

スギ花粉症に対する舌下免疫療法

— 臨床効果と誘導性制御性T細胞による免疫調整 —

湯田 厚司, 山中 恵一*, 大久保 公裕**

三重大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科

*三重大学大学院医学系研究科皮膚科, **日本医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

Sublingual Immunotherapy for Japanese Cedar Pollinosis

— Clinical Efficacy and Immunological Modification by Induced Regulatory T cells —

Atsushi Yuta, Kei-ichi Yamanaka*, Kimihiro Okubo**

Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu

*Department of Dermatology, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu

**Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Nippon Medical School, Tokyo

Cedar pollinosis in Japan is more prevalent than perennial allergic rhinitis from mite allergens. Allergen-specific subcutaneous immunotherapy (SCIT), while clinically effective, involves problems, such as pain during injections, frequent medical visits, and side effects such as anaphylaxis. Sublingual immunotherapy (SLIT) was developed over-seas and clinical trials for Japanese cedar pollinosis were begun in Japan in 2005.

While a 2008 study showed SLIT symptom scores to be better than those of drug therapy, it was not as satisfactory as SCIT. SLIT was, however, safe and reduced the need for medication.

The immunotherapy mechanism is still unclear and biomarkers have yet to be found in both SCIT and SLIT. We previously showed antigen-induced histamine release from peripheral basophils down-regulated by SCIT, and rates related to their symptoms, so, we studied histamine release in SLIT in a double-blind placebo-controlled study. Changes in peak season/pre season histamine release rates were significantly lower in SLIT compared with placebo.

Regulatory T cells modify immunological response in allergy, but natural regulatory T cells in peripheral blood were not changed by SLIT in our study. Regulatory T cell subtypes were identified recently. We focused on the induced type 1 regulatory T cell (Tr1), which was positive for CD4 and CD25 with negative foxp3 and produces high IL-10. Our samples showed the Tr1 percentage in whole CD4 positive T cells up regulated by SLIT. Cell proliferation of T cells stimulated by the Japanese cedar antigen was suppressed in SLIT and recovered by adding anti-IL-10 antibody or anti-IL-10 receptor antibody. We hope IL-10 from Tr1 may prove to be a key to the immunotherapy mechanism.

Key words : sublingual immunotherapy, regulatory T cell, Tr1, IL-10, histamine release test

舌下免疫療法, 制御性T細胞, Tr1, インターロイキン10, ヒスタミン遊離試験

(2009年12月14日受稿, 2010年2月12日受理)

連絡先, 別冊請求先: 湯田 厚司 〒514-8507 三重県津市江戸橋2-174 三重大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科 TEL: 059-232-1111 (内線6441) FAX: 059-231-5218 E-mail: yuta-a@clin.medic.mie-u.ac.jp

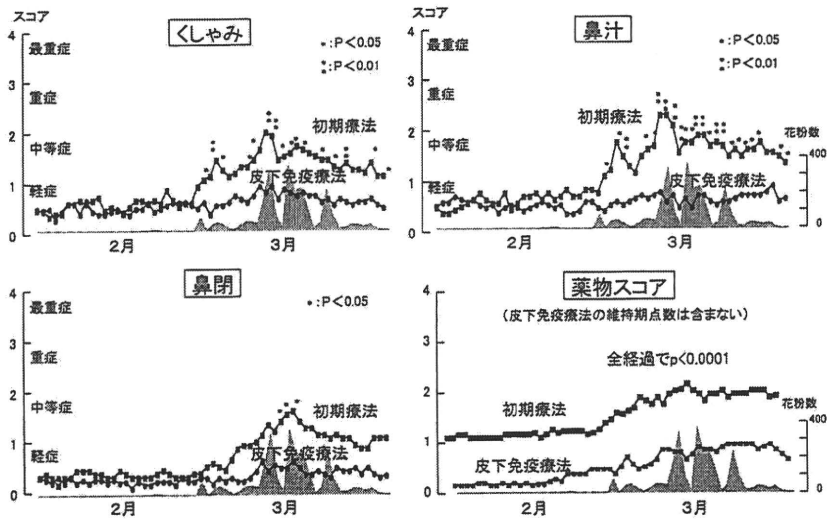


図1 スギ花粉症に対する皮下免疫療法の臨床症状スコアと薬物スコア
スコア判定は鼻アレルギー診療ガイドライン²⁾による。皮下免疫療法の維持期の薬物スコアは便宜的に加えていない。

スギ花粉症の有病率は増加の一途にあり、今や国民の25%以上が有病しているとされる¹⁾。鼻アレルギー診療ガイドライン²⁾に示されるように、初期療法を行うことや重症度と病型に応じた適切な投薬治療を行うことによりスギ花粉飛散期の症状緩和が可能となっている。しかし、抗ヒスタミン薬などの薬物療法は症状を緩和できるものの、アレルギー病態に根治性を期待できない。免疫療法は現状で最も効果の高い治療であるとともに、一部の症例では根治も可能であり、世界保健機構 (WHO) でもアレルギー性鼻炎に推奨される治療である³⁾。

我々はこれまでに従来の皮下注射による免疫療法 (以下、皮下免疫療法) の高い有効性を報告し⁴⁾、併用薬剤が少なくすむ治療⁵⁾として推奨してきた。しかし、皮下免疫療法の効果が高い反面で、問題点も有している。注射法であるため痛みを伴い、治療初期には頻回の通院が必要である。何よりもアナフィラキシーを含む副反応が大きな問題であり、これらの問題点から効果的な治療法とはいえ、一部の施設で行われているに過ぎない。侵襲が少なく、利便性が高く、且つ安全な方法が求められ、一つの方法として舌下免疫療法が発展してきた。舌下免疫療法は、舌下に薬液を投与するだけで痛みが無く、在宅投与が可能であるため通院回数も少ない。安全性の面では、誤投与や特殊なケースによる副反応例の報告^{6,7)}があるものの、生命を脅かす副反応例はなく、安全性が高いとされる⁸⁾。

本邦でのスギ花粉症に対する舌下免疫療法は、Gotoh と Okubo ら⁹⁾ が初めて報告して以来、限られた施設で試験的に検討されている。我々も2005年より治療を開始

し¹⁰⁾、独自の検討を加えてきた。そこで、これまでの我々の成績を中心に、スギ花粉症に対する舌下免疫療法の臨床効果と基礎的検討をまとめた。

1. 皮下免疫療法 (従来法) の臨床成績

皮下免疫療法は保険適応があり、多くの施設で行われている。スギ花粉症の皮下注射治療液は1969年に発売され、歴史の長い効果的な治療法である。2000年にアレルギー量が標準化された皮下注射治療液が発売され、安全性と効果が高まった。

スギ花粉の中等度飛散年 (2,691個/cm²; ダーラム法) であった2008年に鼻アレルギー診療ガイドライン²⁾ に準じた症状日記で検討した皮下免疫療法 (23例, 平均治療期間4.1±2.7年) の臨床成績は、薬物療法に比較して鼻症状で有意に高い効果があり、花粉飛散ピーク時にも良好な効果を保っていた (図1)。併用薬物のスコアも低く (図1)、皮下免疫療法単独でも良好な結果を得られる例も多い。

スギ花粉症症状は花粉飛散数に大きく影響される。地域や観察年により花粉飛散数が大きく異なるため、これまでの諸施設の報告を単純に比較しにくい。どの年においても治療効果は高いと思われる。我々が過去に行った花粉飛散数による皮下免疫療法 (3年以上治療例) と初期療法の無記名アンケート法による比較調査では、皮下免疫療法は大量飛散年でも効果が維持されるのに対して、初期療法では飛散数の増加と共に症状が悪化しやすい。花粉飛散数が多くなるほど皮下免疫療法が初期療法よりも効果が高くなった¹¹⁾。皮下免疫療法では大量

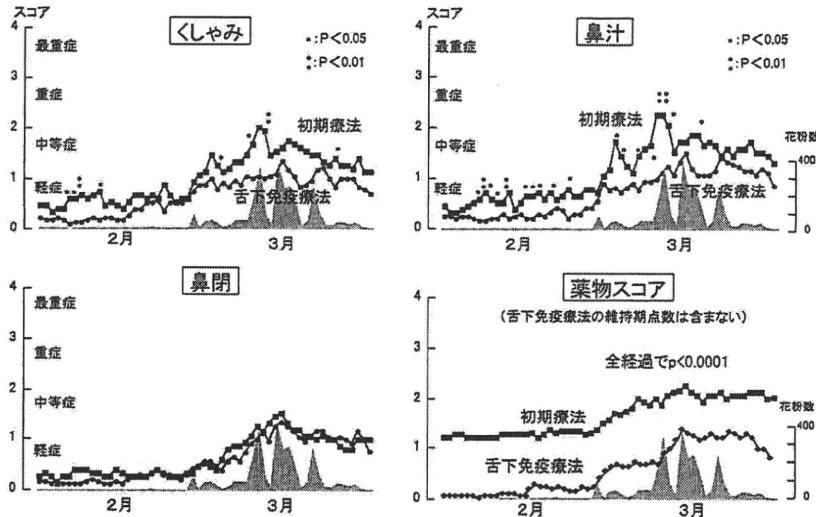


図2 スギ花粉症に対する舌下免疫療法の臨床症状スコアと薬物スコア
スコア判定は鼻アレルギー診療ガイドライン²⁾による。

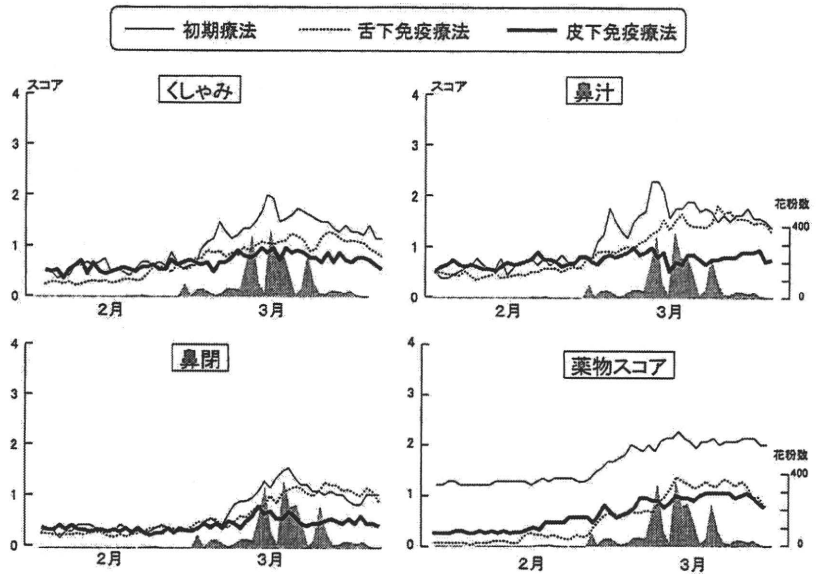


図3 皮下免疫療法, 舌下免疫療法, 初期療法の比較

飛散年でも併用する抗ヒスタミン薬などの処方量が少ないため、飛散が多くなるほど医療経済上に有益であった⁹⁾。

2. 舌下免疫療法の臨床効果

3年間の継続治療を行った舌下免疫療法患者23例の臨床効果について、皮下免疫療法と同じ2008年の中等度飛散年に検討した結果を図2に示した。くしゃみ、鼻汁、鼻閉は、花粉飛散とともに出現するものの、初期療法に比べると良好であったが、皮下免疫療法に認められた大きな効果(図3)はなかった。この結果から舌下免疫療法はスギ花粉症に有用であるが、過度の期待は禁物である。しかし、薬物スコア(図2)をみると初期療法よ

りも有意に良好で、皮下免疫療法と同等に良かった(図3)。我々は、舌下免疫療法の位置づけとして、少ない薬物併用で症状を緩和できる治療であり、舌下免疫療法のみで必ずしもスギ花粉症をコントロールできるものではないとしている。舌下免疫療法は利便性が良く、安全に行えるため、薬物併用でより快適なスギ花粉飛散期を過ごせれば治療価値が高くなると考えられる。

舌下免疫療法の効果もスギ花粉飛散により大きく影響を受ける。舌下免疫療法は治療効果の面で皮下免疫ほど強い治療ではないと考えられ、大量飛散年には効果が減弱する。2009年のスギ花粉大量飛散年(11,941個/cm²)には中等度飛散年に比べて初期療法と舌下免疫療法の効果の差が縮まっており、有意なポイントは大きく減少

していた。

3. 免疫療法の誘導性制御性T細胞を介する作用機序

Noon¹³⁾が枯草熱(hay fever)に対して1911年に初めて免疫療法を行ってから100年を迎える。これまでに免疫療法の機序に関してさまざまな検討がおこなわれているが、いまだ皮下および舌下免疫療法の機序が完全に解明されていない。遮断抗体であるIgG4の関与が以前より考えられているが、IgG4の変化と臨床症状の変化が一致しないことも多く、その関与は確立されていない。また、免疫療法によりTリンパ球におけるTh1細胞とTh2細胞の比率がTh1細胞優位にシフトをすることを考えられてきたが¹³⁾、決定的な根拠に乏しい。最近では、Th1細胞とTh2細胞の両方に免疫制御をかける制御性T細胞の役割が機序解明の鍵となってきた。我々は、制御性T細胞のなかでもIL-10を産生する誘導性制御性T細胞に着目し、検討を行ってきた。

舌下免疫療法を行った患者で制御性T細胞(natural regulatory T cell; n-Treg)について検討した。健常人、未治療スギ花粉症、舌下免疫療法の末梢血をスギ花粉飛散期にヘパリン採血し、フィコール・コンレイ比重遠心法で細胞分離した。マーカーをもちいてflow-cytometry (FACS)を行い、fork head p3(Foxp3)陽性CD4陽性CD25強陽性を示す制御性T細胞がCD4陽性T細胞に占める割合を検討した。制御性T細胞の割合は、健常人、未治療スギ花粉症、舌下免疫療法施行例の3群で差がなかった(図4)¹⁴⁾。アトピー性皮膚炎例では制御性T細胞(n-Treg)の比率が減少している報告¹⁵⁾があるが、未治療スギ花粉症でも舌下免疫療法でも変化が認められず、舌下免疫療法における制御性T細胞の関与は否定的であった。

近年、制御性T細胞に加えて、何らかの外的因子によって誘導される誘導性制御性T細胞(induced regulatory T cell; i-Treg)が分類された(表1)。誘導性制御性T

細胞はさらにtype 1 regulatory T cell (Tr1)とTh3に分類される。Tr1は、fox p3陰性で、IL-10を強く産生することが特徴であり、Tr1がTGF-βによりTh3に分化する¹⁶⁾。Th3はfox p3陽性で、TGF-βを産生する。免疫療法においては、免疫寛容にIL-10が大きく関与することが考えられる。そこで、舌下免疫療法におけるIL-10を強く産生する誘導性制御性T細胞(Tr1)を検討した。健常人、未治療スギ花粉症、舌下免疫療法からスギ花粉飛散期に末梢血をヘパリン採血し、フィコール・コンレイ比重遠心法で細胞分離し、細胞培養した。可溶性抗CD3抗体と抗CD4抗体、または、Cry j1とCry j2を添加して12時間培養し、Tr1がCD4陽性T細胞に占める割合をFACSで測定した。その結果、未治療スギ花粉症ではCry j1とCry j2刺激で誘導されるTr1比率が健常人よりも低下しており、舌下免疫療法を行うことで回復していた(図5)¹⁴⁾。舌下免疫療法によりスギ花粉抗原刺激で誘導できるTr1が増加していることが示唆された。また、CD3とCD28刺激でも舌下免疫療法例でTr1比率が増加していた(図5)¹⁴⁾。CD3とCD28刺激は抗原特異的でないため、この結果からスギ花粉を含む多

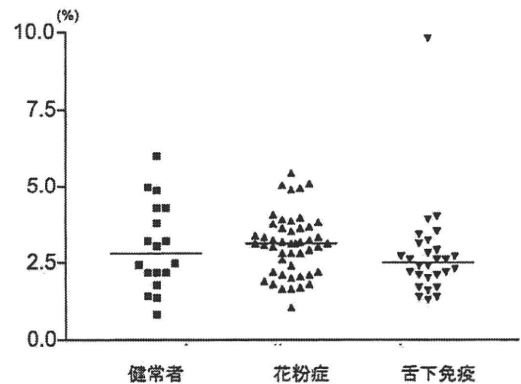


図4 制御性Tリンパ球(n-Treg)のCD4陽性Tリンパ球に占める割合3群間で有意差はない(文献14)。

表1 制御性T細胞の分類と特徴

	自然型制御性T細胞 (Natural Treg)	誘導性制御性T細胞 (Induced Treg)	
	n-Treg	Tr1	Th3
マーカー	CD4 ⁺ CD25 ^{int-hi} , CD127 ^{lo-dim}	CD4 ⁺ CD25 ^{low-variable} , CD45RB ^{low} , Fox p3 ⁻	CD4 ⁺ CD25 ^{low-variable} , CD45RB ^{low} , Fox p3 ⁺
標的細胞	抗原提示細胞T細胞	T細胞	詳細不明
役割	T細胞の抑制	粘膜免疫, 炎症反応	粘膜免疫, 炎症反応
産生物質	IL-2	IL-10, ビタミンD	TGF-β

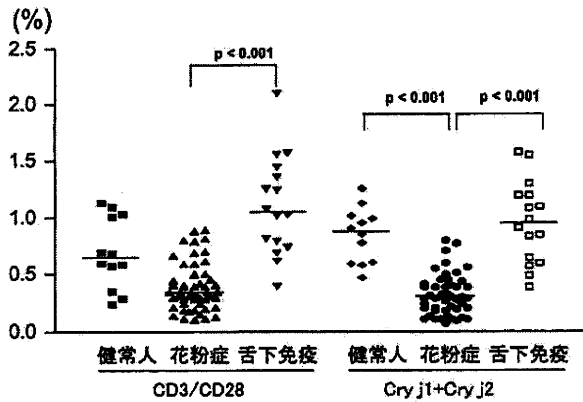


図5 IL-10産生性誘導型制御性Tリンパ球 (type 1 regulatory T cell: Tr1) のCD4陽性Tリンパ球に占める割合CD3/CD28またはCry j1+Cry j2刺激で誘導されるTr1は健康人に比して未治療アレルギー性鼻炎(鼻アレルギー)で低下するが、舌下免疫により増加する(文献14)。

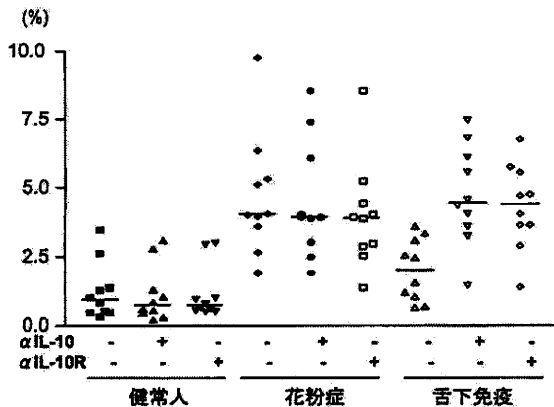


図6 舌下免疫で低下していた細胞増殖能力(スギ花粉抗原刺激)は、IL-10抗体または抗IL-10受容体抗体により中和され、IL-10が細胞増殖能力にかかわることを示した(文献14)。

抗原に感作された例にスギ抗原で免疫療法を行った場合に、スギ花粉症以外のアレルギー性鼻炎にも効果が出る可能性が示唆された。また、Cry j1とCry j2添加して培養したCD4陽性T細胞に抗IL-10抗体または抗IL-10受容体抗体を加えて細胞増殖能力測定(proliferation)試験を行うと、舌下免疫療法で抑制されていたT細胞分化能が復元しており、IL-10が細胞増殖能力にかかわることが示された(図6)¹⁴⁾。TGF- β についても検討したが、TGF- β がラベルされる制御性T細胞に3群での差がなかった。以上の結果から、舌下免疫療法にIL-10およびその大きな産生細胞であるTr1の関わりが強く示唆され、舌下免疫療法の作用機序にかかわる可能性が考えられた。

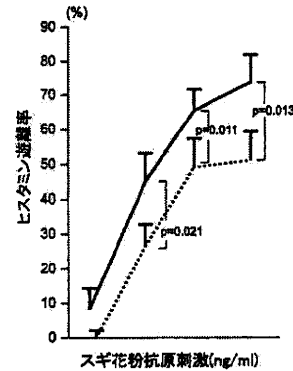


図7 ヒスタミン遊離
皮下免疫療法により抗原刺激によるヒスタミン遊離は治療開始前(実線)から治療開始6ヵ月後(点線)へと有意に抑制された(文献18)。

4. ヒスタミン遊離試験による免疫療法のモニタリング

免疫療法のもう一つの大きな課題として効果を客観的に証明できるモニタリング検査があげられる。本邦では、古くから免疫療法を減感作療法と呼んでおり、免疫療法を行っても感作が減るわけではないが、今でも減感作療法の名称を用いていることが多い。CAP-RASTのような血清スギ特異的IgEをモニタリングしても免疫療法で大きく減少しない。末梢血単核球を培養し、抗原刺激で産生されるサイトカインを測定すると、免疫療法で効果のある例でIL-5が減少すると報告¹⁷⁾されているが、非常に手間のかかる検査法である。より簡便に行え、可能ならば保険診療で行える検査法があれば、利用価値が高い。

我々は、治療効果をみるモニタリングとして末梢血好塩基球のヒスタミン遊離試験を検討してきた。ヒスタミン遊離試験はアレルギー性鼻炎に保険適応をとっている。現在市販されているヒスタミン遊離試験(HRTシオノギ)は、抗白血球抗体で吸着した好塩基球に抗原を添加し、RIA法でヒスタミン遊離率を測定する。スギ花粉症患者11例で皮下免疫療法の治療開始前と治療開始6ヵ月後(維持期でスギ花粉飛散前)にヒスタミン遊離試験を行った結果、全例で開始6ヵ月後にヒスタミン遊離率が抑制され、全例の平均は図7に示すように有意に抑制された¹⁸⁾。この抑制は、スギ花粉飛散期に再上昇する場合もあるが、2年間の追跡調査を行うと、効果の高い例ほど抑制が持続し、遊離率が20%以下を維持できる例で極めて臨床症状がよくなっていた(図8)。皮下免疫療法は1年目より2年目で効果が高くなるため、2年間の追跡調査が勧められるが、ヒスタミン遊離試験はモニ

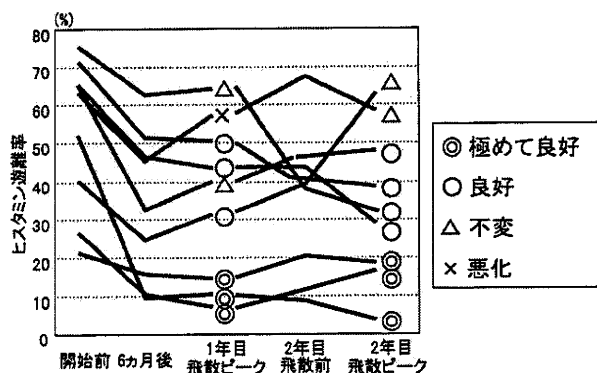


図8 ヒスタミン遊離率の変化と臨床症状
皮下免疫療法患者のヒスタミン遊離率の変化を2年間追跡した。2年目の花粉飛散期のヒスタミン遊離率は自覚症状の評価と良く相関する。

タリリングとして有用な方法とも考えられる。舌下免疫療法でも二重盲検試験でプラセボと実薬で治療開始前と花粉飛散ピーク時に検討した。舌下免疫療法では、スギ花粉飛散期のヒスタミン遊離率は治療開始前に比べて微増するが、大きな変化はなく、プラセボではヒスタミン遊離率は花粉飛散期で大きくなり、実薬と比較して有意に高かった(未公表データ)。しかし、治療開始前と維持期(スギ花粉飛散前)でプラセボと実薬に有意差がなく、今後の検討が必要であった。

まとめ

スギ花粉症の舌下免疫療法はまだ課題も多いが、利便性と効果を考えると引き続き実用化に向けての検討が望まれる。臨床研究による効果の検討だけでなく、作用機序やモニタリングの解析もすすめば、発展した方法論につながると考えられ、この後の研究を継続したい。

本内容は、第48回日本鼻科学会 internal session I: panel discussion on immunotherapy (2009年10月3日, 松江市)で口演した。本研究は厚生労働省科学研究費(大久保班) および文部科学省科学研究費の助成をうけた。

参考文献

- 1) 馬場廣太郎, 中江公裕: 鼻アレルギーの全国疫学調査2008 (1998年との比較) —耳鼻咽喉科医およびその家族を対象として—. Prog Med 2008; 28: 2001-12.
- 2) 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会: 鼻アレルギー診療ガイドライン—通年性鼻炎と花粉症—. 改訂第5版 ライフサイエンスメディカ, 東京, 2009, 34-62頁.

- 3) Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, et al: Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. J Allergy Clin Immunol 1998; 102: 558-62.
- 4) 湯田厚司: スギ花粉症に対する舌下免疫療法の現状と課題 口咽科 2009; 22: 35-8.
- 5) 湯田厚司, 宮本由起子, 服部玲子, 他: スギ花粉症に対する抗原特異的免疫療法の花散飛散総数による医療経済効果—医療費による直接経費からの検討—. アレルギー 2007; 56: 1366-71.
- 6) Blazowski L: Anaphylactic shock because of sublingual immunotherapy overdose during third year of maintenance dose. Allergy 2008; 63: 374-5.
- 7) Pajno GB: Sublingual immunotherapy: the optimism and the issues. J Allergy Clin Immunol 2007; 119: 796-801.
- 8) Cox LS, Larenas Linnemann D, et al: Sublingual immunotherapy: a comprehensive review. J Allergy Clin Immunol 2006; 117: 1021-35.
- 9) Gotoh M, Okubo K: Sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. Allergol Intenational 2005; 54: 167-71.
- 10) 湯田厚司, 服部玲子, 間島雄一: スギ花粉症に対する舌下免疫療法の治療効果. 耳鼻免疫アレルギー 2007; 25: 124-5.
- 11) 湯田厚司, 服部玲子, 坂井田 寛, 他: スギ花粉症に対する免疫療法のアキ科花粉症への効果. 日鼻誌 2007; 46: 109-13.
- 12) Noon L: Prophylactic inoculation against hayfever. Lancet 1911; 1: 1572-3.
- 13) El-Naggar MM, Ukai K, Takeuchi K, et al: Effect of allergen-specific immunotherapy on interleukin-4, interleukin-5 and interferon-gamma mRNA expression in the nasal mucosa of rats with allergic rhinitis. Scand J Immunol 1998; 48: 629-34.
- 14) Yamanaka K, Yuta A, Kakeda M, et al: Induction of IL-10-producing regulatory T cells with TCR diversity by epitope-specific immunotherapy in pollinosis. J Allergy Clin Immunol. 2009; 124: 842-5.
- 15) Orihara K, Narita M, Tobe T, et al: Circulating Foxp3⁺CD4⁺ cell numbers in atopic patients and healthy control subjects. J Allergy Clin Immunol 2007; 120: 960-2.
- 16) Akdis M, Akdis C: Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 2007;

- 119: 780-9.
- 17) Hayashi M, Ohashi Y, Tanaka A, et al: Suppression of seasonal increase in serum interleukin-5 is linked to the clinical efficacy of immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol Suppl* 1998; 538: 133-42.
- 18) 湯田厚司, 西村真治, 坂倉康夫, 他: スギ花粉症免疫療法での HRT シオノギキットによる好塩基球ヒスタミン遊離率の変化. *アレルギー* 2002; 51: 634-8.

スギ花粉症に対する免疫療法の治療成績

荻原 仁美・湯田 厚司・宮本由起子
 臼井 智子*・竹内 万彦

The Efficacy of Allergen-specific Subcutaneous Immunotherapy for Japanese Cedar Pollinosis

Hitomi Ogihara, Atsushi Yuta, Yukiko Miyamoto and Kazuhiko Takeuchi

(Mie University Graduate School of Medicine)

Satoko Usui

(National Mie-Hospital)

Background: We studied the efficacy of allergen-specific subcutaneous immunotherapy (SCIT) for Japanese cedar pollinosis.

Methods: Twenty-three patients treated with SCIT (eleven male and twelve female, mean ages of 40.6 years old) and fifteen patients with initial drug therapy (eight male and seven female, mean ages of 57.6 years old) were selected for this study. The clinical symptom score (0-4 points/day) and medication score during the periods of Japanese cedar pollen scattering, calculated from the patients' diaries as advised by the practical guideline, for the management of allergic rhinitis in Japan (2005), were compared in both groups of subjects. The influence of the treatment years of SCIT was also studied, by comparing the two groups of subjects who had experienced the first or more than second pollen season after receiving SCIT.

Results: SCIT showed significantly better results than initial drug therapy in comparison with the symptom, and medication score, during the pollen season. Continuous SCIT is therefore recommended over a period of several years to reduce the symptom in affected patients.

Conclusion: We presented the effectiveness of continuous SCIT over several years for the control of Japanese cedar pollinosis.

Key words : immunotherapy, Japanese cedar pollinosis, initial drug therapy

はじめに

本邦特有の疾患であるスギ花粉症は急増しており¹⁾,長い花粉飛散期間が社会的問題となる。この10年の間にアレルギー性鼻炎の新規治療薬が相次いで発売され,花粉飛散開始時期にあわせて治療する初期療法も浸透したことにより,治療効果も向上した。しかし,これらの薬物治療は症状を緩和する治療であり,根治治療ではない。

一方,免疫療法はスギ花粉症に対して唯一根治の可能性をもった治療方法で,これまでも高い有効性を示す報告がでている²⁾³⁾。しかし,免疫療法と薬物療法を比較した報告は少なく,とくに最近になり良好な効果が報告されている初期療法と比べてどれくらいの効果があるかの検討はない。また,スギ花粉症の治療効果は,調査年のスギ花粉飛散数に左右されるので,極端に飛散が多い年

三重大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科

* 国立病院機構三重病院耳鼻咽喉科

や少ない年の比較でなく、スギ花粉の中等度飛散年での比較が望ましい。そこで、今回われわれはスギ花粉が中等度飛散した2008年の免疫療法の治療効果を検討する目的で、初期療法を対照として自覚症状および症状薬物スコアを比較検討した。

免疫療法はスギ花粉の飛散する数ヵ月以上前より開始し、スギ花粉飛散期にはアレルゲンが維持量に達するよう行うことが勧められている。長期間の継続治療の必要な免疫療法は初年度からも効果を認める⁴⁾が、経年的な効果の増強については明確でない。スギ花粉飛散総数が年ごとに大きく異なるため、個人の症状を異なる年で比較することはできない。そこで、今回の検討では、免疫療法開始1年目群と2年目以上継続群の比較を加え、免疫療法継続の効果を検討した。

対象と方法

当科で2008年に中等症以上のスギ花粉症に対して皮下注射法による免疫療法を継続している23例を対象とした。2008年のスギ花粉飛散開始前から抗ヒスタミン薬を中心に薬物療法を施行した初期療法15例を比較対照とした。両群の背景を表1に示した。免疫療法の23例には、2年目以上継続例18例(平均治療歴 5.3 ± 2.2 年)と1年目5例が含まれていた。1年目の5例はすべて月1回注射の維持期に達してスギ花粉飛散期を迎えた。

免疫療法の方法は、標準化アレルゲン治療エキス「トリイ」スギ花粉を用いて、皮内反応閾値あるいは1/10の濃度を初回投与濃度とし、週1回の50%増量法でアレルゲン濃度を増量した。1回投与量は0.02 mlから開始し、0.2 mlにいたった段階で10倍濃い濃度の0.02 mlへ移行した。目標最大維持量は2000 JAU/mlを0.2 ml(400 JAU)とし、注射後の局所反応により維持量を決定した。維持量に達した後は2週間ごとの投与を4回行い、その後は1ヵ月ごとの投与とした。スギ花粉飛散期も維持量で月1

表1 患者背景. 両群の性, 年齢, RAST値に有意差はなかった(χ^2 乗検定).

	免疫療法群	初期療法群
症例数	23	15
性別 男/女	11/12	8/7
年齢(歳)	40.6 \pm 20.9	57.6 \pm 13.7
免疫療法治療期間	4.1 \pm 2.7	
スギ特異的IgE抗体	32.6 \pm 35.3	44.4 \pm 41.7
CAP-RASTスコア	3.6 \pm 1.5	4.1 \pm 1.5

回の皮下注射を継続した。花粉飛散期の有症時には、投薬治療を追加した。基本的には、抗ヒスタミン薬の投与より開始し、点鼻ステロイドを追加した。眼症状には同様に抗ヒスタミン点眼薬から開始し、無効例で点眼ステロイドを追加した。症状の継続する場合には頓服でなく薬剤を継続して使用することとした。

対照の初期療法例は、例年のスギ花粉飛散開始日に基づいて2月初旬より投薬を開始した。花粉飛散期に症状が制御できない場合には点鼻ステロイドを追加することを基本とした。点眼薬の投与は免疫療法と同じ方針とした。

スギ花粉飛散期にあたる2月と3月の鼻症状および薬物服用状況を患者自身が日記に記載した。鼻アレルギー診療ガイドライン⁵⁾(2005年)に準じて症状日記をスコア化(0~4点)し(表2, 3), (1)くしゃみ, 鼻汁, 鼻閉, 眼症状の症状スコア, (2)くしゃみ, 鼻汁, 鼻閉の鼻スコアを合計した総鼻症状スコア, (3)薬物スコア, (4)鼻症状の症状スコアの最大値と薬物スコアを合計した症状薬物スコアを算出した。免疫療法維持期の薬物スコアを1点とした。

2008年スギ花粉飛散総数は2,691個/cm²で中等度飛散であった。スギ花粉飛散開始日は2月21日、3月末

表2 鼻アレルギー診療ガイドライン(2005年)の症状スコア

種類	程度	++++	+++	++	+	-
くしゃみ発作		21回以上	20~11回	10~6回	5~1回	0
鼻汁		21回以上	20~11回	10~6回	5~1回	0
鼻閉		一日中完全にまっている	鼻閉が非常に強く、口呼吸が一日のうちかなりの時間あり	鼻閉が強く、口呼吸が一日のうちときどきあり	口呼吸はまったくないが鼻閉あり	なし

表3 鼻アレルギー診療ガイドライン (2005年) の薬物スコア

第1, 第2世代抗ヒスタミン薬, 遊離抑制薬	1点
鼻噴霧用ステロイド薬	2点
点鼻用血管収縮薬	1点
点眼用遊離抑制薬	1点
点眼用ステロイド剤	2点
経口ステロイド抗ヒスタミン薬合剤	3点
特異的免疫療法 (維持期)	1点

には飛散が終了した。飛散開始日が例年よりも1週間以上遅れたため、結果的に初期療法群の薬剤服用は花粉飛散開始日の約2週間前からとなった。ヒノキ科花粉は、調査期間の終盤の数日に数個観測されていた。スギ花粉飛散期間を考慮して2月4日から3月31日までを検討期間とし、免疫療法群と初期療法群を比較した。また免疫療法群の中で治療開始後1年目(5例)と2年目以降(18例)を比較した。

群間の有意差検定にはMann-Whitney U testを用い、危険度0.05未満を有意差ありとした。

結 果

1) 免疫療法と初期療法の比較

2008年2月4日から3月31日までのそれぞれの群における、症状スコア、総鼻症状スコア、薬物スコア、症状薬物スコアの平均を図1に示した。スギ花粉飛散期のすべての症状スコアは免疫療法群で有意に良好であった。スギ花粉飛散ピーク期における各症状スコア平均の最大値(免疫療法vs初期療法の順で示す)は、くしゃみ1.0vs2.0, 鼻汁1.0vs2.3, 鼻閉0.8vs1.5, 目の痒み1.0vs1.8であった。初期療法では花粉飛散とともに症状が出現しやすいのに比べ、免疫療法では花粉飛散ピーク時でも症状の悪化が少なかった。薬物スコアはスギ花粉飛散ピーク時には免疫療法群のスコアが低いが、全期間を通じて両群間に有意差はなかった。この理由として、免疫療法の維持期に全期間で1点が加えられているためであり、免疫療法により経口薬、点鼻薬、点眼薬の使用量を1点程度少なくできたことを意味する。総鼻症状スコアと症状薬物スコアは免疫療法が有意に良好であった。総鼻症状スコアの最大値は免疫療法群が2.7に対し、初期療法群では5.5であった。症状薬物スコアの最大値はそれぞれ4.2, および4.7であった。

2) 免疫療法治療期間の1年目と2年目以上での比較

免疫療法群のうち、開始1年目5例と2年以上継続例18例に分けて検討した結果を図2に示す。図2に挙げたすべてのスコアで1年目例は2年以上継続例よりも低いスコアで推移していた。とくに、花粉飛散期における鼻汁、鼻閉、目の痒みの症状スコアは2年以上継続例で有意に良好であった。薬物スコアも花粉飛散期で有意に2年以上継続例のスコアが低かったが、花粉飛散前においても有意に低かった。これは、免疫療法1年目例のなかで前年まで初期療法をうけていた例があり、早期から内服薬を使用していたことによるものと考えられる。免疫療法1年目例は薬物スコアが高いのに症状スコアも高いという結果であり、それを反映して症状薬物スコアは全期間において有意差がみられる日があった。

考 察

1998年と2008年に同じ手法で行われた疫学調査によると、スギ花粉症の有病率はこの10年間で16.2%から26.5%にまで増加している¹⁾。スギ花粉症の自然史をみると、高齢者での自然寛解は5%程度にあるとされる⁶⁾が、ほとんどの例では毎年のように鼻や眼の症状を呈している。スギ花粉の飛散期間は長く、ヒノキ科花粉の飛散期を含めると数ヶ月に及ぶ。海外の花粉症は数週間のものが多く、このような長期間の花粉症は本邦におけるスギ花粉症のみである。このような背景から、スギ花粉症の有用な治療が求められる。スギ花粉症治療の中で免疫療法は有効性が高く、一部の症例ではあるが根治できる唯一の方法である。スギ花粉の免疫療法は、標準化されていない治療エキスの発売された1969年に始まり、これまでも多くの治療効果が報告されている。2000年に本邦で初めて標準化されたスギ抗原エキスの発売され、効果もさらに安定してきていると思われる。標準化後のスギ抗原エキスの治療効果の報告は少なく、とくに最近有用性が報告されている初期療法との比較はない。そこで、今回両群の比較を行うこととした。

今回の結果から、2008年のスギ花粉中等度飛散年の検討では免疫療法が初期療法よりも明らかに有効で、花粉飛散ピーク時にも症状の悪化が少なかった。とくに、くしゃみと鼻汁に効果が高く、即時型反応を抑える効果が強いと推測される。鼻症状のみでなく眼の痒みにも有効であり、リンパ球を介した全身の免疫反応に関与していると考えられるが、免疫療法の作用機序に関しては完全

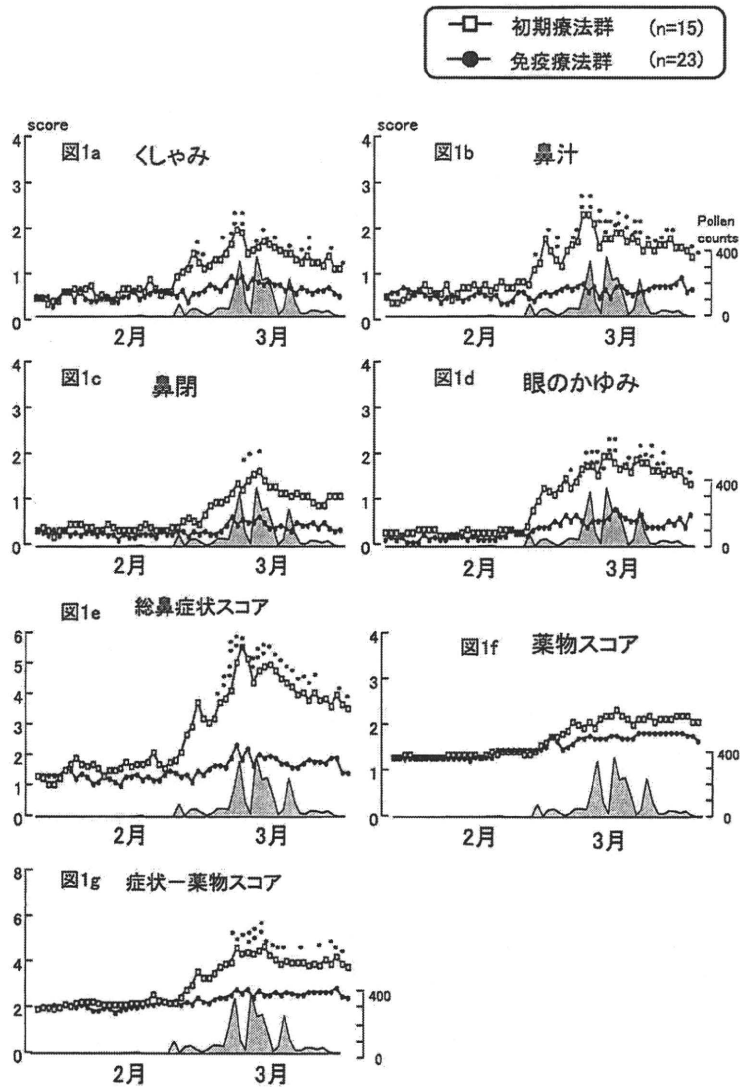


図1 免疫療法群と初期療法群の症状スコア, 薬物スコア, および症状薬物スコアの比較

●は免疫療法群, □は初期療法群のスコアを表す. 日々のスギ花粉飛散数をベースラインに示す. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test による)

に解明されておらず, 今後の検討課題とされている. 薬物スコアで両群に差はなかったが, これは免疫療法にスコア1点が付けられていることによる. すなわち, 免疫療法例の服薬量のみを考えれば, 平均でスコア1点分少ないということであり, 服薬を少なくしたい例には利点があると考えられる. われわれは, 免疫療法の位置づけとして, 服薬量を少なくしかつ症状を軽減しうる, 一部で根治可能な治療と考えている. われわれの過去のスギ花粉飛散数の違いによる服薬量の検討⁷⁾では, 免疫療法を行うと中等度飛散年には初期療法よりも薬剤処方が少

なく, 大量飛散になるとさらに大きな差が認められ, スギ花粉飛散数が増える程薬剤使用量において利点が高いことを報告した. また, その結果として直接医療費の軽減に役立つことを示した.

われわれは経験的な印象として免疫療法開始直後よりも数年後のほうで効果が高いと考えており, 今回免疫療法開始1年目例と2年目以上例を比較した. 1年目の例数が少ないが, 有意に2年目以上例で効果が高かった. 免疫療法が開始後どれくらいの治療期間でもっとも効果が高くなるかは, わかっていない. 免疫療法の免疫能の経

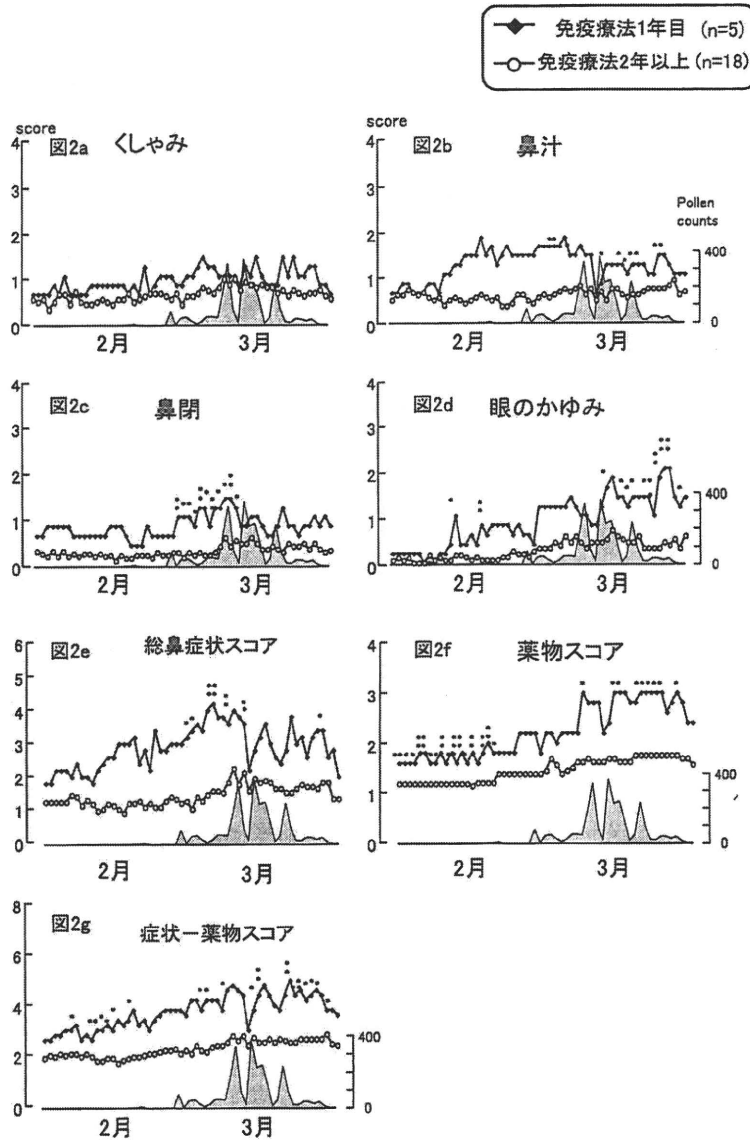


図2 免疫療法1年目群と2年以上継続群の症状スコア、薬物スコア、および症状薬物スコアの比較

◆は免疫療法1年目、○は2年以上継続群のスコアを表す。また日々のスギ花粉飛散数をベースラインに示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test による)

時的变化をみた検討⁹⁾では、血清抗原特異的IgEは開始後1週間で増加し、その後6ヵ月頃に減少すると報告され、IgG4は1週後より増加するとされる。その結果からみると、全身の免疫反応は早期から変化しているはずであるが、免疫療法を行っても血清抗原特異的IgE値が大きく減少したり、陰性化することは少ない。また、IgEレベルでの変化があるとしても、リンパ球レベルでの反応は定かではない。さらに、スギ花粉は通年性に飛散し

ないため、臨床経過の月単位での検討は不可能で、年単位での比較検討となってしまう。免疫療法の治療期間を検討した結果では、アレルギー性鼻炎に免疫療法を3年以上行えば、長期にわたり効果が持続するとされる⁹⁾¹⁰⁾。言い換えれば、数年治療をすれば効果が安定するということであり、2年目と3年目の比較を行ったとしても差は少ないと予想される。そこで、限られた症例での検討であったため1年目と2年目以上で群分けして比較した。

われわれはWHO ポジションペーパー¹¹⁾に準じて5年間の治療継続を勧めているが、実際には効果が著効しているので患者自身が5年以上たっても治療の継続を希望している例もある。2000年に標準化治療エキスが新しく発売されたときに治療を開始した例のうち2例が8年を経過している。免疫療法を終了して長期の経過で再度悪化することがないかという懸念のために継続しているのであるが、治療終了後の経過で再度悪化の場合にもう一度免疫療法を行う意義があるかの検討はなく、今後の検討課題とも考えている。2000年に旧非標準化液で治療していた患者の治療をすべて終了したが、これらの例の追跡調査ができればと願っている。

まとめ

スギ花粉症に対する皮下注射による免疫療法の有効性が示された。

とくに、花粉飛散期における自覚症状、症状薬物スコアは初期療法より有意に良好であった。

また免疫療法2年以上継続例では開始1年目に比べ有意に効果がみられた。

本研究は、文部科学省科学研究費および厚生労働省科学研究費の助成を受けている。

本研究内容は第71回耳鼻咽喉科臨床学会(平成21年7月3日、旭川市)で発表した。

参考文献

- 1) 馬場廣太郎, 中江公裕: 鼻アレルギーの全国疫学調査 2008 (1998年との比較) - 耳鼻咽喉科医およびその家族を対象として-. *Prog Med* 28: 2001~2012, 2008.

- 2) 鶴飼幸太郎, 雨皿 亮, 増田佐和子, 他: 鼻アレルギー減感作療法の治療成績とその客観的評価(第2編) スギ花粉症. *アレルギー* 43: 101~105, 1994.
- 3) 湯田厚司: スギ花粉症の免疫療法. *アレルギーの臨* 28: 51~57, 2008.
- 4) Giovannini M, Braccioni F, Sella G, et al.: Comparison of allergen immunotherapy and drug treatment in seasonal rhinoconjunctivitis: a 3-years study. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 37: 69~71, 2005.
- 5) 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会: 鼻アレルギー診療ガイドライン—通年性鼻炎と花粉症—. 改定第5版. 31~56頁, ライフ・サイエンス, 東京, 2005.
- 6) 岡本美孝, 國井直樹, 大川 徹, 他: 花粉症の治療 患者満足度を上げるためのプラスα スギ花粉症の現状. *治療* 88: 218~223, 2006.
- 7) 湯田厚司, 宮本由起子, 服部玲子, 他: スギ花粉症に対する抗原特異的免疫療法の花粉尘散総数による医療経済効果—医療費による直接経費からの検討—. *アレルギー* 56: 1366~1371, 2007.
- 8) Akidris M and Akidris CA: Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 119: 780~789, 2007.
- 9) 奥田 稔: スギ花粉症の長期予後. *アレルギー* 55: 655~661, 2006.
- 10) Durham SR, Walker SM, Varga EM, et al.: Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 341: 468~475, 1999.
- 11) Bousquet J, Lockey RF and Malling HJ: WHO position paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 53 Suppl 44: 1~42, 1998.

原稿受付: 平成21年8月4日

原稿採択: 平成21年11月9日

別刷請求先: 荻原仁美

〒514-8507 津市江戸橋2-174

三重大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
分担研究報告書

リアルタイムモニター飛散数の情報の在り方と研究と舌下ペプチド・アジュバント療法の臨床研究
グループ2 スギ・ヒノキ抗原に対する末梢血単核細胞応答における免疫療法の制御作用

研究分担者 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

今回我々は、免疫療法がスギ花粉症患者末梢血単核細胞 (PBMC) のグループ2 スギ (Cry j 2) およびヒノキ (Cha o 2) 花粉抗原に対するサイトカイン産生を修飾するのか検討した。免疫療法非施行群に比較して、免疫療法施行群における Cry j 2 に対する IL-5 産生は有意に抑制されていた。しかしながら、Cha o 2 に対する IL-5 産生は2群間で有意な差を認めなかった。免疫療法非施行群では、Cry j 2 と Cha o 2 に対する IL-5 産生量は有意な正の相関を示した。一方、免疫療法施行群では Cry j 2 と Cha o 2 に対する IL-5 産生量は有意な相関を示さなかった。以上の結果より、標準化スギ花粉エキスをを用いた免疫療法は Cry j 2 に対する免疫寛容を誘導するものの、Cha o 2 に対する免疫寛容への効果は限定的であることが示唆された。スギ・ヒノキ花粉症の根治を考える上では、Cha o 2 の T 細胞エピトープペプチドを含む治療用ヒノキ花粉エキスの開発が必要であると思われた。

A. 研究目的

ペプチド免疫療法を開発するためには、T 細胞エピトープの同定およびその免疫学的活性の検討が必要である。これまでの研究で、標準化スギ花粉エキスをを用いた免疫療法はスギ花粉飛散期の症状および QOL を改善する一方、ヒノキ花粉飛散期にはその効果が減弱することを示してきた。その機序についても検討し、免疫療法を施行した患者の末梢血単核細胞 (PBMC) ではグループ1 ヒノキ主要抗原である Cha o 1 に対する IL-5 産生が有意に抑制されるが、ヒノキ粗抗原に対しては有意な産生抑制を来さないことを観察した。以上の結果から、T 細胞レベルでスギ抗原と交差反応を示さないヒノキ抗原の存在が示唆された。そこで今回我々はグループ2 抗原に注目し、Cry j 2 および Cha o 2 に対する PBMC 応答における免疫療法の制御作用について検討した。

B. 研究方法

2010年5月前後に免疫療法施行 (n=17) および非施行 (n=15) のスギ・ヒノキ花粉症患者より PBMC を採取した。10 · g/ml の Cry j 2 あるいは Cha o 2 にて72時間培養した。上清中の IL-5 を ELISA にて測定した。

(倫理面への配慮)

患者からの検体 (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した。

C. 結果

2010年の岡山大学における花粉飛散総数はスギ

が107.3個/cm²、ヒノキが279.2個/cm²で少量飛散年であった。免疫療法非施行群に比較して、免疫療法施行群における Cry j 2 に対する IL-5 産生は有意に抑制されていた (p=0.021)。しかしながら、Cha o 2 に対する IL-5 産生は2群間で有意な差を認めなかった (p=0.365)。免疫療法非施行群では、Cry j 2 と Cha o 2 に対する IL-5 産生量は有意な正の相関を示した (p=0.019)。一方、免疫療法施行群では Cry j 2 と Cha o 2 に対する IL-5 産生量は有意な相関を示さなかった (p=0.091)。

D. 考察:

今回の結果は、標準化スギ花粉エキスをを用いた免疫療法はグループ2抗原に対して異なる免疫寛容効果を示すことを示した。最近、Cha o 2 のメジャーな T 細胞エピトープは Cry j 2 と交差しないことが報告されている (Sone T, et al. Allergol Int 58: 234, 2009)。今回の検討はこの報告を支持するものであり、スギ花粉エキスをを用いた免疫療法はグループ2ヒノキ抗原 Cha o 2 に対する免疫寛容を十分に誘導できない可能性が示唆された。

E. 結論

標準化スギ花粉エキスをを用いた免疫療法は Cry j 2 に対する免疫寛容を誘導するものの、Cha o 2 に対する免疫寛容への効果は限定的であることが示された。スギ・ヒノキ花粉症の根治を考える上では、Cha o 2 の T 細胞エピトープペプチドを含む治療用ヒノキ花粉エキスの開発が急務であると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okano M, Fujiwara T, Higaki T, Makihara S, Haruna T, Noda Y, Kanai K, Kariya S, Yasueda H, Nishizaki K. Characterization of pollen antigen-induced IL-31 production by peripheral blood mononuclear cells in allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 127: 277-279, 2011.
- 2) Hosoya K, Satoh T, Yamamoto Y, Saeki K, Igawa K, Okano M, Moriya T, Imamura O, Nemoto Y, Yokozeki H. Gene silencing of STAT6 with siRNA ameliorates contact hypersensitivity and allergic rhinitis. **Allergy** 66: 124-31, 2011.
- 3) 岡野光博. 花粉症に対する初期療法のEBMとは? 池田勝久、武田憲昭、井之口明、原淵保明、丹生健一編. **EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療 (第1版)**. 東京. 中外医学社. 2010. 20-22 頁.
- 4) 岡野光博. 抗アレルギー薬 トロンボキササン A₂ 合成阻害薬・拮抗薬. 永倉俊和、森田 寛、足立 満編. **アレルギー疾患イラストレイテッド (第2版)**. 東京. メディカルビュー社. 2010. 214-219 頁.
- 5) 岡野光博. 上気道からみた One airway, one disease. **喘息** 23: 643-652, 2010.
- 6) 岡野光博. 親がアレルギー性鼻炎ですが、子どもにも遺伝しますか? **JOHNS** 26: 1402-1405, 2010.
- 7) 岡野光博. DP 受容体. **鼻アレルギーフロンティア** 10: 34-38, 2010.
- 8) 岡野光博. ヒノキ花粉のスギ・ヒノキ花粉症に与える影響. **メディカルビューポイント** 32: 2, 2011.
- 9) 岡野光博、難波弘行、佐橋紀男. 2011 年ヒ

ノキ科花粉飛散予測. **アレルギーの臨床** 31: 21-26, 2011.

2. 学会発表

- 1) 岡野光博、檜垣貴哉、牧原靖一郎、假谷伸、野田洋平、西崎和則. スギ・ヒノキ抗原に対する末梢血単核細胞のサイトカイン産生と免疫療法による制御. 第111回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会. 仙台. 2010 年.
- 2) 岡野光博. アレルギー性鼻炎の感作・発症・増悪因子としての Th2 型サイトカインの関与とその制御. 第49回日本鼻科学会学術講演会. 札幌. 2010 年 (シンポジウム).
- 3) 岡野光博、檜垣貴哉、牧原靖一郎、假谷伸、金井健吾、松山祐子、西崎和則. Cry j 1 に対する末梢血単核細胞の IL-13/IL-17/IL-18/IL-31/IL-33 産生と免疫療法による制御. 第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 福井. 2010 年.
- 4) 岡野光博. アレルギー性鼻炎に対する免疫療法のABC. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会. 京都. 2010 年.
- 5) 岡野光博. 上気道慢性炎症における真菌の役割-鼻茸分離細胞を用いた検討-. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京. 2010 年 (シンポジウム).

G. 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

3 years of life, but not thereafter. The observed sex differences were larger for asthmatic wheeze than for total wheeze, suggesting that sex differences are stronger for asthma than for transient symptoms.

Young boys are thought to have smaller airway diameters in proportion to their total lung volume than girls, predisposing them to airway obstruction and wheeze.^{1,6} Our results suggest that sex differences in asthma may partly be explained by the higher prevalence of atopy in boys and cannot be explained by a stronger effect of perinatal risk factors in boys.

Alet Wijga, PhD^a
Cora Tabak, PhD^a
Dirkje S. Postma, MD, PhD^b
Marjan Kerkhof, MD, PhD^c
Marjan H. Wieringa, PhD^d
Maarten O. Hoekstra, MD, PhD^e
Bert Brunekreef, PhD^{g,h}
Johan C. de Jongste, MD, PhD^f
Henriette A. Smit, PhD^h

From ^athe Center for Prevention and Health Services Research, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven; the Departments of ^bPulmonology and ^cEpidemiology, University Medical Center Groningen, University of Groningen; ^dthe Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Erasmus University Medical Center, and ^ethe Department of Pediatrics/Respiratory Medicine, Erasmus University Medical Center—Sophia Children's Hospital, Rotterdam; ^fthe Department of Pediatrics, University Medical Center St Radboud, Nijmegen; ^gthe Institute for Risk Assessment Sciences, University of Utrecht; and ^hthe Julius Center for Health Sciences and Primary Care, University Medical Center Utrecht, The Netherlands. E-mail: alet.wijga@rivm.nl.

The PIAMA study is supported by The Netherlands Organization for Health Research and Development; The Netherlands Organization for Scientific Research; The Netherlands Asthma Fund; The Netherlands Ministry of Spatial Planning, Housing, and the Environment; and The Netherlands Ministry of Health, Welfare, and Sport.

Disclosure of potential conflict of interest: D. S. Postma is a consultant for Nycomed and receives research support from Top Institute Pharma and AstraZeneca. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Almqvist C, Worm M, Leynaert B, Working Group of GA2LEN WP 2.5 Gender. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA2LEN review. *Allergy* 2008;63:47-57.
2. Martinez FD, Godfrey S. Wheezing disorders in the preschool child: pathophysiology and management. London and New York: Martin Dunitz; 2003.
3. Postma DS. Gender differences in asthma development and progression. *Gen Med* 2007;4(suppl B):S133-46.
4. Brunekreef B, Smit J, de Jongste J, Neijens H, Gerritsen J, Postma D, et al. The Prevention and Incidence of Asthma and Mite Allergy (PIAMA) birth cohort study: design and first results. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13(suppl 15):55-60.
5. Scholte S, Wijga AH, Scidell JC, Brunekreef B, de Jongste JC, Gehring U, et al. Overweight and changes in weight status during childhood in relation to asthma symptoms at 8 years of age. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1312-8. e2.
6. Becklake MR, Kauffmann F. Gender differences in airway behaviour over the human life span. *Thorax* 1999;54:1119-38.

Available online November 20, 2010.
doi:10.1016/j.jaci.2010.09.022

Characterization of pollen antigen-induced IL-31 production by PBMCs in patients with allergic rhinitis

To the Editor:

Japanese cedar/cypress pollinosis (JCCP) is the major phenotype of allergic rhinitis in Japan and has a prevalence of 29.8%, with a substantial impairment of quality of life (QOL).¹ JCCP is mainly caused by exposure to Japanese cedar (*Cryptomeria*

japonica) pollen and Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) pollen. The cypress pollen disperses after the cedar pollen in spring. Because cedar and cypress pollen contain several cross-reactive components, pollinosis-related symptoms can last for as long as 4 months, from February to May. On the other hand, species-specific components and epitopes for IgE, T cells, or both have been identified.²

IL-31 is a novel cytokine produced by CD4⁺ T cells, particularly T_H2 cells and skin-homing CD45RO⁺ cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive cells.^{3,4} Thus the role of IL-31 in patients with pruritic skin diseases, including atopic dermatitis, has been examined.³⁻⁶ On the other hand, the role of IL-31 in the pathogenesis of respiratory allergic diseases remains unclear.⁷⁻⁹ IL-31 enhances epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor, and CCL2 production by human bronchial epithelial BEAS-2B cells.⁸ However, a murine model of T_H2-biased pulmonary inflammation suggests that IL-31 is a negative regulator in this type of inflammation.⁷

In the present study we investigated the production of IL-31 in pollen antigen-stimulated PBMCs from subjects with and without JCCP. Details on the methods are available in the Methods section and Fig E7 of this article's Online Repository at www.jacionline.org.

PBMCs from the healthy control group did not produce IL-31 in response to pollen antigens. On the other hand, the JCCP group included both positive and negative responders. The detection limit of the ELISA (7.8 pg/mL) was used as a cutoff for discriminating IL-31⁻ from IL-31⁺ JCCP. Of PBMCs from patients with JCCP not treated with specific immunotherapy (SIT), 62.1% ($P = .002$ compared with control subjects, Fisher exact probability test), 63.0% ($P = .002$), and 34.6% ($P = .060$) produced IL-31 in response to Cry j 1, cedar crude antigen, and cypress crude antigen, respectively. This might be the first report of the induction of IL-31 protein production by means of allergen stimulation in human subjects. Among the SIT-treated patients with JCCP, only 25.0% ($P = .011$ compared with patients not treated with SIT), 21.1% ($P = .005$), and 16.7% ($P = .166$) of PBMCs produced IL-31 in response to Cry j 1, cedar crude antigen, and cypress crude antigen, respectively. Overall, the median amounts of IL-31 produced in response to Cry j 1 and cedar crude antigen, but not cypress crude antigen, were significantly higher in patients with JCCP not treated with SIT compared with those seen in healthy control subjects and SIT-treated patients with JCCP (Fig 1). Increased expression levels of IL-31 protein, mRNA, or both in sera, PBMCs, and inflamed tissues in other allergic diseases have been reported for both human subjects and mice.^{4-6,9} The present results are consistent with the previous reports and suggest that the increased expression of IL-31 might be a common feature in patients with atopic allergic diseases.

The amounts of Cry j 1-induced, cedar crude antigen-induced, and cypress crude antigen-induced IL-31 production were significantly and positively correlated with the production of IL-5 and IL-13, but not IFN- γ , in response to the respective antigens in patients with JCCP without SIT treatment (see Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). In addition, PBMCs from patients who produced IL-31 in response to Cry j 1, cedar crude antigen, and cypress crude antigen produced significantly higher amounts of IL-5 and IL-13 by means of stimulation with the respective antigens compared with PBMCs from patients who did not produce IL-31 (see Fig E2, A, B, D, E, G, and H, in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

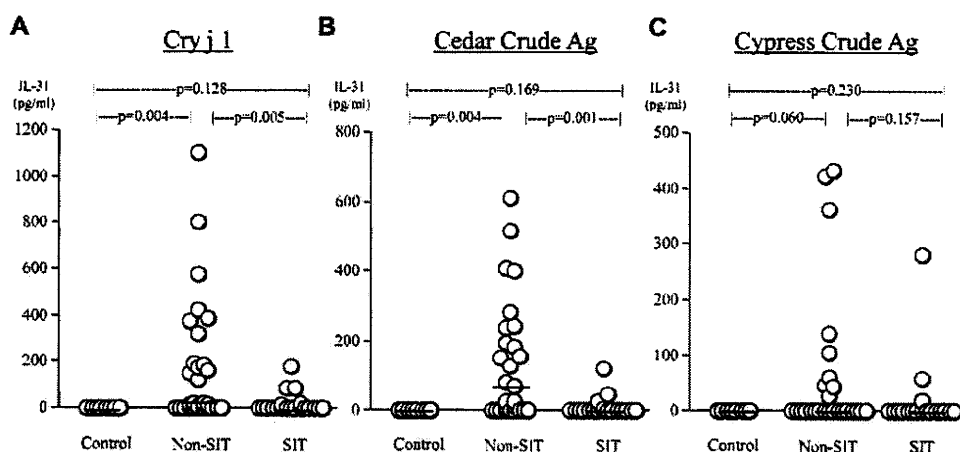


FIG 1. Production of IL-31 by PBMCs after stimulation with pollen antigens. PBMCs from control subjects (*Control*), patients with JCCP without specific immunotherapy (*Non-SIT*), and patients with JCCP with specific immunotherapy (*SIT*) were stimulated with Cry j 1 (**A**), cedar crude antigen (**B**), and cypress crude antigen (**C**), and then the concentration of IL-31 in the supernatants was measured. The horizontal line indicates the median. *P* values were determined by using the Mann-Whitney *U* test. *Ag*, Antigen.

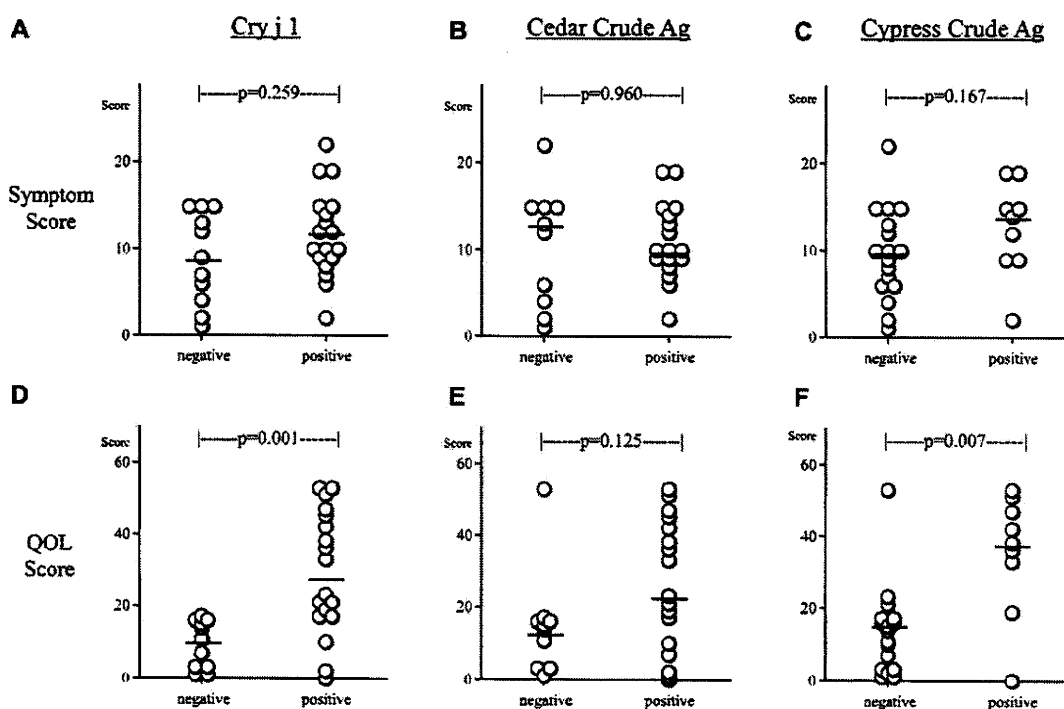


FIG 2. Comparison of naso-ocular symptoms (**A-C**) and QOL (**D-F**) during the peak season of cypress pollen dispersion between patients with positive and negative production of IL-31 in response to Cry j 1 (**A** and **D**), cedar crude antigen (**B** and **E**), and cypress crude antigen (**C** and **F**). The horizontal line indicates the median. *P* values were determined by using the Mann-Whitney *U* test. *Ag*, Antigen.

org). The levels of IFN- γ production were not different between IL-31 producers and nonproducers, except for cedar crude antigen stimulation (see Fig E2, C, F, and J). These results suggest that antigen-induced IL-31 production is selectively associated with T_H2 responses in PBMCs.

Symptom scores in the peak season of cedar pollen dispersion were similar between IL-31 producers and nonproducers in response to Cry j 1, cedar crude antigen, and cypress crude

antigen (see Fig E3, A-C, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). QOL scores in the peak season of cedar pollen dispersion were also similar between IL-31 producers and nonproducers in response to cedar crude antigen and cypress crude antigen (see Fig E3, E and F). A trend in the exacerbation of QOL was seen in Cry j 1-induced IL-31 producers compared with nonproducers; however, this trend did not reach statistical difference ($P = .087$; see Fig E3, D).

Symptom scores in the peak season of cypress pollen dispersion were also similar between IL-31 producers and nonproducers in response to Cry j 1, cedar crude antigen, and cypress crude antigen (Fig 2, A-C). However, QOL scores, in which a high score means a low QOL, in the peak season of cypress pollen dispersion were significantly higher in IL-31 producers in response to Cry j 1 and cypress crude antigen, but not cedar crude antigen, compared with those seen in the respective nonproducers (Fig 2, D-F). Together with the finding that PBMCs that produced IL-31 in response to pollen antigens produced higher amounts of IL-5 and IL-13 in response to the respective antigens, these results suggest that the induction of IL-31 production might lead to a deterioration of JCCP.

The amount of IL-31 production in response to pollen antigens did not correlate with symptom or QOL scores in the peak season of cedar pollen dispersion (see Fig E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). However, the amounts, especially in response to Cry j 1 ($\rho = 0.641$, $P < .001$) and cypress crude antigen ($\rho = 0.658$, $P = .002$), significantly and positively correlated with QOL scores in the peak season of cypress pollen dispersion (see Fig E5, D-F, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). In addition, there was a trend for a positive correlation between cypress crude antigen-induced IL-31 production and symptom scores in the season ($\rho = 0.451$, $P = .070$; see Fig E5, C). In contrast, the amounts of IL-5 or IL-13 production after stimulation with pollen antigens did not correlate with the QOL scores (see Fig E6 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). This result suggests that the induction of pollen antigen-induced IL-31 production by PBMCs is associated with the severity of allergic rhinitis. Detailed discussion is available in this article's Discussion section and Figs E8 and E9 in this article's Online Repository at www.jacionline.org.

The present study provides evidence that, unlike other T_H2 -type cytokines, including IL-5 and IL-13, IL-31 displays a unique and independent role in the pathophysiology of allergic rhinitis. The amount of pollen antigen-induced IL-31 production by PBMCs is selectively associated with the severity of QOL in patients with JCCP. These observations might provide a basis for future therapeutic approaches targeting IL-31 in the management and alleviation of allergic rhinitis.

Mitsuhiro Okano, MD^a
Tazuko Fujiwara, BS^a
Takaya Higaki, MD^a
Seiichiro Makihara, MD^a
Takenori Haruna, MD^a
Yohei Noda, MD^a
Kengo Kanai, MD^a
Shin Kariya, MD^a
Hiroshi Yasueda, PhD^b
Kazunori Nishizaki, MD^a

From ^athe Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan, and ^bthe Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, Sagami National Hospital, Sagami, Japan. E-mail: mokano@cc.okayama-u.ac.jp.

Supported in part by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (20592001).

Disclosure of potential conflict of interest: The authors have declared that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Okubo K, Goto M, Fujieda S, Okano M, Yoshida H, Morikawa H, et al. A randomized-double-blind comparative study of sublingual immunotherapy for cedar pollinosis. *Allergol Int* 2008;57:265-7.

- Sone K, Dairiki K, Morikubo K, Shimizu K, Tsunoo H, Mori T, et al. Recognition of T cell epitopes unique to Cha o 2, the major allergen in Japanese cypress pollen, in allergic patients cross-reactive to Japanese cedar and Japanese cypress pollen. *Allergol Int* 2009;58:237-45.
- Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 2004;5:752-60.
- Bilborough J, Leung DYM, Maurer M, Howell M, Boguniewicz M, Yao L, et al. IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:418-25.
- Neis MM, Peters B, Dreu A, Wenzel J, Bieber T, Mauch C, et al. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:930-7.
- Raap U, Wichmann K, Bruder M, Stander S, Wedi B, Kapp A, et al. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:421-3.
- Perrigou JG, Li J, Zaph C, Goldschmidt M, Scott P, de Sauvage FJ, et al. IL-31-IL-31R interactions negatively regulate type 2 inflammation in the lung. *J Exp Med* 2007;204:481-7.
- Ip WK, Wong CK, Li MLY, Li PW, Cheung PFY, Lam CWK. Interleukin-31 induces cytokine and chemokine production from human bronchial epithelial cells through activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways: implications for the allergic diseases. *Immunology* 2007;122:532-41.
- Lei Z, Liu G, Huang Q, Lv M, Zu R, Zhang GM, et al. SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma. *Allergy* 2007;63:327-32.

doi:10.1016/j.jaci.2010.09.029

Sequence variation in the *IL4* gene and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivians

To the Editor:

Chagas disease, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, affects 10 to 12 million people each year in Latin America, with Bolivia having the highest prevalence of infection (see "Outlook: Chagas disease"¹ and references therein). In the chronic phase, Chagas infection may present as an indeterminate form in which 60% of infected individuals remain asymptomatic despite having positive serologic reactions for *T cruzi*. In the remaining 40% of patients with Chagas disease, tissue inflammation leads to organ damage, affecting the cardiac, digestive, or nervous systems up to 25 years after initial infection. Several studies identified genetic markers for disease establishment and progression in Venezuelans, Brazilians, Peruvians, Colombians, and Mexicans,² but no genetic studies have been conducted previously in Bolivians.

Cytokines produced in response to *T cruzi* infection appear to modulate disease progression by enhancing or inhibiting parasite replication in a variety of cell types. In particular, the T_H2 cytokine IL-4 maintains inflammation and parasite persistence in Chagas disease,³ whereas T_H1 cytokines maintain control of parasitism⁴ but can also contribute to the development of chronic myocarditis.⁵

To determine whether genetic variation at the *IL4* gene is associated with *T cruzi* infection in Bolivians, we performed a resequencing study of an approximately 12-kb region around the *IL4* locus, including 470 base pairs (bp) of coding (exon) sequence, 368 bp of 5' untranslated region, 82 bp of 3' untranslated region, and 11,453 bp of intronic sequence. The study included 110 individuals from the Department of Cochabamba, Bolivia, with infection status serologically confirmed by 2 different diagnostic tests (HAI Chagas Polychaco; Laboratorio Lemos, S.R.L., Buenos Aires, Argentina, and IFI Biocientifica S.A., Buenos Aires, Argentina). Each subject was classified according to the serologic results as a case (positive serology) or a control (negative

METHODS

Antigens and reagents

Crude antigens of Japanese cedar pollen and Japanese cypress pollen were extracted from *Cryptomeria japonica* pollen and *Chamaecyparis obtuse* pollen, respectively, as described previously.^{E1,E2} Cry j 1 was purified and concentrated from Japanese cedar crude antigen, as previously described.^{E1}

Patients

Forty-nine patients with JCCP (15 men and 34 women; age range, 29-75 years; mean age, 51.0 years) were enrolled in the study. Written informed consent was obtained from each subject. Sensitization to Japanese cedar pollen was confirmed by the presence of specific IgE antibodies (range, 0.73 to >100 UA/mL; mean, 20.54 ± 22.39 UA/mL), as determined by means of ImmunoCAP (Phadia AB, Uppsala, Sweden). Twenty patients received SIT with a standardized extract of *C. japonica* pollen (Torii Co, Tokyo, Japan) over a period of at least 2 years. The mean maintenance dose of the extract was 468 JAU. None of the patients had used immunosuppressive drugs, including oral steroids, during the pollen season. The control group consisted of 8 healthy subjects with no sensitization to Japanese cedar pollen, as confirmed by means of ImmunoCAP (3 men and 5 women; age range, 34-62 years; mean age, 46.5 years). No significant differences in age or sex existed among the 3 groups. The study was approved by the Human Research Committee of Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences.

Antigen-specific cytokine production by PBMCs

Heparinized blood was collected from May to June 2009. PBMCs were isolated and cultured as previously described.^{E3} In brief, PBMCs (2×10^6 /mL) were incubated in the presence or absence of 10 µg/mL cedar crude antigen, cypress crude antigen, or Cry j 1 at 37°C in a 5% CO₂/air mixture for 72 hours. PBMCs from all 29 patients with JCCP who were not treated with SIT were examined for cytokine production in response to Cry j 1. However, because of limited sample volumes, PBMCs from 27 and 26 patients with JCCP not treated with SIT were examined for cytokine production in response to cedar crude antigen and cypress crude antigen, respectively. All PBMCs from SIT-treated patients could be examined for cytokine production in response to the 3 antigens. Then supernatant was collected and stored at -80°C until it was assayed. Levels of IL-5, IL-13, and IFN-γ were measured by using Opt ELA sets (BD Biosciences, San Jose, Calif) in accordance with the manufacturer's instructions. Levels of IL-31 were measured by using a DuoSet ELISA development kit (R&D Systems, Minneapolis, Minn). The detection limit of these assays was 3.9 pg/mL for IL-5, 3.9 pg/mL for IL-13, 7.8 pg/mL for IFN-γ, and 7.8 pg/mL for IL-31.

Monitoring of symptoms and QOL

Japanese rhinoconjunctivitis QOL questionnaires were used to compare naso-ocular symptoms and rhinitis-related QOL during the pollen dispersion season between SIT-treated and SIT-untreated patients.^{E4}

A total of 2,220 grains/cm² of Japanese cedar pollen and 1,478 grains/cm² of Japanese cypress pollen were dispersed in 2009. The peak dispersions of cedar and cypress pollens occurred on March 10 and April 11, respectively (Fig E7). Thus patients answered the Japanese rhinoconjunctivitis QOL questionnaires during March 4 to 18 and April 8 to 22 to assess naso-ocular symptoms and rhinitis-related QOL.

Statistical analysis

Median values are presented. The nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to detect differences between groups. Correlation analysis was performed by using the Spearman correlation coefficient by rank. *P* values of less than .05 were considered statistically significant. The statistical analysis was performed with StatView software (version 4.5; Abacus, Inc, Berkeley, Calif).

DISCUSSION

In the present study we characterized the IL-31 production in pollen antigen-induced PBMC responses in patients with allergic rhinitis. Evidence is accumulating regarding the role of IL-31 in the pathogenesis of allergic diseases, especially atopic dermatitis; however, this is the first report to demonstrate the role of IL-31 in patients with allergic rhinitis.^{E5-E11}

The amount of pollen antigen-induced IL-31 production was significantly and positively correlated with the production of IL-5 and IL-13 but not IFN-γ. This result is consistent with the report by Neis et al^{E7} that the expression of IL-31 mRNA in the skin was correlated with the expression of IL-4 and IL-13 in patients with atopic dermatitis. Although IL-31 can be produced by mast cells, this result further suggests that the main producer of IL-31 might be T_H2 cells producing both IL-5 and IL-13.^{E12}

The most important and interesting finding in the present study is that the PBMCs from some patients with JCCP produced IL-31 in response to antigen, whereas the PBMCs from other patients with JCCP did not. About one third of the patients did not produce IL-31 in response to cedar pollen-related antigens (Cry j 1 and cedar crude antigen). On the other hand, most patients produced other T_H2 cytokines, IL-5, and IL-13 (Fig E8). In particular, all patients with JCCP produced IL-5 in response to Cry j 1 and cedar crude antigen, whereas the PBMCs from healthy control subjects did not produce IL-5. One of the reasons why all patients with JCCP produced IL-5 in response to the pollen antigens is the high pollen dispersion in 2009. This result is consistent with previous reports that the induction of antigen-specific IL-5 production by PBMCs was a key factor in the onset of allergic rhinitis, including JCCP.^{E13,E14} In addition, PBMCs from about two thirds of the patients with JCCP did not respond to cypress crude antigen. It has been proposed that a subset of patients with atopic dermatitis express low levels of IL-31.^{E6,E7} For example, cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive T cells from 5 of 12 patients with atopic dermatitis did not produce IL-31 in response to a suboptimal concentration of anti-CD3.^{E6} Our results are similar to these reports and suggest that patients with JCCP can be divided into 2 subsets regarding antigen-induced IL-31 production by PBMCs. In addition, these results suggest that the induction of IL-31 production is less essential for the onset of allergic rhinitis compared with other T_H2 cytokines, especially IL-5.

On the other hand, PBMCs that produced IL-31 in response to pollen antigens produced higher amounts of IL-5 and IL-13 in response to the respective antigens. This result is similar to the recent report by Woodruff et al^{E15} that airway gene expression in patients with asthma can be divided into 2 distinct "T_H2-high" and "T_H2-low" subgroups. In addition, patients whose PBMCs produced IL-31 in response to Cry j 1 and cypress crude antigen had significantly impaired QOL at the peak season of cypress pollen dispersion. This result suggests that the induction of IL-31 production might lead to a deterioration in the pathophysiology of JCCP.

Furthermore, the amount of IL-31 produced by PBMCs in response to Cry j 1 and cypress crude antigen significantly and positively correlated with QOL scores in the peak season of cypress pollen dispersion. In human subjects with atopic dermatitis, IL-31 serum levels were correlated with the severity of atopic dermatitis, as determined by SCORAD scores.^{E8} On the other hand, SCORAD scores were not correlated with the cutaneous expression levels of IL-31 mRNA.^{E7} Our result is consistent with the former report and suggests that the induction of pollen

antigen-induced IL-31 production by PBMCs is associated with the severity of allergic rhinitis.

In the present study we used Cry j 1, the major allergen molecule of Japanese cedar pollen, as a purified pollen allergen. Cross-allergenicity between Cry j 1 and Cha o 1, the major allergen molecule of Japanese cypress pollen, has been reported at the human T-cell level.^{E16,E17} In addition, we found that the amounts of IL-5 produced by PBMCs in response to Cry j 1 are significantly and highly correlated with those in response to Cha o 1 ($n = 46$, $r = 0.952$, $P < .001$, Pearson correlation coefficient, unpublished data, Fig E9). Thus the correlation between QOL scores in the peak season of cypress pollen dispersion and the amounts of IL-31 by PBMCs in response to Cry j 1 is due to the cross-reactivity of Cry j 1 and Cha o 1 at the cellular level.

The amount of pollen-induced IL-31 produced by PBMCs was correlated with QOL scores in the peak season of cypress pollen dispersion but not the peak season of cedar pollen dispersion. This might be due to the time of blood sampling. We collected blood from May to June 2009, just after the cessation of cypress pollen dispersion. Thus the amounts of cytokines produced by PBMCs might more closely reflect the pathogenesis caused by cypress pollen.

REFERENCES

- E1. 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.
- E2. Suzuki M, Komiyama N, Itoh M, Itho H, Sone T, Kino K, et al. Purification, characterization and molecular cloning of Cha o 1, the major allergen of *Chamaecyparis obtuse* (Japanese cypress) pollen. *Mol Immunol* 1996;33:451-60.
- E3. Okano M, Otsuki N, Azuma M, Fujiwara T, Kariya S, Sugata Y, et al. Allergen-specific immunotherapy alters the expression of BTLA, a co-inhibitory molecule, in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2008;38:1891-900.
- E4. Okuda M, Ohkubo K, Goto M, Okamoto H, Konno A, Baba K, et al. Comparative study of two Japanese rhinoconjunctivitis quality-of-life questionnaires. *Acta Otolaryngol* 2005;125:736-44.
- E5. Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Pre-snell SR, et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 2004;5:752-60.
- E6. Bilsborough J, Leung DYM, Maurer M, Howell M, Boguniewicz M, Yao L, et al. IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:418-25.
- E7. Neis MM, Peters B, Dreuw A, Wenzel J, Bieber T, Mauch C, et al. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:930-7.
- E8. Raap U, Wichmann K, Bruder M, Stander S, Wedi B, Kapp A, et al. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:421-3.
- E9. Perrigoue JG, Li J, Zaph C, Goldschmidt M, Scott P, de Sauvage FJ, et al. IL-31-IL-31R interactions negatively regulate type 2 inflammation in the lung. *J Exp Med* 2007;204:481-7.
- E10. Ip WK, Wong CK, Li MLY, Li PW, Cheung PFY, Lam CWK. Interleukin-31 induces cytokine and chemokine production from human bronchial epithelial cells through activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways: implications for the allergic diseases. *Immunology* 2007;122:532-41.
- E11. Lei Z, Liu G, Huang Q, Lv M, Zu R, Zhang GM, et al. SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma. *Allergy* 2007;63:327-32.
- E12. Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Tominaga N, Takamori K, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *J Immunol* 2010;184:3526-34.
- E13. Ohashi Y, Nakai Y, Tanaka A, Kakinoki Y, Masamoto T, Kato A, et al. Allergen-induced synthesis of interleukin-5, but not of IgE, is a key mechanism linked to symptomatic episodes of seasonal allergic rhinitis in sensitized individuals. *Scand J Immunol* 1998;47:596-602.
- E14. Sun J, Wong B, Cundall M, Goncharova S, Conway M, Dalrymple A, et al. Immunoreactivity profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with ragweed-induced allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2007;37:901-8.
- E15. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:388-95.
- E16. Sone K, Dairiki K, Morikubo K, Shimizu K, Tsunoo H, Mori T, et al. Identification of human T cell epitopes in Japanese cypress pollen allergen, Cha o 1, elucidates the intrinsic mechanism of cross-allergenicity between Cha o 1 and Cry j 1, the major allergen of Japanese cedar pollen, at the T cell level. *Clin Exp Allergy* 2005;35:664-71.
- E17. Nakamura Y, Takagi S, Suzuki M, Ito H, Murakami S, Ohta N. Survival of memory T cells specific for Japanese cypress pollen allergen is maintained by cross-stimulation of putative peptidase lyase from other plants. *Allergy* 2001;56:285-92.