを作成した。また、2006年、2007年についても両市での同機種による全粒子数、花粉測定数から同様の検討を行った。

### C. 研究結果

本年1月の花粉非飛散期の検討から花粉誤認率は、千葉市、成田市ともに0.111であった。自動花粉測定器による本年2月1日から4月30日の間の従来の自動花粉測定器の測定値とダーラム法による花粉カウント数の相関は、千葉市で0.80、成田市で0.78、一方、新たな補正式（新

マトリックス）を用いた補正では、千葉市で0.76、成田市では0.87といずれも高い値を示した（千葉市のデータは2月に雷による測定器のデータ送信の出来なかった時期があり、3月1日から4月30日まで検討した）。2005年から2007年のそれぞれの年についても検討を行ったが、従来の測定値とダーラムの相関が低い年には新たな補正式で相関値が改善すること、一方、従来の測定値で相関が高い場合には2008年のように、新たな補正式を用いても相関値に大きな変動はみられなかった。

一方、本年度の検討結果から、3月20日～21日と4月11日～25日に測定値がダーラム法と比べて高い期間がみられた。天候の検討から3月20日～21日は降雨が時々みられたことからダーラム法による測定が雨でスライドグラス上の花粉が洗われて過小評価になったこと、4月11日以降は黄砂が目立っており、黄砂の影響を受けたことが想定された。

### D. 考察

千葉市、成田市での自動花粉測定器の従来の測定値、新たな補正式の検討、比較から花粉誤認率を検討することで、自動花粉測定器の精度の向上に強く期待できるものと考えられた。しかし、花粉誤認率は地域により異なり、地域毎に算定する必要があること、また、年度によっても違いがある可能性も示唆された。さらに精度の向上をはかるためには、黄砂の影響などの検討が必要であることも示された。

E. 結論

自動花粉測定値の精度の向上には、設置した地域での空中浮遊粒子の量、特性に応じた花粉誤認識率、及び機種の花粉見逃し率を検討することで可能であるが、さらに黄砂などの影響についても考慮が必要である。

F. 研究発表

1. 学会発表

岡本美孝、米倉修二、吉江うらら、黒崎元良、堀口茂俊、花澤豊行、高橋雪江、横田匡彦、花粉自動測定器の問題点とその改善に向けての検討。第47回日本鼻科学会、名古屋、2008年9月。

2. 論文発表

岡本美孝、自動花粉測定器を用いたリアルタイム花粉測定とその問題点、臨床免疫・アレルギー科 49 ; 408 - 414、2008.

ルギー科 49 ; 408 - 414、2008.

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

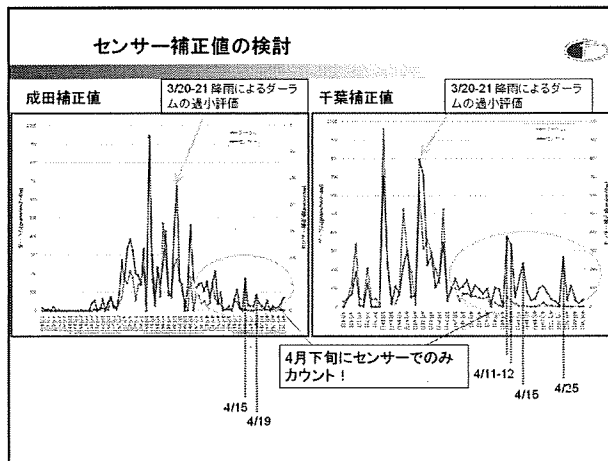
**現状での判別手技の問題点**

- ・花粉粒子数を過小評価している可能性
- ・土粒子の1.1~2.5%を花粉粒子と誤認する可能性。

↓

土粒子濃度が高い場合、即ち花粉粒子数/土粒子数が小さい場合、多くの土粒子を花粉と認識し、測定精度が低下する。

- ・砂塵が多い場合



センサー補正值パラメータ		para1	para2	相関	平均90%値全粒子数	ダーラム平均値
花粉粒子識別率	土粒子を花粉粒子と識別する誤差率	花粉見逃し率	花粉誤認識率			
2006	<ラポデータ>	<1月センサーデータ>			<211~430>	<211~430>
成田 Shinyei	0.507	0.0342	2.1	0.073	0.91	0.047
2007						
成田 Shinyei	0.507	0.0303	2.1	0.064	0.80	0.091
千葉 Shinyei	0.507	0.0308	2.1	0.065	0.77	0.045
2008						
成田 Shinyei	0.507	0.0505	2.2	0.111	0.87	0.116
千葉 Shinyei	0.507	0.0505	2.1	0.111	0.76	0.122
					<311~430>	<311~430>

花粉数 = para1 × 90%値 - para2 × 全粒子数

# A Randomized Controlled Trial of Sublingual Immunotherapy for Japanese Cedar Pollinosis

Shigetoshi Horiguchi<sup>a</sup> Yoshitaka Okamoto<sup>a</sup> Syuji Yonekura<sup>a</sup> Toru Okawa<sup>a</sup>  
Heizaburo Yamamoto<sup>a</sup> Naoki Kunii<sup>a</sup> Daijyu Sakurai<sup>a</sup> Takashi Fujimura<sup>a</sup>  
Kazuyoshi Nakazawa<sup>b</sup> Hiroshi Yasueda<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University and <sup>b</sup>Department of Pharmacy, Chiba University Hospital, Chiba, and <sup>c</sup>Clinical Research Center, National Hospital Organization, Sagamihara National Hospital, Sagamihara, Japan

## Key Words

Specific Immunotherapy · Allergic rhinitis · Clinical trial · Th2 · T cell clone

## Abstract

**Background:** Japanese cedar pollen represents an important and unique allergen. Sublingual immunotherapy (SLIT) has been suggested to be a highly effective route of desensitization against a variety of allergens. However, little information is available about its use in cedar pollen allergy. **Methods:** A blinded randomized, placebo-controlled trial employing SLIT for cedar pollinosis was conducted over a period of 6 months. Sixty-seven subjects were enrolled and the symptom scores during the pollen season were evaluated by a symptom diary, measurement of cedar-specific IgE and IgG4, and determination of Cry j-specific Th2 clones before SLIT and before and after the pollen season. **Results:** No major adverse effects were observed in either group. The serum-specific IgG4 activity increased significantly after SLIT in the active group. The active group also exhibited significantly lower symptom scores compared to the placebo. The specific Th2 clone sizes were not significantly different between the groups before the pollen season. However, an increase in the clone size was observed after the pollen sea-

son in the placebo group, but not in the active group. **Conclusion:** Use of SLIT for Japanese cedar pollinosis was found to be safe and associated with an increase in cedar-specific IgG4 levels. Such therapy inhibited the increase in Cry j-specific Th2 clone size induced by pollen exposure. Finally, use of SLIT resulted in significant improvement of the clinical symptoms of cedar pollinosis in this patient population. These observations suggest that SLIT may offer another safe approach to the management of cedar pollinosis.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

## Introduction

In recent years, many countries have experienced an increase in the prevalence of allergic rhinitis as well as other allergic disorders [1, 2]. The most important pollen allergens in Japan are tree pollens, such as the Japanese cedar and Japanese cypress [3, 4]. With the exception of the Hokkaido and Okinawa regions, the Japanese cedar is widely distributed and occupies more than 18% of Japan's land surface area. The Japanese cypress is distributed predominantly to the west of the Kanto region. However, the planting of Japanese cedar trees is increasing. Cedar and cypress pollens share a common antigen

**KARGER**

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)

© 2007 S. Karger AG, Basel  
1018-2438/08/1461-0076\$24.50/0

Accessible online at:

Correspondence to: Dr. Yoshitaka Okamoto  
Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery  
Graduate School of Medicine, Chiba University  
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670 (Japan)

and more than 70% of patients who are allergic to cedar pollen also develop cypress pollinosis [5, 6]. Around the Tokyo region, the cedar pollen season usually starts in the middle of February and is followed by the cypress pollen season which lasts until the beginning of May. Consequently, many patients with cedar pollinosis suffer from heavy pollen exposure for almost 12 weeks. In addition, Japanese cedar and cypress pollen can travel more than 100 km from the source, thereby raining down large amounts of pollen on other large cities. This situation is considerably different from that experienced in other countries where the most common allergens are grass pollens and ragweed, which generally travel distances of several hundred meters, and the pollen season lasts for less than 6 weeks [7]; however, it is similar to Northern European countries and North America where birch and other tree pollens are the major contributors.

Subcutaneous allergen-specific immunotherapy (SCIT) has been evaluated and shown to be an effective approach to change the course of allergic rhinitis [8–13], including Japanese cedar pollinosis [14]. However, an alternative method of administration is still required because the SCIT approach has been associated with the risk, albeit very low, of anaphylactic shock [15] and the inconvenience of frequent visits to the physician's office.

A recent review of randomized controlled studies of sublingual immunotherapy (SLIT) conducted outside Japan has strongly suggested its efficacy against a variety of allergens [16–21]. SLIT could be an attractive approach for Japanese cedar pollinosis if efficacy, safety, mechanisms and effective biomarkers can be clearly established.

The present placebo-controlled randomized studies were designed to determine the effects of SLIT on Japanese cedar pollinosis employing recombinant hybrid peptides consisting of 7 HLA class 2 restricted T cell epitopes of Cry J, the major allergen of Japanese cedar pollen [22].

## Methods

### Subjects

The study population consisted of 67 patients (33 males and 34 females), ranging in age from 20 to 37 years, who were otherwise healthy, but had a clinical history of Japanese cedar pollinosis for at least the last 3 consecutive cedar pollen seasons. The subjects lived in and around the city of Chiba, where a similar amount of pollen spread would be expected. The diagnosis of cedar pollinosis was based on clinical history, positive allergen-specific skin tests (wheal diameter  $\geq 10$  mm) to a standardized cedar pollen extract (Torii Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) and serum

cedar pollen-specific IgE levels of  $\geq$  score 2 by the CAP radioallergosorbent test (CAP-RAST; SRL, Tokyo, Japan). The exclusion criteria included a history of severe asthma, use of antiallergic drugs within 4 weeks and a prior history of any allergen-specific immunotherapy, including therapy for cedar pollen. Pregnant women or those at risk of pregnancy were also excluded. The study was conducted at the Chiba University Hospital and the protocol was approved by the Ethics Committee of Chiba University; written informed consent was obtained from each of the patients prior to participation in this study.

### Japanese Cedar Pollen Extracts

Standardized Japanese cedar pollen extracts (Torii Pharmaceutical Co. Ltd.) were used [23]. The extract [1,000 Japanese Allergy Units (JAU)/ml] contained 1.5  $\mu$ g of Cry j 1, which is the major allergen of Japanese cedar pollen. The amount of Cry j 1 was quantitated by an enzyme-linked immunosorbent assay, as reported previously [24].

### Study Protocol

The study was placebo controlled and single blinded. The enrolled subjects were randomly divided into 2 groups with a ratio of 2:1 according to the table of random numbers by the Department of Pharmacy at the Chiba University Hospital. A controller who was not directly involved in this study was responsible for group allocation. The patients were divided randomly into the active (treatment) and placebo groups. A group allocation number was given to each patient. To prevent the leakage of information, this number was closely guarded jointly by the controller and a member of the ethical committee who was also not directly involved in the study, until accessed with the key after the completion of the study. The active group consisted of 43 patients who received the pollen extract and the placebo group consisted of 24 patients who received the placebo (inactive) for sublingual administration by the spit method (table 1). The sample size was determined based on previous similar studies [25]. The induction/buildup phase was 1 month, with the administration of an increasing daily number of the extract drops at 3 concentrations. The patients received 1 ml of 1,000 JAU extract or placebo once weekly as shown in table 2. Although the safety of the daily administration of SLIT has been reported recently, the weekly administration was chosen in this study in order to further reduce the possibility of any serious adverse events. No study of SLIT for Japanese cedar pollinosis has been reported to date. However, the development of asthma attacks by exposure to pollen has been observed in some patients [14]. The maintenance dose of the antigen in the present SLIT studies was about 100 times higher than that routinely used in SCIT. Administration was started at the beginning of October 2005 and ended at the end of April 2006. The patients carefully completed a pollen diary regarding their nasal symptoms and the usage of rescue drugs (such as antihistamines). Data were collected and analyzed at the Department of Clinical Testing of the Chiba University Hospital.

The nasal symptoms were evaluated on a scale from 0 to 4 in accordance with the *Practical Guidelines for the Treatment of Allergic Rhinitis, Japan* [26], as follows: 0 = no sensation; 1 = mild; 2 = moderate; 3 = severe; 4 = extremely severe. Daily episodes of sneezing and nose blowing were rated 0–4, as follows: 0 = none; 1 = 1–5 episodes; 2 = 6–10 episodes; 3 = 11–20 episodes; 4 = more than 20 episodes. The medications were also recorded according

to drug characteristics and duration of usage, according to the guidelines as follows: antihistamines, mast cell stabilizers and vasoconstrictors were listed as 1, topical ocular or nasal steroids as 2.

#### Immunoglobulin Assay

Serum Cry j 1-specific IgG4 antibodies were measured using microtiter plates coated with 100 ng/well of Cry j 1 which was purified as reported previously [27]. Allergen-coated wells with serum samples (diluted 1:50) were incubated for 2 h at 37°C, and then washed with PBS. The plates were incubated with 100 µl of biotinylated monoclonal anti-IgG4 antibody (BD Pharmingen; 500 ng/ml) for 1 h at 37°C, and then overnight at 4°C. After washing, the plates were incubated with 100 µl of streptavidin-γ-D-galactosidase conjugate (Roche Diagnostics) at 1:2,000 dilution for 1 h at 37°C, and washed. Finally, 100 µl of 5 mM o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside was added to the wells and incubated for 1 h at 37°C. After the enzyme reaction was stopped with 100 µl of 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, the absorbance at 415 nm was read using a microplate reader.

The specific IgG4 antibody levels were calculated from control curves with serial dilutions of a reference serum pool, which was prepared from 5 sera with high levels of Cry j 1-specific IgG antibody. The IgG4 antibody levels in the reference pool serum were arbitrarily assigned to be 100 U/ml.

#### Analysis of Th Cytokines and Cell Clones

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by the Ficoll-Hypaque method and stored at -80°C until analysis, using a cell banker (Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd., Fukushima, Japan).

Th1/Th2 cytokine profiles were analyzed using FACS analysis. PBMCs ( $5 \times 10^5$ ) were stimulated with PMA and ionomycin for 4 h in the presence of 2 µM monensin, which inhibited the secretion of protein produced de novo. The cells were stained with anti-CD4 antibody for 15 min on ice. After washing with PBS, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 10 min on ice. After blocking with 3% bovine serum albumin for 10 min, the cells were incubated on ice for 30 min with anti-IFN-γ labeled with fluorescein isothiocyanate and anti-IL-4 labeled with phycoerythrin. A flow-cytometric analysis was performed on FACS Calibur (Becton Dickinson, Irvine, Calif., USA). The antibodies for FACS analysis were purchased from BD Bioscience (San Diego, Calif., USA).

The Cry j-specific Th2 clone sizes were determined by an ELISPOT assay using the recombinant hybrid peptide. The hybrid peptide comprised the 7 CD4 T cell determinants of Cry j 1 and Cry j 2, the major Japanese cedar pollen allergens [22]. Almost the entire patient population with Japanese cedar pollinosis respond to this hybrid peptide and the responses are comparable to the individual responses to Cry j 1 and Cry j 2 [22]. The monoclonal antibodies used in the ELISPOT analysis were obtained from Mabtech (Stockholm, Sweden). The anti-human IL-4 or IL-5 monoclonal antibodies were diluted to a concentration of 15 µg/ml in sterile, filtered (0.45 µm) PBS (pH 7.2), and 100 µl per well were added onto nitro-cellulose plates (Millititer; Millipore Corp., Bedford, Mass., USA). The plates were incubated overnight at 4°C and the unbound antibodies were washed with filtered PBS thereafter. After the last wash, PBS was sucked through the membrane

**Table 1.** Baseline characteristics of the patients

	Treatment group (n = 43)	Placebo group (n = 24)
Mean age, years <sup>1</sup>	26.8 ± 5.4	26.4 ± 5.9
Female sex	21 (48.8)	13 (54.2)
Mean duration of cedar pollinosis, years	8.7	9.1
Type of allergic rhinitis		
Cedar pollinosis with perennial	7 (16.3)	3 (17.5)
Cedar pollinosis with other pollinosis	5 (11.6)	4 (16.7)
Cedar pollinosis only	31 (70.5)	17 (70.8)
Additional allergic history		
History of asthma symptoms	2 (4.6)	0
Current asthma symptoms	0	0
History of allergic conjunctivitis	40 (93.0)	19 (75.0)
Cedar pollen RAST score <sup>1</sup>	4.18 ± 1.01	4.14 ± 0.92
Peak of daily total nasal symptoms score in the last cedar pollen season	4.8	4.5

Figures in parentheses are percentages.

<sup>1</sup> Data are means ± SD.

**Table 2.** Dose and dosing frequency

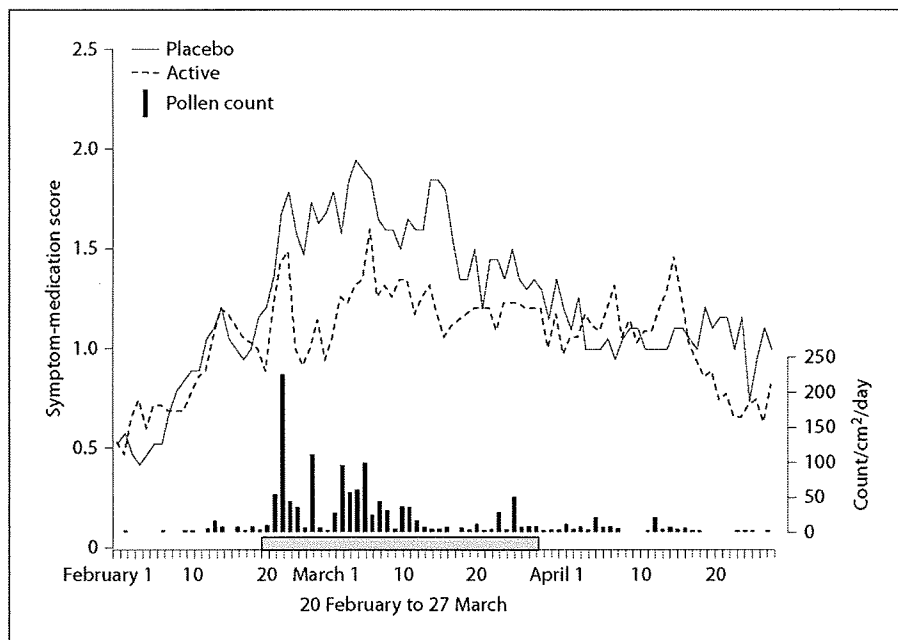
	Week 1 20 JAU	Week 2 200 JAU	Week 3 2,000 JAU	Week 4 2,000 JAU
Day 1	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	1.0 ml
Day 2	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml	
Day 3	0.6 ml	0.6 ml	0.6 ml	
Day 4	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	
Day 5	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	
Day 6				
Day 7				

The induction phase with an increasing number of extract drops over 5 days a week at 3 concentrations for 3 weeks and the maintenance phase (week 4) with 1 ml of 1,000 JAU extracts once weekly are shown.

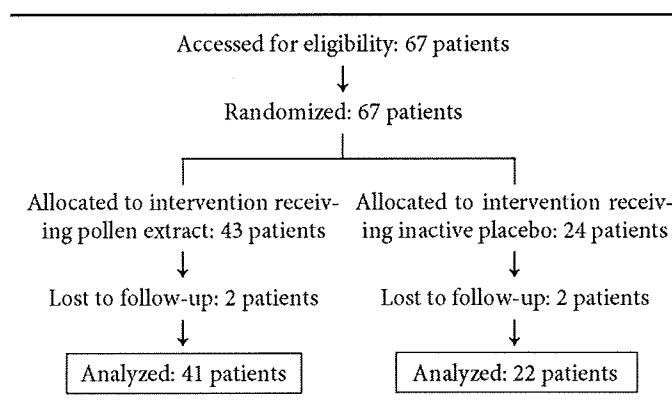
under vacuum (Millipore). One hundred microliters of AIM-V medium with or without 20 µM hybrid peptide was added to  $5 \times 10^5$  cells per well, and the plates were incubated for 10 h at 37°C. All assays were done in duplicate. The cells were subsequently washed before adding 100 µl of the biotinylated monoclonal antibodies (1 µg/ml), and incubated for 2 h at room temperature.

The plates were washed and incubated for 90 min at room temperature with 100 µl of streptavidin alkaline phosphatase (Mabtech) at a dilution of 1:1,000. The unbound conjugate was removed by another series of rinsing before 100 µl of BCIP/NBT substrate solution (Bio-Rad, Richmond, Calif., USA) was added and the plates were incubated at room temperature until dark

**Fig. 1.** Daily combined Japanese cedar and cypress pollen counts in 2006 in Chiba measured by the Durham pollen sampler and symptom-medication score (mean values) of patients during the pollen season.



**Table 3.** Study participation



spots emerged (1 h). The color development was stopped by repeated rinsing with tap water. After drying, the spots were captured photoelectrically and counted by a computed analysis to avoid any visual bias, using an auto counter (ImmunoScan; CTL, Cleveland, Ohio, USA).

#### Statistical Analysis

After completion of the study, the clinical and laboratory data were analyzed by a biostatistician who was not involved in carrying out the clinical trial. After completing the analysis, the allocation identification numbers for the active and placebo groups were accessed with a key. The Mann-Whitney U test was performed to compare symptom scores as well as symptom-medication scores between placebo and active groups. The Wilcoxon

signed rank test was used for paired comparisons of the Cry j 1 specific IgG4 levels before and after SLIT. All statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software, version 4.

During the statistical calculations in the present studies, the  $\beta$  error was defined as 0.2, power was 80% and the  $\alpha$  error was defined as 0.05. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

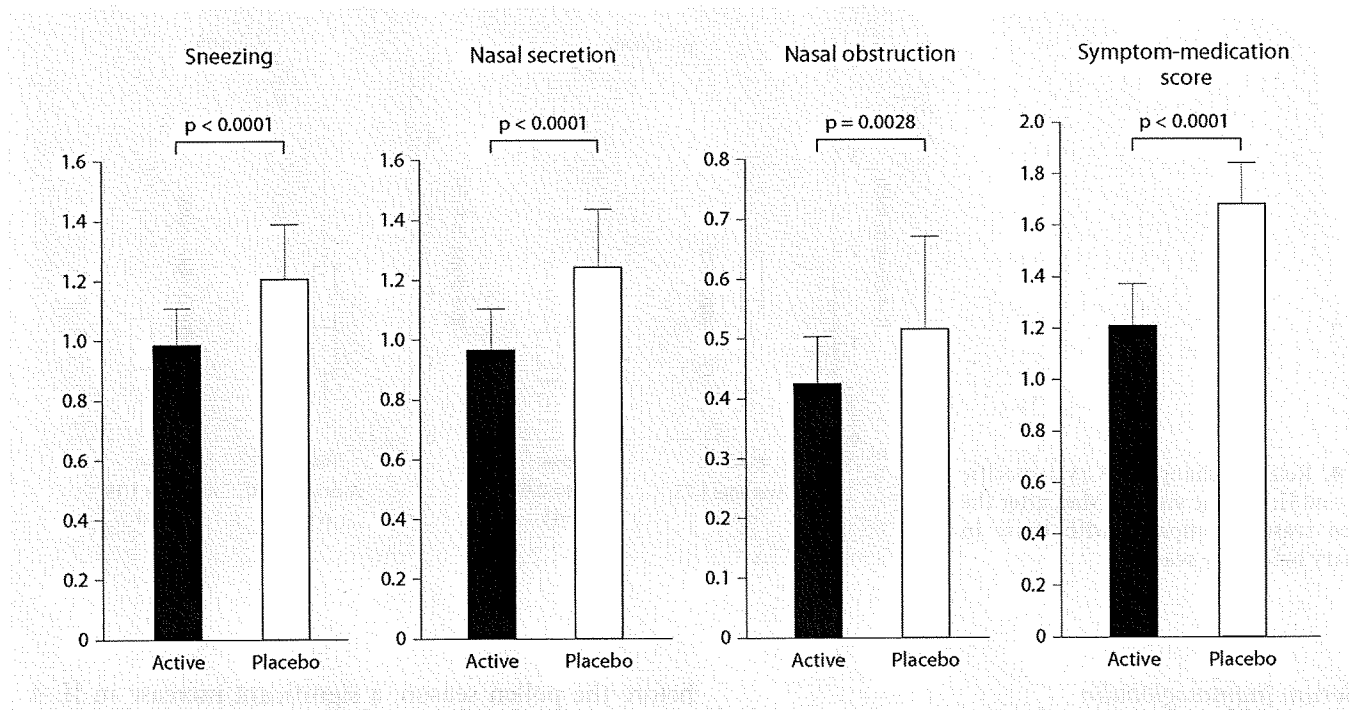
## Results

Four patients were withdrawn from the study for personal reasons, but not due to any adverse effects. All other subjects exhibited full compliance with the study protocol. As a result, 63 patients (41 patients from the active group and 22 patients from the placebo group) were analyzed further for effectiveness of SLIT (table 3).

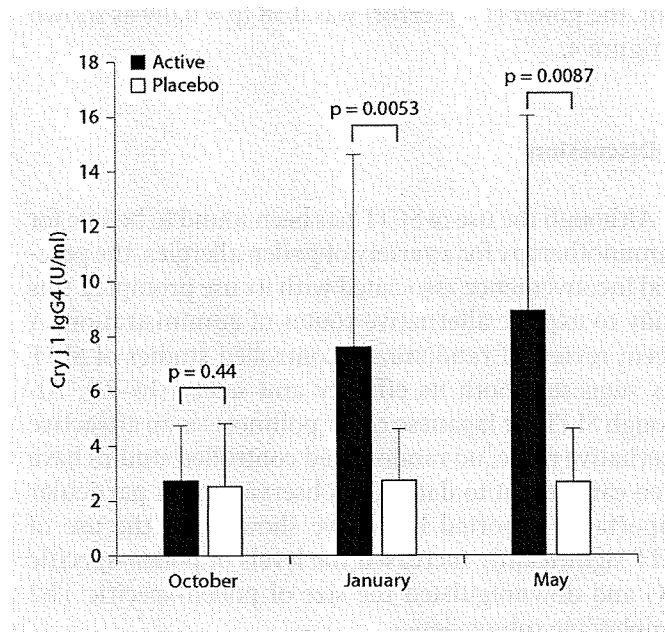
### Adverse Effects

Fifteen adverse effects were reported during the treatment. Of these, 13 subjects were in the active treatment group and 2 in the placebo group. Two patients in the active group complained of mild urticaria of the face or breast. The remaining subjects exhibited mild oral pruritus or oral pain (Common Terminology Criteria for Adverse Event grade 1). All adverse effects were transient and resolved spontaneously. No intervention was necessary.





**Fig. 2.** Average symptom scores of sneezing, nasal secretion, nasal obstruction and symptom-medication score during the high pollen season, from 20 February to 27 March 2006. The average score of the active group was significantly lower than that of the placebo group.



**Fig. 3.** Levels of serum Cry j 1-specific IgG4 before/after pollen dispersal. Specific IgG4 significantly increased in the active group but not in the placebo group and a significant difference was observed between the groups ( $p < 0.05$ ).

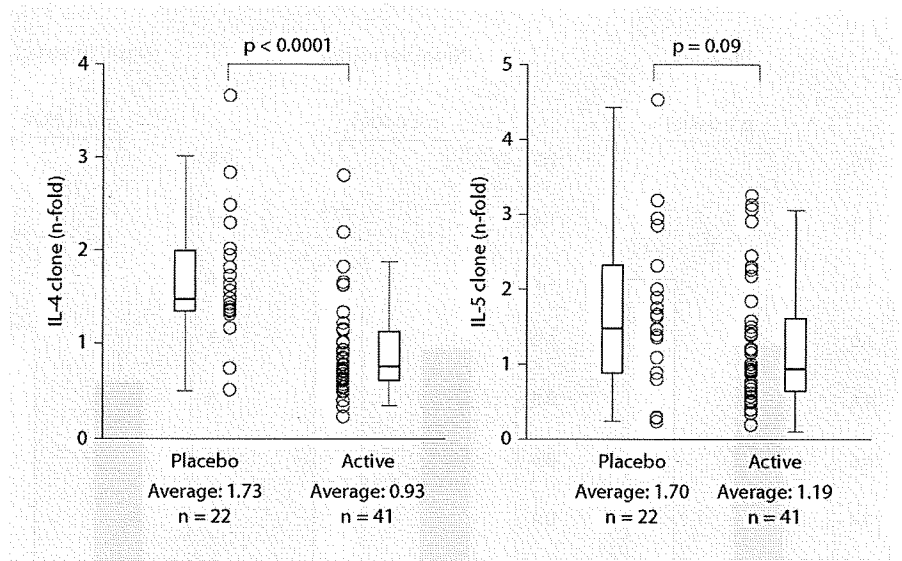
#### Pollen Counts

In 2006, the Japanese cedar pollen season started in the middle of February and was followed by cypress pollen, which continued until the end of April. The duration of the pollen season extended from 20 February to 27 March. The combined annual amount of cedar and cypress pollen was 1,154/cm<sup>2</sup> according to the Durham pollen sampler in Chiba.

#### Symptoms

The nasal symptoms and medication scores during the pollen season are shown in figures 1 and 2. The temporal profiles of nasal symptoms and medication scores were in general similar in the active and placebo groups and reflected the pollen counts in the community. However, the scores were lower in the active (treatment) group, especially during the peak of the pollen season as shown in figure 1.

The symptom scores for sneezing, nasal secretion volume, degree of nasal obstruction and medication scores were significantly higher in the placebo group compared to the active (treatment) group ( $p < 0.01$ ) during the peak of the pollen season as shown in figure 2.



**Fig. 4.** Relative change of Cry j-specific IL-4 and IL-5 clone sizes in May, after the pollen season, compared with those in January before the season.

#### Serum Immunoglobulin

There were no significant differences in the 2 study groups for the Japanese cedar pollen-specific IgE and IgG4 levels in the serum samples collected in October, just before SLIT was initiated. On the other hand, after the initiation of immunotherapy, Cry j-specific IgG4 levels exhibited a significant increase in the active group in January before the pollen season. Significantly higher levels of specific IgG4 were observed in the active group for at least 4 months after the initiation of the immunotherapy as shown in figure 3. No significant effects of immunotherapy were detected for the levels of specific IgE (data not shown). No changes in the specific IgE levels were observed relative to the cedar pollen dispersion between January and May. The levels of specific IgG4 also did not exhibit any change after pollen exposure in both the active and placebo groups (fig. 4) and the levels did not correlate with the nasal symptom scores (data not shown).

#### Th1/Th2 Cytokine Profiles

The number of Th1/Th2 cells in the peripheral blood CD4 T cells did not change significantly and no significant difference was observed between the 2 groups during the study period (data not shown).

#### Cry j-Specific Th2 Clone Sizes

The number of Cry j-specific IL-4 and IL-5 spots showed a strong correlation. Although the number of spots was similar between the active and placebo groups

before the pollen season, a significant increase in IL-4 spots was observed only in the placebo group after the pollen season. The increase in IL-4 clone size during the pollen season in the active and placebo groups was  $1.71 \pm 0.71$  and  $0.70 \pm 0.52$  (mean  $\pm$  SD), respectively ( $p < 0.0001$ ). On the other hand, the increase in IL-5 clone size between the active and placebo groups was not significant, the power ( $1 - \beta$  error) was 0.58 ( $p = 0.09$ ) as shown in figure 4.

#### Discussion

Although the use of SCIT has been found to be safe for immunotherapy for a variety of pollen allergies, the practical inconvenience associated with its use prompted this study to explore alternative routes of administration. A recent review of randomized controlled studies of SLIT has suggested both its efficacy and safety [16–21]. Although SLIT for Japanese cedar pollinosis is an attractive alternative route, no randomized controlled studies have been carried out to date. The observations of particular importance reported here have shown that the use of SLIT significantly increased the levels of pollen-specific IgG and downregulated the size of pollen-specific Th2 lymphocyte subset clones.

In order to avoid adverse effects, such as local pain and swelling associated with injection and possible anaphylactic reactions, a dose of 40 JAU/month as a maintenance dose has generally been utilized in SCIT for Japanese pol-

linosis. In this study 1,000 JAU/week (4,000 JAU/month) was used as a maintenance dose in SLIT, which was 100 times more than that used in SCIT. The choice for such a dose was somewhat arbitrary and the optimal dose required for effective and safe use of SLIT remains to be determined.

The combined Japanese cedar and cypress pollen counts generally exceed 3,000/cm<sup>2</sup>, as measured by the Durham pollen sampler in Chiba and Tokyo. However, in 2006 the pollen counts were 1,154/cm<sup>2</sup>, which was one third of the average for the last 5 years. In Japan, the pollen counts and the counts/cm<sup>2</sup> are usually measured by the Durham samplers, which utilize a gravimetric method that is different from the Burkard sampler, a volumetric method that is widely used in European countries. Direct comparison of the counts by the 2 methods can be difficult, because the ratio between the 2 methods depends on the local meteorological conditions and the types of pollen. When these methods were compared in 2005, the counts obtained by the Burkard sampler were about 12 times higher than those obtained by the Durham sampler [28].

During SLIT, no adverse effects greater than Common Terminology Criteria for Adverse Event grade 3 were observed. Three months after SLIT, serum Cry j 1-specific IgG4 was elevated in the active group. However, the specific IgE levels were not significantly different between the groups.

Several previous studies employing SLIT have observed an increase in allergen-specific IgG4 levels and specific IgG4/IgE ratios in the serum [29, 30]. However, the precise role of increased IgG4 in the effectiveness and outcome of such immunotherapy remains to be determined. Lima et al. [31] reported that the IgG levels correlated with the clinical efficacy as a blocking antibody, but other studies have failed to demonstrate such a correlation [32]. The increased levels of Cry j 1-specific IgG4 antibody in this study indicate that SLIT can induce specific antibody responses. However, the role of IgG4 antibody in the mechanisms of clinical effectiveness remains to be defined. No relationship between the IgG4 responses and the clinical efficacy was observed in this study.

In the present studies, the use of SLIT was associated with milder clinical symptoms and lower medication scores during the pollen season and a significant reduction in each symptom was observed. As pointed out earlier, the doses in this SLIT study were much higher than those generally used in SCIT. However, in SLIT with other allergens, the clinical efficacy has been shown to be allergen dose dependant [33]. Although the swallow-SLIT

method is currently widely used, we selected the spit-SLIT method to further reduce the possibility of adverse effects, since no SLIT trials with Japanese cedar pollinosis have been carried out to date. Further studies will be needed to assess the dose responses, temporal intervals and vehicles of administration to obtain optimal effectiveness with SLIT.

Cedar pollen-specific IgE and IgG4 did not increase significantly with pollen exposure, which might be explained in part by the relatively small amount of pollen dispersal observed during these studies.

The total number of Th2 cells in the peripheral blood did not increase during the pollen season and Th1/Th2 cytokine profiles did not change throughout the study in either group. However, the profiles of the allergen-specific Th cells were quite different. The patients with cedar pollinosis are thought to have cedar pollen-specific memory Th cell clones and the treatment is aimed at diminishing the size of Th2 clones. Since the Th cell response is restricted in MHC class 2, it is necessary to use a class 2 restrictive T cell epitope to measure the reaction of T cell clones in response to the allergen. Japanese cedar-specific IL-4 and IL-5 producing memory T cell in the peripheral blood were examined by an ELISPOT assay using Japanese cedar pollen-specific peptides. Although the number of cedar peptide IL-4 and IL-5 T cells was low, all patients exhibited specific spots, ranging from 5 to 100 spots/10<sup>5</sup> PBMCs. The number of cedar pollen-specific Th2 cells did not correlate with the cedar pollen-specific serum IgE nor IgG4 levels. This may be related to the possibility that IgE and IgG4 synthesis is controlled by many other factors, including Th1 cells and memory B cells.

The size of the cedar pollen-specific Th2 cell clones was not different between the active and the placebo groups before the pollen season. Interestingly, these Cry j-specific Th2 clone sizes were increased about 1.7-fold during the cedar pollen season by pollen exposure in the placebo group. However, this increase was not observed in the active group and SLIT suppressed the increase in specific Th2 clone sizes. The change in the clone size did not correlate with the levels of allergen-specific IgG4 antibody.

Several recent studies have explored the significance of regulatory T cells in allergic and autoimmune disorders [34–37]. The suppression of allergen-specific Th2 clones observed in this study may be a reflection of such regulatory T cells, although the precise contribution of different T cell subsets remains to be examined.

In summary, this study has demonstrated that SLIT for Japanese cedar pollinosis was safe and is associated with increased cedar pollen-specific IgG4. Such therapy also inhibited the increase in specific Th2 lymphocyte clone sizes induced by the exposure to cedar pollen. It is also suggested that the use of SLIT appears to be an acceptable alternative to SCIT for Japanese cedar pollinosis.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare. The authors thank Prof. Pearay L. Ogra for helpful comments.

## References

- ▶ 1 Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N; Aria Workshop Group; World Health Organization: Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108: s147-s334.
- ▶ 2 Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998;351:1225-1232.
- ▶ 3 Okuda M: Epidemiology of Japanese cedar pollinosis throughout Japan. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;91:288-296.
- ▶ 4 Kaneko Y, Motohashi Y, Nakamura H, Endo T, Eboshida A: Increasing prevalence of Japanese cedar pollinosis: a meta-regression analysis. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136:365-371.
- ▶ 5 Ito Y, Takahashi Y, Fujita T, Fukuyama S: Clinical effects of immunotherapy on Japanese cedar pollinosis in the season of cedar and cypress pollination. *Auris Nasus Larynx* 1997;24:163-170.
- ▶ 6 Ito H, Nishimura J, Suzuki M, Mamiya S, Sato K, Takagi I, Baba S: Specific IgE to Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) in patients with nasal allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;74:299-303.
- ▶ 7 Katelaris CH, Burke TV, Byth K: Spatial variability in the pollen count in Sydney, Australia: can one sampling site accurately reflect the pollen count for a region? *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:131-136.
- ▶ 8 Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, Li H, Coffman R, Seyfert V, Eiden JJ, Broide D; Immune Tolerance Network Group: Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med* 2006;355:1445-1455.
- ▶ 9 Valovirta E, Jacobsen L, Ljorring C, Koivikko A, Savolainen J: Clinical efficacy and safety of sublingual immunotherapy with tree pollen extract in children. *Allergy* 2006;61: 1177-1183.
- ▶ 10 Dahl R, Kapp A, Colombo G, de Monchy JG, Rak S, Emminger W, Rivas MF, Ribell M, Durham SR: Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:434-440.
- ▶ 11 Varney VA, Gaga M, Frew AJ, Aber VR, Kay AB, Durham SR: Usefulness of immunotherapy in patients with severe summer hay fever uncontrolled by antiallergic drugs. *BMJ* 1991;302:265-269.
- ▶ 12 Walker SM, Varney VA, Gaga M, Jacobson MR, Durham SR: Grass pollen immunotherapy: efficacy and safety during a 4-year follow up study. *Allergy* 1995;50:405-413.
- ▶ 13 Dolz I, Martinez-Cocera C, Bartolome JM, Cimarra M: A double-blind placebo-controlled study of immunotherapy with grass-pollen extract Alutard SQ during a 3-year period with initial rush immunotherapy. *Allergy* 1996;51:489-500.
- ▶ 14 Okuda M: A long-term follow-up study after discontinuation of immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. *Arerugi* 2006;55:655-661.
- ▶ 15 Lockey RE, Nicoara-Kasti GL, Theodoropoulos DS, Bukantz SC: Systemic reactions and fatalities associated with allergen immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;87(suppl 1):47-55.
- ▶ 16 Cox LS, Linnemann DL, Nolte H, Weldon D, Finegold I, Nelson HS: Sublingual immunotherapy: a comprehensive review. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1021-1035.
- ▶ 17 Burastero SE: Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: an update. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;14:197-201.
- ▶ 18 Passalacqua G, Lombardi C, Guerra L, Compalati E, Fumagalli F, Canonica GW: Sublingual immunotherapy: no more doubts. *Allerg Immunol (Paris)* 2005;37:314-320.
- ▶ 19 Wilson DR, Lima MT, Durham SR: Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2005;60:4-12.
- ▶ 20 Bousquet J, Demoly P: Specific immunotherapy - an optimistic future. *Allergy* 2006; 61:1155-1158.
- ▶ 21 Larsen TH, Poulsen LK, Melac M, Combebias A, Andre C, Malling HJ: Safety and tolerability of grass pollen tablets in sublingual immunotherapy: a phase-1 study. *Allergy* 2006;61:1173-1176.
- ▶ 22 Hirahara K, Tatsuta T, Takatori T, Ohtsuki M, Kirinaka H, Kawaguchi J, Serizawa N, Taniguchi Y, Saito S, Sakaguchi M, Inouye S, Shiraishi A: Preclinical evaluation of an immunotherapeutic peptide comprising 7 T-cell determinants of Cry j 1 and Cry j 2, the major Japanese cedar pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:94-100.
- ▶ 23 Ohkubo K, Takizawa R, Gotoh M, Okuda M: Experience of specific immunotherapy with standardized Japanese cedar pollen extract. *Arerugi* 2001;50:520-527.
- ▶ 24 Yasueda H, Akiyama K, Maeda Y, Hayakawa T, Kaneko F, Hasegawa M, Shida T: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitation of rugi pollen and *Dermatophagoides* mite allergens and its application for standardization of allergen extracts. *Arerugi* 1991;40:1218-1225.
- ▶ 25 Wilson DR, Lima MT, Durham SR: Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2005;60:4-12.
- ▶ 26 Okuda M: Grading the severity of allergic rhinitis for treatment strategy and drug study purposes. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001;1:235-241.
- ▶ 27 Yasueda H, Yui Y, Shimizu T, Shida T: Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria Japonica*) pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1983;71:77-86.
- ▶ 28 Delaunay J, Sasajima H, Okamoto Y, Yokota M: Side-by-side comparison of automatic pollen counters for use in pollen information system. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 98:553-558.
- ▶ 29 La Rosa M, Ranno C, Andre C, Carat F, Tosca MA, Canonica GW: Double-blind placebo-controlled evaluation of sublingual-swallow immunotherapy with standardized parietaria judaica extract in children with allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:425-432.