

Fig. 1a-f Clinical effect by treatment periods of SLIT

Mean daily nasal symptom score of sneezing (1a), nasal blowing (1b), congestion (1c), total nasal symptom score (1d), medication score (1e), symptom-medication score (1f) were shown. Daily pollen counts were also shown at the bottom.

▲: patients treated for 1 year (n = 7), ○: patients treated for 2 years (n = 18), ■: patients treated for 4 years (n = 5)

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  in 1 year vs 2 year, +:  $p < 0.05$ , ++:  $p < 0.01$  in 2 year vs 4 year, #:  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$  in 1 year vs 4 year

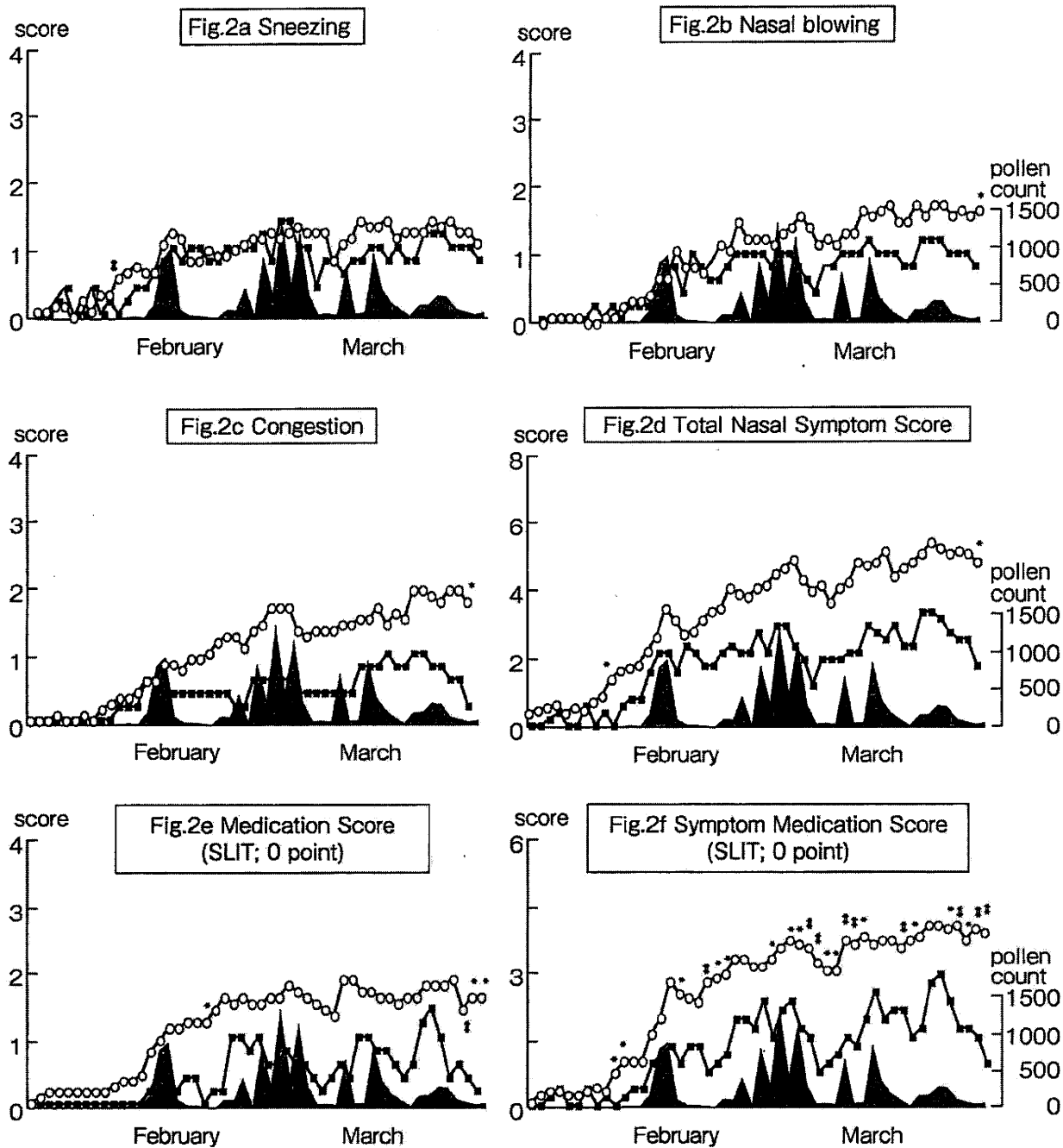


Fig. 2a-f Clinical influence by finishing SLIT after a 3-year period. Medication score for SLIT was not added on Fig. 2 e and f, because there was no regulation on the medication score for SLIT in the Practical Guideline for the Management of Allergic Rhinitis in Japan<sup>2)</sup>.  
 ○: Patients who finished SLIT after a 3-year period and did not received SLIT at the fourth year. ■: Patients who received SLIT at the fourth year.  
 \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

かった3年終了群の比較となる。症状スコア (Fig. 2a-c)は全般に4年目群が小さく良好であったが、

ごく限られた日を除いて有意差はなかった。薬物スコア (Fig. 2e)も4年目群が小さく良好であり、

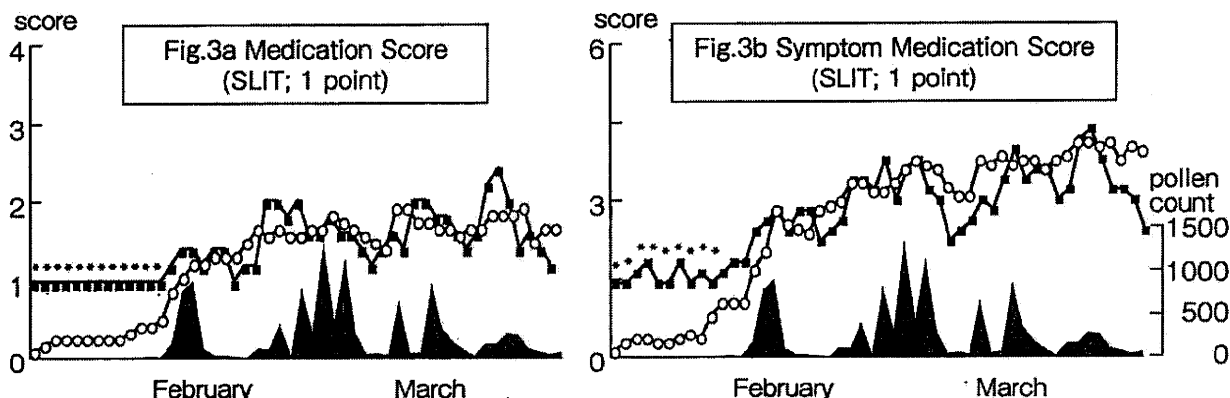


Fig. 3a and b Clinical influence by finishing SLIT after a 3-year period in the case added 1 point for SLIT.

One point was added for SLIT on Fig. 3a and 3b according to the medication score (1 point) of subcutaneous immunotherapy. ○: Patients who finished SLIT after a 3-year period and did not received SLIT at the fourth year. ■: Patients who received SLIT at the fourth year. \*:  $p < 0.05$

薬物症状スコア (Fig. 2f) は、多数日で有意に4年目群が3年終了群よりも良好であった。

舌下免疫療法に薬物スコアの規定がないため舌下免疫療法間の比較では薬物スコアを算定していないが、3年終了群との比較においては舌下免疫療法の薬物スコアも考慮する必要が生じる。そこで、皮下免疫療法の維持期に準じて1点加えた薬物スコアと症状薬物スコアも算出した (Fig. 3a, b)。スギ花粉飛散期には薬物スコアと症状薬物スコアにおいて両群に差がなかった。スギ花粉が飛散していない2月初旬で4年目群が3年終了群より有意に高値となるが、スギ花粉飛散前の症状が無い時期であり、初期療法を行っていない3年終了群では薬物が不要であったことによる。

4年目も舌下免疫療法を継続するか或いは終了するかは患者の自由意思で行った。そのため、3年間の治療効果が良好な例で4年目も治療を継続したバイアスも考えられた。そこで、両群ともに舌下免疫療法を行っていた2008年(3年目)の成績を確認した。2008年(花粉飛散総数2,691個/cm<sup>2</sup>)の症状スコア (Fig. 4a-d)、薬物スコア (Fig. 4e)、症状薬物スコア (Fig. 4f) を2009年と全く同じ方法で検討したところ、両群に差がなかったためバイアスの存在は否定的であった。

## 考 察

スギ花粉症に対する舌下免疫療法に期待が寄せられているが、検討が始まったばかりで多くの課題をもつ。治療による臨床効果については、皮下免疫療法を大きく上回る効果を期待できないが、従来の処方薬による治療と比較すれば効果も認められている<sup>7)</sup>。今後の舌下免疫療法の推進にあたっては、単なる臨床効果のみでなく、様々な検討も加えていくことが必要である。

皮下免疫療法では、治療年数により効果の上乗せがあり<sup>9)</sup>、1年目より2年目で、2年目より3年目以降で効果が高い。舌下免疫療法で治療年数により効果の上乗せがあるかを検討したが、皮下免疫療法と同じく、治療期間が長くなれば効果が高くなっていた (Fig. 1a-f)。一般に効果良好例で治療が継続され、不良例が脱落しやすいと考えられ、数年の治療となる舌下免疫も治療年数を経るに従って治療効果不十分例が脱落している可能性もあり得た。そこで、今回の全症例の脱落例を確認した。舌下免疫療法を2008年に開始した患者(1年目群)と2007年に開始した患者(2年目群)には治療中断例がなく、全例での解析であった。2005年に開始した患者(4年目群または3年終了群)には合計6例の脱落例があった。2例は遠方転

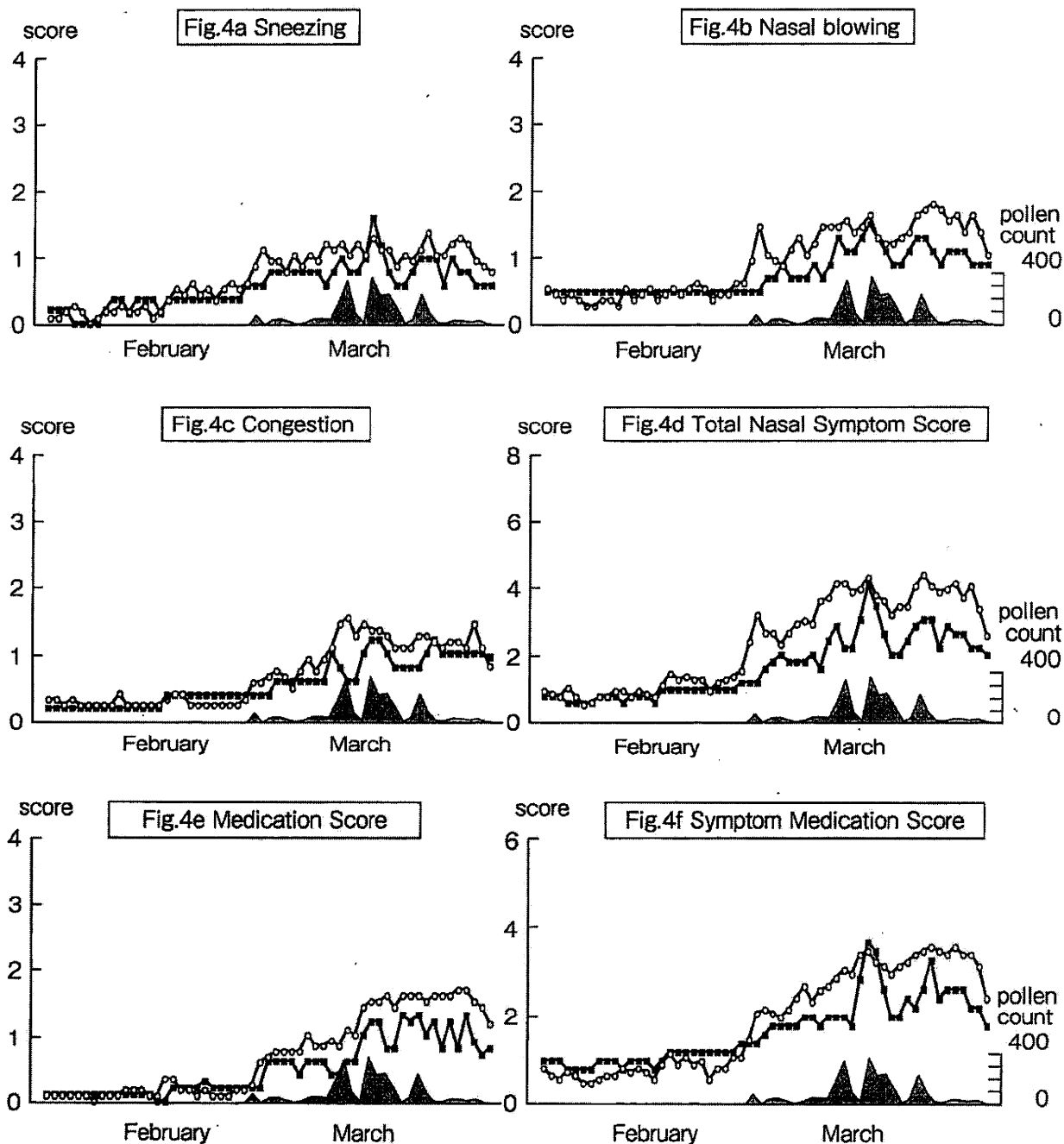


Fig. 4a-f Clinical results in 2008 in patients studied in figure 2.

All patients compared in figure 2 were checked their scores in 2008, when they all were treated by SLIT for three years, in order to avoid a study bias.

○: Patients, who finished SLIT at the third year and did not received SLIT at the fourth year (n = 12), ■: patients who received at the fourth year (n = 5).

居のために通院不可能となり、2例は妊娠のため中止となった。残りの2例は3年目から来院して

おらず、理由は不明であるが、少なくとも治療した最初の2年間の臨床症状を症状日記から検討す

ると、効果不十分例ではなかった。この理由から脱落例は結果に反映していないと推測した。今回の検討では、2006年に新しく治療を開始した例がないため3年目群がないが、我々のこれまでの皮下免疫療法の治療経験では、3年目以上続けると効果の上乗せが少ない印象があり、舌下免疫療法でも3年目以降に細かい年数毎で検討を行う意義は少ないかもしれない。しかし、スギ花粉症の舌下免疫療法が皮下免疫療法と全く同じ経緯をたどるとは限らない。何年程度の治療期間で効果がプラトーに達するかの検討も今後さらに必要と考える。また、今回の検討年のようにスギ花粉が大量に飛散すると舌下免疫療法の効果にも大きな影響があり、スギ花粉の中等度飛散年や少量飛散年で検討すると異なる結果が出る可能性もあると考えている。

スギ花粉症の自然治癒は少なく、スギ花粉症患者は毎年のように抗ヒスタミン薬などの薬物治療を繰り返し、多数例でほぼ永年の治療を必要とする。皮下免疫療法で数年間以上の治療を継続すると、治療を中止した後も効果が長く持続するとされる。奥田<sup>10)</sup>やDurhamら<sup>11)</sup>は、3年間の皮下免疫療法を行うとその効果は長く継続すると報告している。また、舌下免疫療法には大量のアレルゲンが必要であり、皮下免疫療法よりも高額な医療費が見込まれるため、可能であれば皮下免疫療法で示されたように短時間で免疫寛容に導いて治療を終了できることが望まれる。そこで、今回、2009年の4年目も舌下免疫療法をおこなった4年目群と、3年間の舌下免疫療法を終了して2009年の4年目に舌下免疫療法を行わなかった3年終了群と比較した(Fig. 2a-f)。両群は同じ年に舌下免疫療法を開始し、2008年まで3年間の継続治療を行った。4年目の振り分けは前向き研究ではなく、3年で治療を終了できる皮下免疫療法の報告を説明し、さらに、舌下免疫療法では皮下免疫療法のような3年の治療で効果が継続するという検討がされていないことを説明の上、4年目の治療を継続するか否かについて患者自身が選択した。従って、効果の高かった例が治療を継続したバイアスの可能性があった。そのため、両群を振り分ける前年

である3年目の臨床効果を検討したが、その効果に差がなく、両群の背景にバイアスはないと考えられた(Fig. 4a-f)。4年目治群の例数が少ないものの薬物症状スコア(Fig. 2f 舌下免疫療法の薬物スコアを算定しない場合)が有意に小さくなっており、3年で終了せずに4年目も治療を継続することがよいと考えられた。また、各症状スコアに有意な差はなかったが、特に鼻汁スコアや鼻閉スコアで花粉飛散が続くと差が開いており、4年目群の例数が多いければ差がでた可能性も考えられた。いずれの結果においても4年目群の例数が少ないため、結論には今後さらなる検討が必要である。一方で、舌下免疫療法の薬物スコアを算定した場合(Fig. 3a, b)での薬物スコアと症状薬物スコアにスギ花粉飛散期での差が無かったが、少なくとも抗ヒスタミン薬などの併用薬剤を少なくできると考えられ、舌下免疫療法維持期の薬物スコアは1点程度が妥当なスコアかもしれない。ただし、これらの点についても上述同様に今回の検討が大量飛散年であることから異なる飛散年での検討も必要かと考えられる。4年目の治療を継続するほうが良いと考えられた我々の結果が、奥田ら<sup>10)</sup>の皮下免疫療法での報告と異なる結果になった背景として、我々は本法での舌下免疫療法の臨床効果が皮下免疫療法には及ばないと考えており、同時に免疫応答もまだ完全でない可能性があると考えられる。その大きな理由に舌下免疫療法のアレルゲン量に原因があると考えている。我々の行っている舌下免疫療法で投与しているアレルゲン維持量は皮下免疫療法のアレルゲン維持量の5倍程度である。舌下免疫療法ではアレルゲン高用量投与(皮下免疫療法の100倍以上)のほうが低容量投与(3~5倍投与)よりも効果が高いとされる<sup>14)15)</sup>。もっと多くのアレルゲンを投与できれば、皮下免疫療法のように治療終了後も長期に症状を軽快させることができた可能性が考えられる。従って、現状よりも高濃度アレルゲンの治療液が望まれるが、現状のスギ花粉症の治療用アレルゲンエキスの精製にあたっては、高濃度ではスギ花粉が非常に粘稠となり製造が困難とされ、より高濃度の投与ができない現状となっている。3年で終了でき

ないとなると、どれくらい継続するか検討が必要であり、今後の課題となった。

今回の結果では、4年目の舌下免疫療法も行う方が良いという結果だが、全例に舌下免疫療法を永年に行う必要はないと考える。その理由として、舌下免疫療法の利点に再治療の容易さがあげられる。皮下注射の場合は治療を一度中止して、後年に再開する場合には再度低濃度から毎週の皮下注射を約6カ月間行う必要がある。一方、舌下免疫療法は在宅で約4週間投与を行えば良く、再治療時の利便性が高く、患者負担が軽い。その点を考慮すると、舌下免疫療法ではある年数で効果が維持した例では一度治療を中止し、再度症状が現れば、その翌年に治療を再開するという治療計画も考えられる。我々は、舌下免疫療法を終了して、再度開始した例を経験していないが、今後適応があればその経過も観察したい。

最後に、本比較はプラセボを用いた二重盲検試験ではなく、症例数も少ない。また、評価項目が鼻症状と薬剤点数のみであるので、十分なエビデンスを得るにはさらなる前向きな検討が必要である。舌下免疫療法は、まだ保険認可の無い治療であり、独自の検討では限界があり、我々の結果も参考とした大規模研究が計画されることに期待したい。

本研究は、文部科学省科学研究費(18591865)および厚生労働省科学研究費(H20-免疫一般-003)の助成を受けている。

## 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—. 改定第6版. 東京: ライフ・サイエンス; 2009.
- 3) 湯田厚司. スギ花粉症の免疫療法. *アレルギーの臨床* 2008; 28: 51-7.
- 4) 山本美紀, 岡野光博, 服部 央, 菅田裕士, 松本理恵, 藤原田鶴子, 他. スギ特異的免疫療法の有効性 JRQLQによる検討. *耳鼻免疫アレルギー* 2007; 25: 126-7.
- 5) 大橋淑宏. スギ花粉症に対する免疫療法. *アレルギー* 2008; 57: 519-23.
- 6) 湯田厚司, 宮本由起子, 服部玲子, 荻原仁美, 竹内万彦, 間島雄一. 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* 2007; 56: 1366-71.
- 7) 湯田厚司, 荻原仁美. スギ花粉症の皮下免疫療法と舌下免疫療法. *アレルギーの臨床* 2009; 29: 136-41.
- 8) 湯田厚司, 宮本由起子, 荻原仁美. 花粉症の舌下免疫療法. *Mebio* 2010; 27: 42-9.
- 9) 荻原仁美, 湯田厚司, 宮本由起子, 白井智子, 竹内万彦. スギ花粉症に対する免疫療法の治療成績. *耳鼻臨床* 2010; 103: 215-20.
- 10) 奥田 稔. スギ花粉症の長期予後. *アレルギー* 2006; 55: 655-61.
- 11) Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 1999; 341: 468-75.
- 12) Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. WHO position paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998; 53 (suppl): 1-42.
- 13) Okubo K, Gotoh 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: 265-75.
- 14) Passalacqua G, Guerra L, Compalati E, Fumagalli F, Cirillo A, Canonica GW. New insights in sublingual immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006; 6: 407-12.
- 15) Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update. *Allergy* 2008; 86: 101-2.

THE ENHANCED CLINICAL EFFICACY BY TREATED YEARS AND THE SUSTAINED  
EFFICACY AFTER TREATMENT OF SUBLINGUAL IMMUNOTHERAPY  
FOR JAPANESE CEDAR POLLINOSIS

Atsushi Yuta<sup>1)</sup>, Hitomi Ogihara<sup>1)</sup>, Yukiko Miyamoto<sup>1)</sup>,  
Kazuhiko Takeuchi<sup>1)</sup> and Kimihiro Okubo<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>*Department of Otorhinolaryngology, Mie University Graduate School of Medicine*

<sup>2)</sup>*Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School*

**Background:** Although sublingual immunotherapy (SLIT) is hopeful therapy for seasonal allergic rhinitis by Japanese cedar pollen, there are many issues to study. We studied the adding effects on clinical efficacy by the treated years and sustained efficacy 1 year after a 3-year period of SLIT.

**Methods:** Clinical efficacy of SLIT in patients with Japanese cedar pollinosis treated for different years of 1 year (n = 7), 2 years (n = 18) or 4 years (n = 5) were compared in 2009. Patients, who finished SLIT after a 3-year period and did not received SLIT at the fourth year (n = 12), was also compared with those who received SLIT at the fourth year (n = 5).

**Results:** By adding treated year, clinical efficacy of sneezing, rhinorrhea and congestion became better, and symptom-medication score (SMS) was significantly better in the fourth year of SLIT. Patients with the fourth year of SLIT showed better SMS compared with those who finished at the third year.

**Conclusion:** Consecutive treatment of SLIT showed better efficacy. Although it was recommended to continue SLIT therapy at least four years, it needed further study because of small number of patients.

## スギ花粉症の舌下免疫療法と IL-10 産生性誘導型制御性 T 細胞による作用機序

湯田 厚司<sup>1)</sup>, 山中 恵一<sup>2)</sup>, 大久保公裕<sup>3)</sup><sup>1)</sup> 三重大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科<sup>2)</sup> 三重大学大学院医学系研究科皮膚科<sup>3)</sup> 日本医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

## Clinical efficacy and immunological responses by IL-10 producible induced regulatory T cells in sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis

Atsushi Yuta<sup>1)</sup>, Kei-ichi Yamanaka<sup>2)</sup>, Kimihiro Okubo<sup>3)</sup><sup>1)</sup> Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Mie University Graduate School of Medicine<sup>2)</sup> Department of Dermatology, Mie University Graduate School of Medicine<sup>3)</sup> Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Nippon Medical School

## ABSTRACT

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 recently begun in Japan. We made a clinical trial of SLIT for more than hundred patients.

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 mechanism of immunotherapy is still unclear in both SCIT and SLIT. Regulatory T cells modify immunological response in allergy, but natural regulatory T cells in peripheral blood were not changed by SLIT in our study. We focused on the induced type 1 regulatory T cell (Tr1), which was positive for CD4 and CD25 with negative fox p3 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. IL-10 from Tr1 may prove to be a key to the immunotherapy mechanism.

**Key words:** sublingual immunotherapy, regulatory T cell, Type 1 regulatory T cell, IL-10

スギ花粉症に対する薬物療法は良く整備され、異なる薬効を有する薬剤や安全性と高い効果を併せ持つ抗ヒスタミン薬の発売がされるとともに、初期療法のエビデンスも構築された。しかし、現状の薬物療法でスギ花粉症の自然史を変えることはできず、根治療法ではない対症療法となる。

皮下免疫療法は一部のスギ花粉症を根治でき、薬物療法よりも高い臨床効果を有する<sup>1)2)</sup>。

免疫療法の歴史は古く、本邦では1964年に初めてハウスダストワクチンが発売され、第一世代抗ヒスタミンであるマレイン酸クロルフェミラミンとほぼ同時期の発売となる。スギ花粉ワクチンはハウスダストに遅れて1969年に発売され、アレルギー量が標準化された標準化アレルギー治療エキス「トリイ」スギ花粉が2000年に発売された。ハウスダストワクチンはダニアレルギーを標的とするが、不純物を混じえるため本邦でのみ使用されており、世界的にはダニワクチンが使用されている。本邦ではダニワクチ

2010年8月16日受稿

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



ンの発売はなく、ハウスダストワケチンのダニアレルゲン量は未だ標準化されていない。

効果の高い皮下免疫療法が多くの例に導入されれば良いが、皮下免疫療法の持つ問題点も多く、現実にはあまり普及していない。皮下免疫療法の問題点としてあげられるのは、注射時の痛み、頻回の通院、稀ながらのアナフィラキシーを含む副反応である。これらの問題点を解決する手段として舌下免疫療法が考えられた。アレルギー性鼻炎の舌下免疫療法は南欧を中心に発展し、欧州では舌下免疫療法が皮下免疫療法に替わって主流となっている。舌下免疫療法は世界保健機構 (WHO) でもアレルギー性鼻炎に推奨されている<sup>9)</sup>が、残念ながら本邦での認可は受けていない。最近、多くの国で舌下免疫療法が認可され、韓国や中国などでもダニアレルゲンの舌下免疫療法が開始されており、本邦での整備の遅れが明らかである。本邦に特有なスギ花粉症の舌下免疫療法は、臨床研究として 2003 年に Gotoh と Okubo ら<sup>9)</sup>により開始され、皮下注射用のスギ花粉ワケチンを流用されている。その後限られた施設で臨床検討されており、我々も 2005 年よりスギ花粉症の舌下免疫療法を開始し<sup>9)</sup>、100 例を超える例に行ってきた。

Noon<sup>7)</sup>が枯草熱に対して免疫療法を初めて行ってから 100 年が経過したが、作用機序は完全に解明されていない。Th1/Th2 理論により末梢血 Th2 型リンパ球が Th1 型にシフトすることが機序の一つと考えられていたが、最近では Th1 と Th2 をともに制御する制御性 T 細胞の関与が考えられ

ている。加えて、制御性 T 細胞から放出されるサイトカインの関与も示唆されるが、根拠を明確に示す報告はない。

本稿では、これまで我々が行ってきたスギ花粉症に対する舌下免疫療法の成績と特徴を述べるとともに、最近解析しえた制御性 T リンパ球の変化を概説する。

### スギ花粉症に対する舌下免疫療法の臨床効果

舌下免疫療法は皮下免疫療法に替わる期待の高い治療であるが、スギ花粉症では過度の期待はできない。スギ花粉が中等度飛散した 2008 年に初期療法、舌下免疫療法、皮下免疫療法の臨床効果を鼻アレルギー診療ガイドライン (2005 年版)<sup>9)</sup>に準じてスギ花粉飛散期の毎日の症状スコアと薬物スコアで比較検討した (図 1)<sup>9)</sup>。くしゃみ、鼻汁、鼻閉は花粉飛散とともに出現したが、初期療法に比べると良好であった。しかし、皮下免疫療法と比較すると、その臨床効果は劣っていた。皮下免疫療法と同等以上の効果を期待することはできないが、初期療法より良好であったことに価値があると思われる。海外では、舌下免疫療法が皮下免疫療法と同等に効果があったとする報告と、否定的な報告が混在する<sup>10)</sup>。舌下免疫療法は併用薬を少なくできる利点があり、花粉飛散期の併用薬は皮下免疫療法と同程度に少なく、初期療法よりも良好であった (図 1)<sup>9)</sup>。舌下免疫療法は利便性が良く、安全に行えるため、適切な薬物を併用してより効果を高めることも必要である。

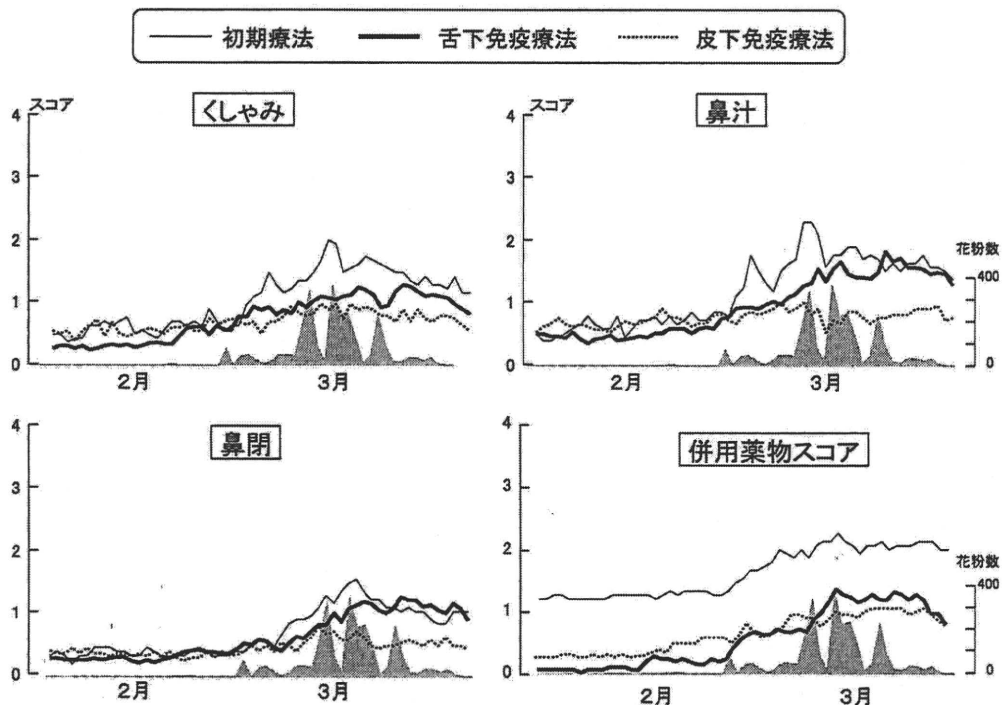


図 1 初期療法・舌下免疫療法・皮下免疫療法の臨床症状スコアと併用薬のスコア。スコア判定は鼻アレルギー診療ガイドライン<sup>9)</sup>による。免疫療法の維持期の薬物スコアは便宜的に加えていない。

皮下免疫療法では治療を継続することにより効果が高まる。治療開始初年度よりも2年目、3年目で効果が高くなる<sup>1)</sup>。舌下免疫療法でも同様の効果があるかを検討したが、同様に1年目よりも2年目以降で効果の上乗せが期待できた(図2)。皮下免疫療法では3年から5年間治療を継続すれば、治療を終了しても効果が持続すると報告<sup>11)12)</sup>されているが、スギ花粉症の舌下免疫療法を開始して長期の経過を検討できていないため、どれくらいの期間で治療を継続すれば良いかの結論は出ていない。

スギ花粉症の舌下免疫療法は保険適応がなく、行うとすれば研究目的か自費診療となる。舌下免疫療法に必要なアレルゲン量は皮下免疫療法よりも多い。海外でのメタアナリシスでは、低容量使用群(皮下免疫療法の3~5倍)では高容量使用群(皮下免疫療法の100倍以上)よりも効果が低くなるとされる<sup>13)</sup>。皮下免疫療法のワクチンを流用している我々の方法は低容量群にあたり、高濃度なアレルゲンの開発が必要となり、大きな課題である。

制御性 T 細胞を介した舌下免疫療法の機序の検討

1) 舌下免疫療法と制御性 T 細胞

アレルギーの病態制御に制御性 T 細胞の関与<sup>14)</sup>が注目されているが、免疫療法では未だに完全には証明されていない。我々は舌下免疫療法を行った患者で fork head p3 (Fox p3) 陽性 CD4 陽性 CD25 強陽性を示す制御性 T 細胞 (natural regulatory T cell; n-Treg) の検討をおこなった。健康人、未治療スギ花粉症、舌下免疫療法施行例の3群から末梢血を採取して単核球を分離し、フローサイトメトリーで CD4 陽性細胞における n-Treg の割合を検討した。3群間では n-Treg の割合に差がなく、n-Treg の関与は否定的であった(図3)<sup>15)</sup>。

2) 舌下免疫療法による誘導性制御性 T 細胞の誘導

制御性 T 細胞 (n-Treg) は胸腺でナイーブ T 細胞から分化誘導されるが、最近末梢血でも制御性 T 細胞が分化誘導されることがわかった(図4)。何らかの外因により誘導

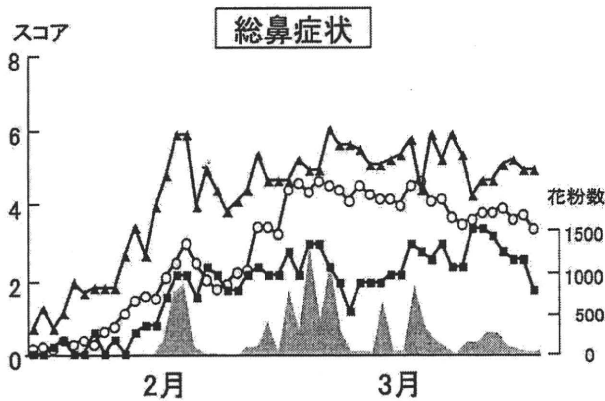


図2 舌下免疫療法の治療年数と総鼻症状(くしゃみ・鼻汁・鼻閉の総和)スコア。花粉飛散期のスコアは治療年数が多いほど良好であった。▲:治療1年目, ○:治療2年目, ■:治療3年以上

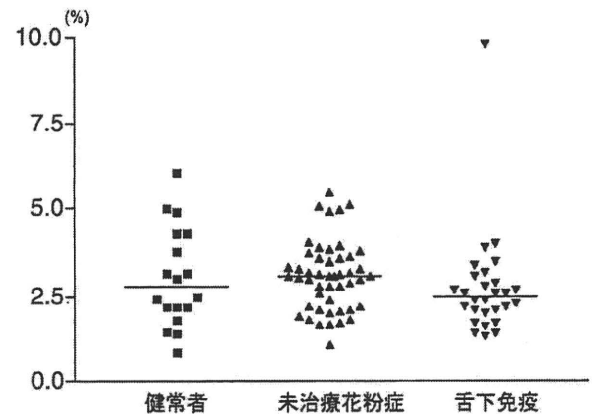


図3 制御性 T リンパ球 (n-Treg) の CD4 陽性 T リンパ球に占める割合。3群間で有意差はない(文献15を和訳改変)。

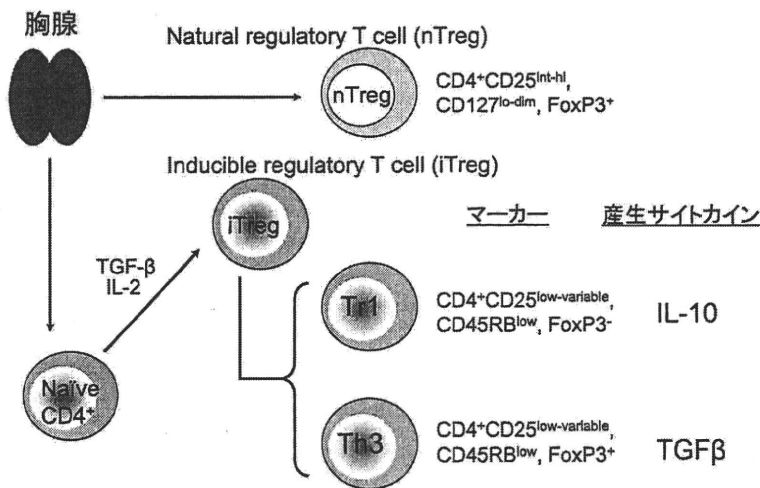


図4 制御性 T 細胞の分類と特徴

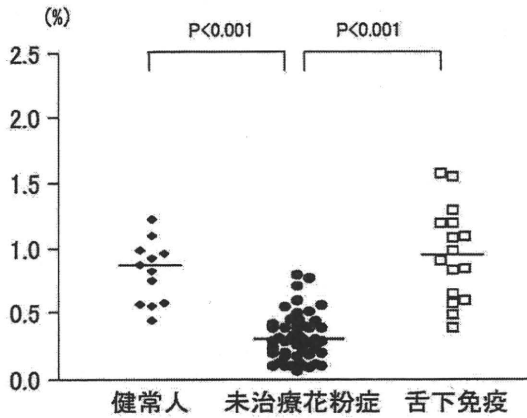


図5 IL-10 産生性誘導型制御性 T リンパ球 (type 1 regulatory T cell: Tr1) の CD4 陽性 T リンパ球に占める割合。健康人に比して未治療花粉症で低下するが、舌下免疫例では健康人と同等であった (文献 15 を和訳改変)。

されることから誘導性制御性 T 細胞 (inducible regulatory T cell; i-Treg) とよばれ, fox p3 陰性の type 1 regulatory T cell (Tr1) と fox p3 陽性の Th3 が発見されている。Tr1 は IL-10 を強く産生放出し, Th3 は TGF- $\beta$  を産生する<sup>19)</sup>。アレルギーの病態において IL-10 が免疫寛容に大きく関わると考えられているため、我々は IL-10 を産生する Tr1 に着目して検討を行ってきた。血清中の IL-10 は微量であり、サイトカイン自体の変化を検討しにくいので、末梢血から CD4 陽性 T リンパ球を分離し、フローサイトメトリーで CD4 陽性 T リンパ球における IL-10 産生性 Tr1 の比率を検討した。未治療スギ花粉症では Tr1 比率が健康人より優位に低かったが、舌下免疫療法施行例では健康人と差がなくなっていた (図 5)<sup>19)</sup>。舌下免疫療法で Tr1 が誘導されたと推測される。

舌下免疫療法により IL-10 産生性 Tr1 が増加していると考えられるが、スギ抗原による T リンパ球を介して IL-10 が免疫寛容に関与しているかを証明する必要がある。スギ花粉主要抗原である Cry j 1 と Cry j 2 で T リンパ球を刺激した際の細胞増殖能力測定試験 (proliferation test) で、舌下免疫療法例での T 細胞分化能が抑制されているが、抗 IL-10 抗体または抗 IL-10 受容体抗体を添加すると T 細胞分化能が増加していた (図 6)<sup>19)</sup>。従って、IL-10 が T 細胞分化能抑制に大きく関わっていることが示された。これらの結果から、スギ花粉症では低下していた IL-10 産生性 Tr1 の割合が舌下免疫療法により増加し、スギ花粉抗原刺激による抗原特異的 T 細胞分化が IL-10 により抑制される可能性が考えられた。

#### おわりに

2010 年春に某社からスギ花粉症の舌下免疫療法の臨床試験計画が発表され、今秋にも開始されようとしている。その概要は未発表であるが、現法よりも高容量アレルゲン

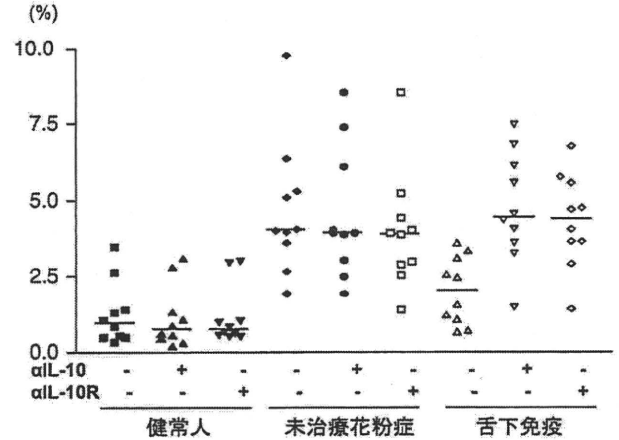


図6 T 細胞細胞増殖能 (スギ花粉抗原刺激) における抗 IL-10 抗体・抗 IL-10 受容体抗体の影響。未治療花粉症はスギ花粉抗原刺激により T 細胞増殖能が増強しているが、舌下免疫例では健康人と差がなくなっている。舌下免疫例に IL-10 抗体または抗 IL-10 受容体抗体を加えると中和され、IL-10 が細胞増殖能力に与する (文献 15 を和訳改変)。

を試みると聞いている。順調に進んでも 4~5 年先の保険適応となるが、期待されている治療であるだけに、大きな期待をしている。

皮下免疫療法でも解決していない問題点も多く、舌下免疫療法の課題も山積みである。保険適応を願うとともに、それまでに 1 つでも解決すべき研究を押し進めたい。

本内容は第 28 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (2010 年 2 月 福井市) の特別枠にて発表した内容である。本研究には、厚生労働省 文部科学省科学研究費の助成をうけている。

#### 文 献

- 1) 萩原仁美, 湯田厚司, 他: スギ花粉症に対する免疫療法の治療成績. 耳鼻臨床 103: 215-220, 2010.
- 2) 湯田厚司: スギ花粉症の免疫療法. アレルギーの臨床 28: 51-57, 2008.
- 3) Bousquet, J., Lockey, R., et al.: Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. J. Allergy Clin. Immunol. 102: 558-562, 1998.
- 4) Gotoh, M., Okubo, K.: Sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. Allergol. Int. 54: 167-171, 2005.
- 5) 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 22: 35-38, 2009.
- 6) 湯田厚司, 服部玲子, 他: 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 25: 124-125, 2007.
- 7) Noon, L.: Prophylactic inoculation against hayfever. Lancet 1: 1572-1573, 1911.
- 8) 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会: 治療 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. ライフ・サイエンス社出版: 32-56, 2005.

- 9) 湯田厚司, 山中恵一, 他: 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—. 日鼻誌 49: 15–21, 2010.
- 10) Frew, A.J.: Sublingual immunotherapy. *N. Engl. J. Med.* 358: 2259–2264, 2008.
- 11) 奥田 稔: スギ花粉症の長期予後. アレルギー 55: 655–661, 2006.
- 12) Durham, S.R., Walker, S.M., et al.: Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N. Engl. J. Med.* 341: 468–475, 1999.
- 13) Passalacqua, G., Guerra, L., et al.: New insights in sublingual immunotherapy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 6: 407–412, 2006.
- 14) Orihara, K., Narita, M., et al.: Circulating Foxp3+CD4+ cell numbers in atopic patients and healthy control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120: 960–962, 2007.
- 15) Yamanaka, K., Yuta, A., et al.: Induction of IL-10-producing regulatory T cells with TCR diversity by epitope-specific immunotherapy in pollinosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124: 842–845, 2009.
- 16) Akdis, M., Akdis, C.: Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119: 780–789, 2007.

## Letter to the Editor

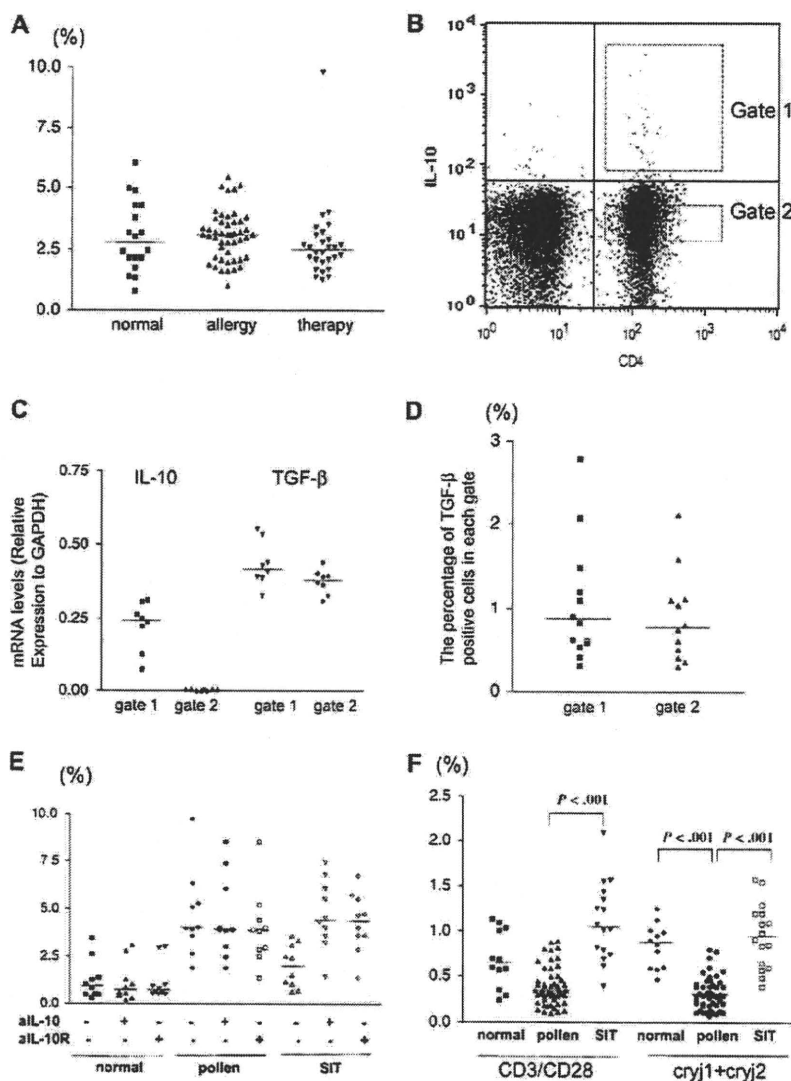
## Induction of IL-10-producing regulatory T cells with TCR diversity by epitope-specific immunotherapy in pollinosis

## To the Editor:

Specific peptide-based allergen immunotherapy is currently being used for several allergic diseases. Immunotherapy for Japanese cedar pollinosis was undertaken using sublingual application of a pool of pollen peptides containing 7 T-cell epitopes from Cry j 1 and Cry j 2, which are the major Japanese

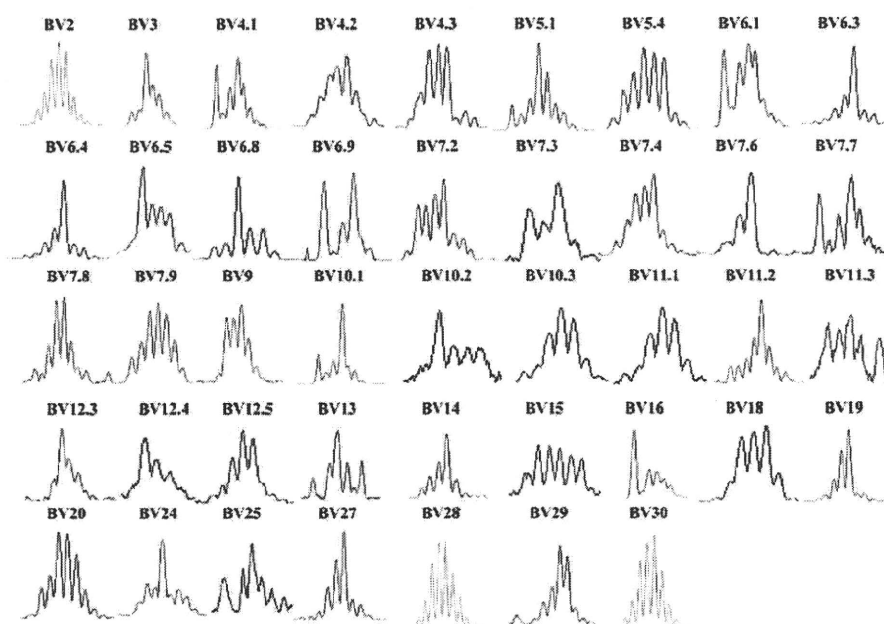
cedar pollen allergens, and its clinical efficacy on seasonal allergic rhinitis was evaluated.<sup>1</sup> Interestingly, some patients undergoing immunotherapy showed reduced sensitivity to other allergens in addition to Japanese cedar pollen. Allergen-specific regulatory T cells have been suggested to play a role in this immunoprotection,<sup>2-5</sup> but the precise mechanism is not fully understood.

IL-10-producing regulatory T cell (Tr1) is one type of acquired regulatory T cells with unclear characteristic phenotypes. In the current study, the Tr1 population percentage was compared



**FIG 1.** A, The percentage of forkhead box P3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>T-cells (naturally occurring regulatory T cells) was unchanged in patients with pollinosis and in those undergoing SIT compared with controls. B, Tr1 (gate 1) and non-Tr1 (gate 2) cells are gated. C, Tr1 cells show equivalent expression of TGF- $\beta$  mRNA compared to non-Tr1 cells, different from that of IL-10. D, When cells were costained with anti-TGF- $\beta$  antibody, the percentage of TGF- $\beta$ -positive cells was similar between Tr1 (gate 1) and non-Tr1 (gate 2). E, CD4<sup>+</sup> lymphocyte proliferation was significantly suppressed in PBMCs from patients who received SIT compared with patients with pollinosis. This suppressive function was abolished by the addition of anti-IL-10 neutralizing antibody or anti-IL-10 receptor antibody. F, The percentage of Tr1 cells was significantly decreased in patients with untreated pollinosis compared with normal controls and increased in patients receiving SIT.

## TCR CDR3 spectratyping BV2~30



**FIG 2.** T-cell receptor complementarity-determining region 3 (CDR3) size spectratyping analysis of a Tr1 population from patients undergoing immunotherapy. A Gaussian distribution of CDR3 lengths was observed in many BV subfamilies, except for oligoclonal expansion in some BV subfamilies, indicating preservation of a highly diverse T-cell receptor repertoire.

among untreated patients with pollen allergy, patients undergoing immunotherapy, and healthy subjects. The results showed that the number of Tr1 cells was significantly increased in patients receiving immunotherapy compared with the other groups. In addition, the diversity of the T-cell receptor repertoire in the Tr1 population from patients undergoing immunotherapy was investigated.

Seventy-five patients from the Departments of Dermatology and Otorhinolaryngology of Mie University Hospital were enrolled (15 patients with pollen allergy receiving sublingual immunotherapy [SIT] as described, and 60 sensitive to Japanese cedar). Thirteen healthy controls were also recruited (see details in this article's Table E1 in the Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Diagnosis was based on clinical symptoms and serological results. Blood was sampled after obtaining written informed consent from all subjects, and the investigational protocol was approved by the Institutional Review Board of Mie University Hospital. Healthy volunteers had no history or subjective symptoms of atopic dermatitis or pollen allergy.

Recent studies have shown a significant decrease of forkhead box P3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>T cells, naturally occurring regulatory T cells in symptomatic patients with atopic dermatitis or bronchial asthma.<sup>6</sup> However, the percentage of naturally occurring regulatory T cells (forkhead box P3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>T cells/CD4<sup>+</sup>T cells) remained unchanged in patients with pollinosis and in those receiving SIT compared with controls (Fig 1, A). In the current study, the IL-10-producing Tr1 cell population was characterized by flow cytometry and cell sorting. PBMCs from patients and normal donors were isolated from heparinized venous blood by density gradient centrifugation using Ficoll (for antibodies and reagents, see Methods in this article's Online Repository).

PBMCs were cultured in RPMI 1640 medium with L-glutamine supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin, and 10% human type AB serum. These cells were stimulated with 100 ng/mL soluble anti-CD3 Ab plus 100 ng/mL anti-CD28 Ab, or 50IU Cry j 1 and Cry j 2, for 8 hours. After culture, cells were collected and incubated with anti-CD4-fluorescein isothiocyanate and phycoerythrin-conjugated IL-10 secretion antibody. Immunophenotypic analysis was performed by using a Becton Dickinson FACScan instrument and cell sorting by using a FACS Aria cell sorter (Becton Dickinson, Mansfield, Mass). The Tr1 population was gated (gate 1) as shown in Fig 1, B. When PBMCs were stimulated with CD3/CD28 antibodies, these 2 sorted populations showed similar expression of TGF- $\beta$  compared with non-Tr1 cells (gate 2) on the basis of quantitative PCR or intracellular staining with anti-TGF- $\beta$  antibody in normal controls (Fig 1, C and D). Subsequently, cellular proliferation was evaluated. PBMCs ( $10^6$ /mL) were first labeled with 10  $\mu$ mol/L Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester and stimulated with Cry j 1 and Cry j 2 as discussed. After 4 days of culture, PBMCs were stained with Peridinin-chlorophyll-protein complex-conjugated anti-CD4 antibody, and the percentage of CD4<sup>+</sup> lymphocyte proliferation was measured. The proliferation was significantly suppressed in patients receiving SIT compared with patients with pollen allergy (Fig 1, E). This suppressive effect was neutralized by the addition of 2  $\mu$ g/mL anti-IL-10 antibody or anti-IL-10 receptor antibody, confirming that the suppression of reactivity against cedar pollen in patients receiving SIT is IL-10-dependent (for the proliferation assay, see Methods in this article's Online Repository). The percentage of circulating Tr1 cells (IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells/CD4<sup>+</sup>T cells) was significantly decreased in untreated patients with allergy compared with

normal controls, and the level was increased in patients receiving SIT compared with untreated patients with allergy (Fig 1, F). This elevation of Tr1 cells in SIT-treated patients was observed when PBMCs were stimulated not only with Cry j 1 and Cry j 2 but also with CD3/CD28 antibodies, and this may be 1 reason why some patients undergoing immunotherapy for Japanese cedar pollen showed reduced sensitivity to other allergens. We also performed phenotypic characterization of the identified Tr1 cells by flow cytometry; interestingly, Tr1 cells showed more skin and gut-homing tendency than the non-Tr1 population (see this article's Fig E1 on the Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).

We next performed complementarity-determining region 3 size spectratyping analysis by using established  $\beta$ -variable primers to investigate the diversity of the T-cell receptor repertoire in the Tr1 populations expanded or changed by immunotherapy.<sup>7,8</sup> Total RNA was extracted from the sorted Tr1 population, and cDNA was prepared as previously reported.<sup>7,8</sup> Fig 2 shows a representative spectratype from Tr1 cells taken from SIT-treated patients. Although the Tr1 population percentage was increased, a Gaussian distribution of complementarity-determining region 3 lengths could be observed in many BV subfamilies examined, except for oligoclonal expansion (2-4 peaks in spectratyping) in some BV subfamilies, indicating preservation of a highly diverse T-cell receptor repertoire (see this article's Fig E2 in the Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org) for spectratypes from other population).

Tr1 cells can be generated in the presence of locally produced IL-10 released from Tr1 cells.<sup>4</sup> Tr1 cells block cellular proliferation not via cell-to-cell contact but via cytokine-mediated mechanisms (eg, IL-10). The results of the current study may explain the mechanism of suppression against multiple allergens induced by epitope-specific immunotherapy in patients with pollinosis. Specific immunotherapy blocks the allergen specific IgE and induces an allergen-specific IgG response, which is induced by IL-10 from Tr1 cells.<sup>2,3</sup>

In conclusion, IL-10-producing Tr1 cells induced by specific immunotherapy play multifunctional roles in suppressing allergic reactions. We have shown here that patients undergoing specific immunotherapy have increased IL-10-producing Tr1 cell populations with high T-cell repertoire diversity, suggesting that this therapy induces tolerance to multiple allergens.

We thank Professor Peter D. Wagner, Division of Physiology, Department of Medicine, University of California, San Diego, for reviewing this article.

Kei-ichi Yamanaka, MD<sup>a\*</sup>  
Aisushi Yuta MD<sup>b\*</sup>  
Masato Kakeda MD<sup>a\*</sup>  
Ryogen Sasaki MD<sup>c</sup>  
Hiroshi Kitagawa, MD<sup>d</sup>  
Esteban C. Gabazza, MD<sup>d</sup>  
Kimihiko Okubo, MD<sup>e</sup>  
Ichiro Kurokawa, MD<sup>e</sup>  
Hitoshi Mizutani, MD<sup>e</sup>

From the Departments of <sup>a</sup>Dermatology, <sup>b</sup>Otorhinolaryngology, <sup>c</sup>Neurology, and <sup>d</sup>Immunology, Mie University Graduate School of Medicine; and <sup>e</sup>the Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School, Kawasaki, Japan. E-mail: [yamake@clin.medic.mie-u.ac.jp](mailto:yamake@clin.medic.mie-u.ac.jp).

\*These authors contributed equally to this work.

Disclosure of potential conflict of interest: A. Yuta receives grants for scientific research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology and the Ministry of Health, Labor and Welfare. K. Okubo is a medical advisor for Kyowa Hakkou Kirin, Zeria Shinyaku, and Meiji Nyugyo and receives grant support from the Ministry of Health, Welfare, and Labor. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

#### REFERENCES

- Horiguchi S, Okamoto Y, Yonekura S, Okawa T, Yamamoto H, Kunii N, et al. A randomized controlled trial of sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;146:76-84.
- Frew AJ. Sublingual immunotherapy. *N Engl J Med* 2008;358:2259-64.
- Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:780-91.
- Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 2006;117:433-42.
- Wu K, Bi Y, Sun K, Wang C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 2007;4:269-75.
- Orihara K, Narita M, Tobe T, Akasawa A, Ohya Y, Matsumoto K, et al. Circulating Foxp3 + CD4+ cell numbers in atopic patients and healthy control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:960-2.
- Yawalkar N, Ferenczi K, Jones DA, Yamanaka K, Suh KY, Sadat S, et al. Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2003;102:4059-66.
- Yamanaka K, Yawalkar N, Jones DA, Hurwitz D, Ferenczi K, Eapen S, et al. Decreased T-cell receptor excision circles in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:5748-55.

doi:10.1016/j.jaci.2009.06.020

## METHODS

### Antibodies and reagents

Ficoll was purchased from Sigma (St Louis, Mo), and the IL-10 secretion assay kit was from Miltenyi Biotec (Auburn, Calif). Cell surface staining buffer contains 0.1 mol/L PBS and 2% FCS (Biowest, Nuaille, France). mAbs to CD4-fluorescein isothiocyanate, CD25-phycoerythrin, and forkhead box P3-phycoerythrin-Cy5 were purchased from eBioscience (San Diego, Calif). Antibody against TGF- $\beta$ -Peridinin-chlorophyll-protein complex was purchased from R&D (Minneapolis, Minn). The cells were stimulated with 100 ng/mL soluble anti-CD3 plus 100 ng/mL soluble anti-CD28 (BD Biosciences, San Jose, Calif), or 50 IU Cry j 1 and Cry j 2 (Torii, Tokyo, Japan). Cells were cultured in a final volume of 200  $\mu$ L RPMI 1640 medium with L-glutamine supplemented with 5 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, Calif), and 10% FCS.

### Real-time quantitative PCR

RNA was isolated by using ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan), according to the manufacturer's instructions. Total RNA 1  $\mu$ g (A260/A280 = 1.7-2.0) was reverse-transcribed with oligo-dT primers and the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) in a final volume of 20  $\mu$ L. Quantitative real-time PCR was performed with a TaqMan by using ABI gene expression assays (Applied Biosystems, Foster City, Calif) according to the manufacturer's instructions. GAPDH was used as a control for cDNA input.

### Proliferation assay

PBMCs ( $10^6$ /mL) were initially labeled with 10  $\mu$ mol/L CFSE and then stimulated with 50 IU Cry j 1 and Cry j 2 with or without 2  $\mu$ g/mL anti-IL-10 neutralizing antibody or anti-IL-10 receptor antibody (R&D) for 4 days. PBMCs were collected and stained with CD4-PerCP antibody (BioLegend, San Diego, Calif). Cell proliferation was analyzed by a CellQuest flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). The percentage of proliferative cells was

calculated by dividing CD4<sup>+</sup> proliferative lymphocytes by the total number of CD4<sup>+</sup> lymphocytes ( $n = 10$  per each population).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using the Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA test with *post hoc* analysis with the Dunn multiple comparison test. A *P* value less than .05 was considered statistically significant.

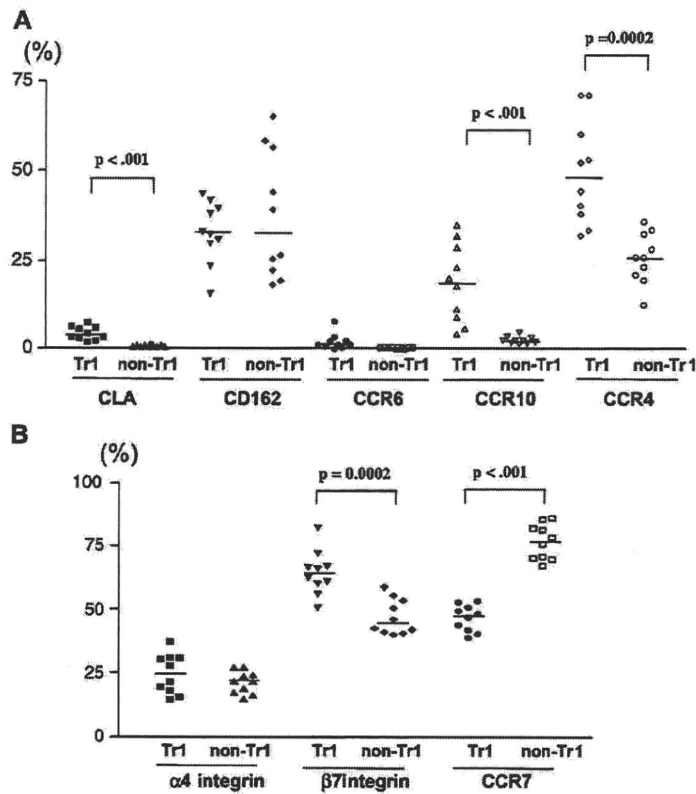
### Complementarity-determining region 3 spectratyping analysis

T-cell receptor BV segments were amplified with 1 of 43 BV subfamily-specific primers and constant-variable primer recognizing both CB1 and CB2 regions. The sequences of BV primers and fluorescent CB primer have been previously described.<sup>E1,E2</sup> PCR products were applied to a 5% polyacrylamide sequencing gel, and the size distribution of each fluorescent PCR product was determined by electrophoresis on an automated 377 DNA sequencer (Applied Biosystems). In this technique, an amplified TCR BV subfamily migrates as a series of bands, each one corresponding to a different complementarity-determining region 3 length separated from one another by 3 nucleotides. Data were analyzed by using the GeneScan software (Applied Biosystems), which assigns a size and peak area to the different PCR products.

### REFERENCES

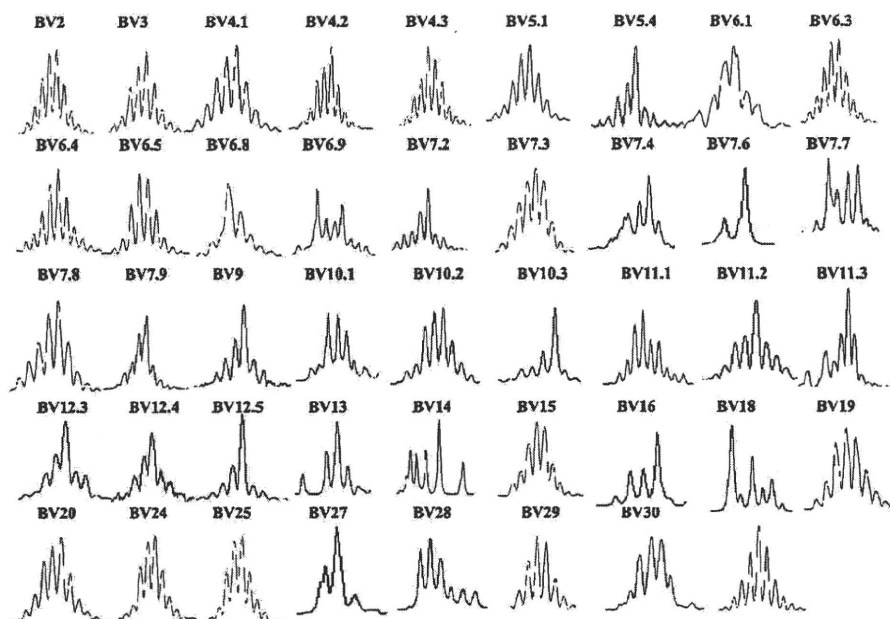
- E1. Yawalkar N, Ferenczi K, Jones DA, Yamanaka K, Suh KY, Sadat S, et al. Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2003;102:4059-66.
- E2. Yamanaka K, Yawalkar N, Jones DA, Hurwitz D, Ferenczi K, Espen S, et al. Decreased T-cell receptor excision circles in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:5748-55.
- E3. Okubo K, Gotoh 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;57:265-75.



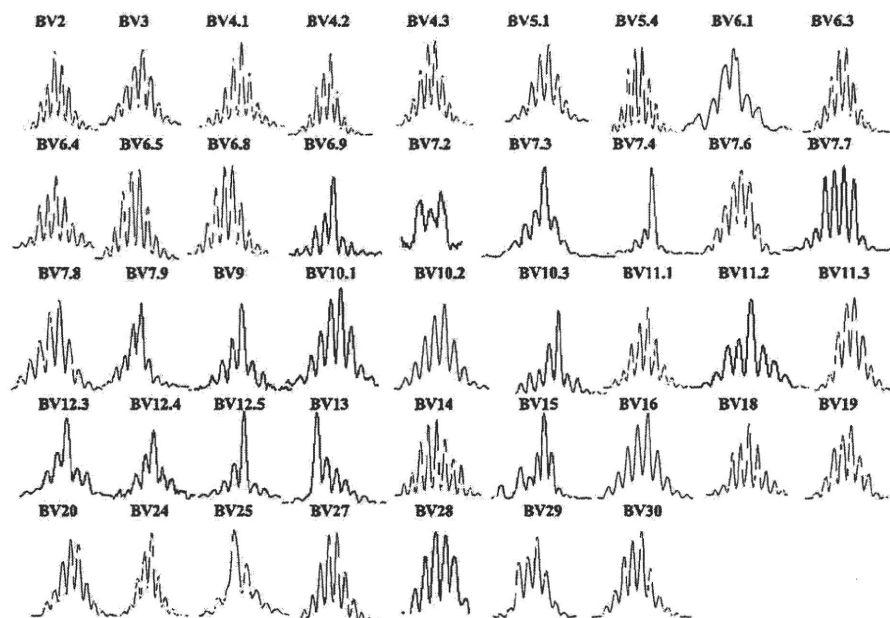


**FIG E1.** Phenotypic characterization of identified Tr1 cells. CD4<sup>+</sup> T cells were purified from normal PBMCs and cultured with CD3/CD28 antibodies for 8 hours as described in the text. We analyzed the expression levels of skin-homing receptors and chemokine receptors (cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA), a sialyl Lewis<sup>x</sup>-related epitope expressed on P-selectin glycoprotein ligand 1, CCR6, CCR10, and CCR4), as well as gut ( $\alpha 4$  and  $\beta 7$  integrins) and lymph node (CCR7)-homing receptors on CD4<sup>+</sup> T cells. Levels of the skin-homing markers CLA, CCR10, and CCR4 were elevated in the Tr1 population compared with the non-Tr1 population. The expression level of  $\beta 7$  integrin was also increased in the Tr1 population, but the levels of the lymph node marker CCR7 were decreased ( $n = 10$ , Mann-Whitney test).

## Non-Tr1 from SIT-patient 1 TCR CDR3 spectratyping BV2-30

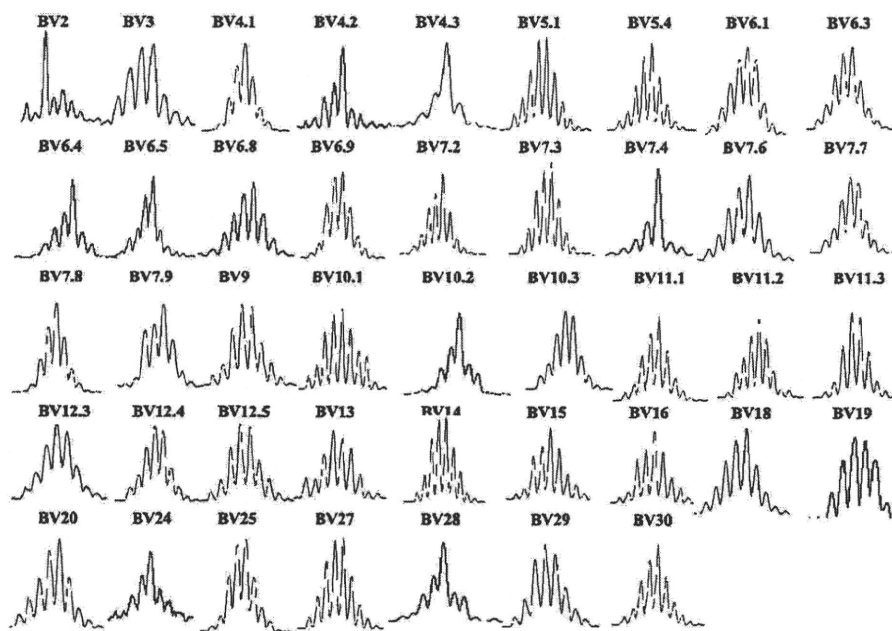


## Tr1 from SIT-patient 2 TCR CDR3 spectratyping BV2-30



**FIG E2.** T-cell receptor complementarity-determining region 3 (CDR3) size spectratyping analysis of Tr1 or non Tr1-population from SIT-patient, pollen allergy-patient, or normal control.

## Non-Tr1 from SIT-patient 2 TCR CDR3 spectratyping BV2~30



## Tr1 from pollen allergy-patient TCR CDR3 spectratyping BV2~30

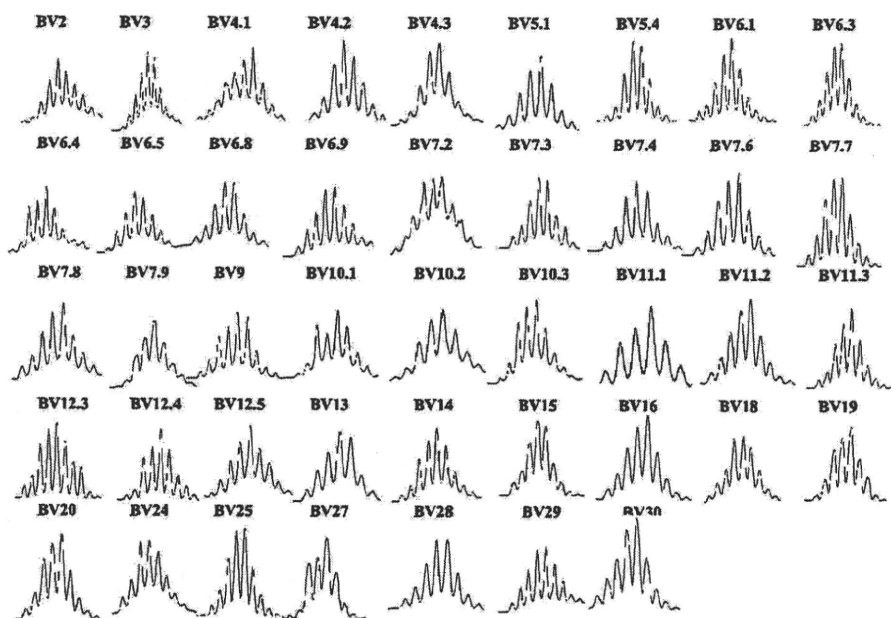
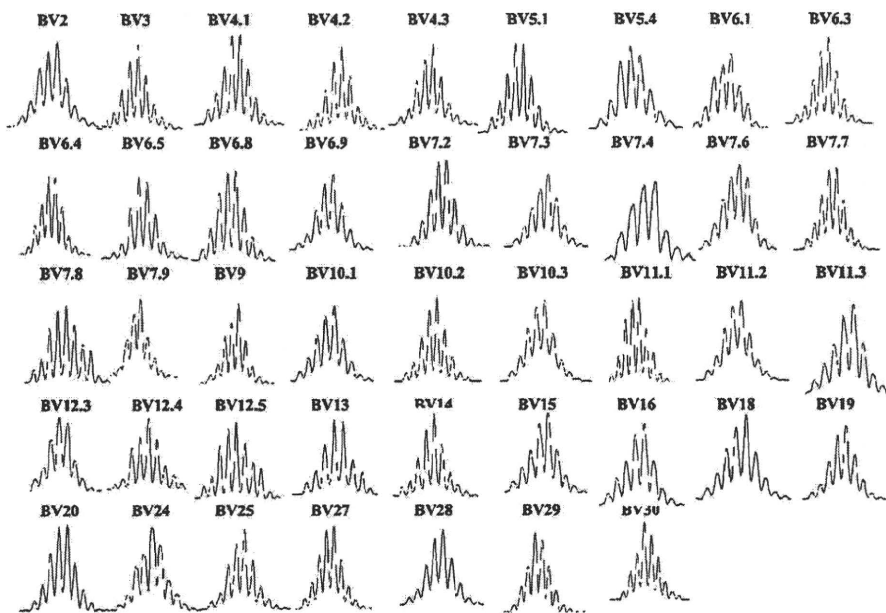


FIG E2. (Continued)

## non-Tr1 from pollen allergy-patient TCR CDR3 spectratyping BV2-30



## Tr1 from normal control TCR CDR3 spectratyping BV2-30

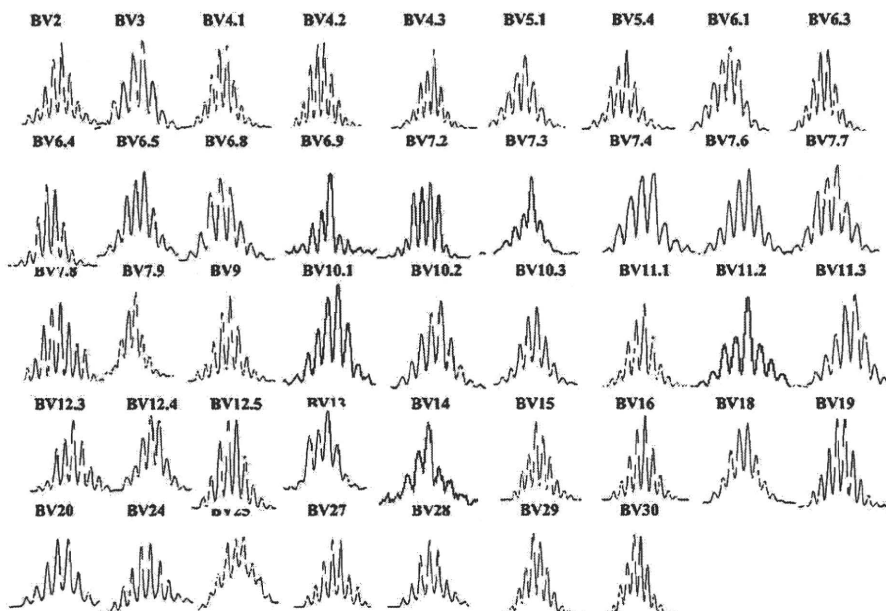


FIG E2. (Continued)