

201126028A

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

免疫療法による花粉症予防と免疫療法の
ガイドライン作成に向けた研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡本 美孝

平成24（2012）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
免疫療法による花粉症予防と免疫療法のガイドライン作成に向けた研究	
岡本 美孝	3
II. 分担研究報告	
1. スギ花粉症発症に関する免疫学的パラメーターの前向き研究	
岡本 美孝	12
2. アレルギー性鼻炎診療に対するアンケート調査と α - galactosylceramide を利用した二次介入の検討	
櫻井 大樹	16
3. スギ花粉症発症に関する遺伝子の同定	
藤枝 重治	18
4. 制御性 T 細胞の免疫療法による変化と感作に関する因子の検討	
竹内 万彦	23
5. 小児科受診患者における代替医療の利用に関する調査	
下条 直樹	24
6. スギ花粉症に対する舌下免疫療法の経年的効果に関する研究	
大久保公裕	27
7. スギ・ヒノキ花粉症に対する皮下免疫療法による予防作用の検討	
岡野 光博	30
III. 研究成果の刊行に関する一覧 33
IV. 研究成果の刊行物・別刷 35

免疫療法による花粉症予防と免疫療法のガイドライン作成に向けた研究

研究代表者 岡本 美孝 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 教授

研究要旨

スギ花粉症に対して免疫療法を用いた早期介入による発症予防効果を検討し、さらに花粉症を含むアレルギー性鼻炎の治療内容、費用、効果、問題点を明らかにして、免疫療法の確立に向けたガイドライン作成に取り組むことを目的に以下の検討を行った。

(1) 舌下免疫療法の介入によるスギ花粉症発症予防の有効性を明らかにするために、約 200 名が参加した 2 重盲検試験が開始された。

(2) スギ花粉症の発症のメカニズムを明らかにするために、スギ花粉感作陽性ながら未発症者を対象に、発症にかかわるパラメーターについての前向き研究を行ったところ、スギ花粉飛散前の sIgE/tIgE は発症予測因子に、花粉曝露による特異的 Th2 細胞のクローンサイズの増加は発症のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

(3) スギ花粉症患者群とコントロール群との間での花粉飛散期の鼻粘膜擦過のマイクロアレイを用いた遺伝子解析から、Intelectin 1 及び Gene X がスギ花粉症の感作・発症に関連する候補遺伝子として同定され、Intelectin 1 は有症状者にのみ発現が高いことより、発症に重要な因子として、Gene X は Intelectin 1 と違い、抗原に対する皮内反応が陽性になる過程で誘導され、感作から発症に至る段階で重要であると考えられた。

(4) 一次感作マウスの検討から、NKT 細胞のリガンドである α -galactosylceramide (GalCer) をパルスした樹状細胞の口腔粘膜下投与は、抗原と同時に投与することで 2 次感作による鼻炎の発症予防が可能であった。IgE 産生の主要な臓器である頸部リンパ節の検討から、IgE へのクラススイッチ抑制作用のある IL-21 の遺伝子発現が有意に上昇していた。

(5) 標準化スギ花粉エキスをを用いた特異的皮下免疫療法を行い 5-6 年経過したスギ花粉症患者 44 例を対象に検討したところ、2 例 (4.9%) に気管支喘息の新規発症がみられたが、新規に通年性鼻炎を合併した患者はおらず、新規の季節性鼻炎を発症したものは 41 例中 2 例 (4.9%) と低値であった。新規に気管支喘息を発症した群と対照群との間に年齢、性、治療前血清総 IgE 量、治療前スギ特異的 IgE 抗体価、維持抗原量、維持期間での有意な差はみられなかった。

(6) 研究班にて作成したアレルギー性鼻炎治療に関して内容、費用、効果などから問題点を問うアンケート用紙を用いて、学校健診、あるいは疫学調査など直接受療と関係なく医療機関を訪れたアレルギー性鼻炎患者を対象に調査を進めたところ、成人患者 212 名、中学生患者 969 名の結果では、治療に対する満足度は、通年性・花粉症とも満足、やや満足を合わせてもその割合が 15~25%にとどまり、治療に対する不満の理由は効果不十分が約半数と最も多く、その他眠気などの副作用、通院の不便さ、費用などであった。今後病院治療に期待する割合は、現在病院治療を受けている割合よりも低く、一方、抗原特異的免疫療法に対して期待する割合 20%程度で、認知率は高いとは言えなかった。

次年度以降は、免疫療法によるスギ花粉症発症の予防効果を明らかにしてワクチン開発を進めるとともに、今年度得られた結果の検証から発症機序を明らかにし、さらに免疫療法のガイドライン作成に向けた取り組みにもつなげる。

研究分担者

藤枝 重治 福井大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教授
竹内 万彦 三重大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科部門 教授
大久保公裕 日本医科大学医学部 耳鼻咽喉科学 教授
下条 直樹 千葉大学大学院医学研究院 小児病態学准教授
岡野 光博 岡山大学大学院医歯総合研究科 耳鼻咽喉科学准教授
櫻井 大樹 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 講師

研究協力者

黒野 裕一 鹿児島大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉科頭頸部外科 教授
増山 敬祐 山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授
米倉 修一 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外助教
山本陸三郎 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科医員
稲嶺 絢子 千葉大学グローバルCOE特任研究員
櫻井 利興 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 医員

坂下 雅之 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学病院
助教
意元 義政 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員
檜垣 貴哉 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉
科・頭頸部外科 医員
森田 慶紀 千葉大学大学院医学研究院小児病態学 大学院
生
増田佐和子 国立病院機構三重大学耳鼻咽喉科 医長
坂井田 寛 三重大学医学部附属病院 助教
荻原 仁美 三重大学医学部附属病院 医員
水谷 仁 三重大学大学院医学系研究科皮膚科 教授
山中 恵一 三重大学大学院医学系研究科皮膚科 講師

A. 研究目的

スギ花粉症は一旦発症すると中高年者を除き自然改善は非常に少ない。発症の予防こそが最大の治療であることは言うまでもないが、これまで、アレルギー疾患の発症予防に対する十分な検討は国外も含めて行われていない。そこで、スギ花粉症に対して早期介入による発症予防を目的とした検討を行う。スギ花粉に感作陽性ながら非発症者は「発症予備軍」として捉えられるが、感作陽性者の小学生では約 70%、青壮年で約 50% に達する。感作陽性者の発症予防の検討、すなわち花粉症発症に対する 2 次介入は、このような感作陽性ながら未発症者を介入の対象として絞り込んで進めれば検討が行いやすいと考えられるものの、これまでこのような 2 次介入の検討は行われていない。花粉症を含めて、アレルギー疾患の自然経過を改善させる可能性を有するのは、現在のところは唯一抗原特異的免疫療法であり、欧米では皮下免疫治療による新規感作予防が科学的エビデンスとして報告されている。但し、2 次介入への検討の報告はない。確かに副作用の発現の危険など患者負担を考慮すると皮下免疫療法での検討は容易ではない。そこでスギ花粉に感作後のスギ花粉症発症を抑制する 2 次介入として、これまでの厚生労働科学研究班で免疫調節作用を有し、安全に投与出来ることを明らかにした、スギ抗原エキスをを用いた舌下免疫療法を中心に検討を行う。加えてアジュバントとして乳酸菌口内崩壊錠、さらに NKT 細胞の活性リガンド糖脂質の口腔内投与の有用性について検討を行う。また、免疫治療の普及に向けて、花粉症治療の実態調査を行う。これまで、医療機関での受診患者の調査やインターネットを利用した治療の調査報告が多いが、当然調査対象者にバイアスがかかり、調査の信頼性が問題となる。インターネットによる調査対象者は一般の患者とは大きな乖離がみられることが、以前の代替医療の厚労省の班研究で明らかであった。そこで、住民検診、学校健診といった調査の参加者の中でアレルギー性鼻炎患者を対象に、現在の花粉症を含むアレルギー性鼻炎の治療内容、費用、効果、問題点を明らかにして、免疫療法の確立に向けたガイドライン作成に取り組む。

B. 方法

- (1) スギ花粉感作陽性でかつ未発症者を対象に、スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の発症予防についての介入試験を、プラセボエキス（溶剤）を対照として 2 重盲検試験により開始した。対象は、スギ花粉に感作され、スギ CAP-RAST スコアが 2 以上の 18 歳以上でこれまでスギ花粉症の発症がなく、かつスギ抗原ディスクを用いた鼻粘膜抗原誘発試験での陰性者とした。12 月 5 日からトリイスギ花粉エキス® 2000 JAU/ml を毎朝 1 日 1 回連日で投与を開始した。投与は平成 24 年 4 月末まで行う。本試験計画は参加各施設の病院治験審査委員会 (IRB) に申請し許可を得て開始された。
- (2) スギ花粉症発症に関する免疫学的パラメーターを明らかにするためにスギ花粉に感作陽性ながらこれまで発症したことが無い成人を対象に前向き検討を行った。スギ花粉シーズン前の 12 月とシーズン後の 5 月に採血を行い、CAP-RAST 以外に総 IgE 値、スギ花粉主要抗原である Cry j 1 特異的 Th2 細胞数を ELISPOT 法により、Cry j 1 特異的制御性 T 細胞数を FACS により解析した。
- (3) アレルギーデータベースからスギ花粉症患者群、感作陽性未発症者群、コントロール群である非アレルギー群を抽出しスギ花粉飛散時期に鼻粘膜を擦過し、抽出した RNA サンプルを用いて Illumina 500GX システム (イルミナ) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。発現変化を認めた遺伝子は定量的 PCR により追認を行った。
- (4) 標準化スギ花粉エキスをを用いた特異的皮下免疫療法を行い 2005 年～2006 年に維持療法を施行したスギ花粉症患者 44 例を対象とした。2011 年 4 月に面接あるいは電話調査を行い、2011 年スギ・ヒノキ花粉飛散期までの 5～6 年間に、①気管支喘息、②通年性鼻炎、③他の季節性鼻炎、を新規に発症したか問診した。
- (5) NKT 細胞免疫系を利用した発症予防治療の可能性を明らかにするために、OVA を抗原としてマウスに腹腔内感作を行った。血中 IgE 値の上昇がみられたが、OVA の点鼻投与に対して鼻症状がみられないことを確認して、 α -GalCer および抗原でパルスしたマウス骨髄由来の樹状細胞を、マウスの口腔底粘膜下に投与した。続いて連日 OVA 抗原の点鼻による 2 次感作を行った後に症状誘発を行い、鼻症状、血中および頸部リンパ節における免疫学的パラメーターについて検討を行った。
- (6) 研究班にて作成したアレルギー性鼻炎治療に関して内容、費用、効果などから問題点を問うアンケート用紙を用いて、学校健診、あるいは疫学調査など直接受療と関係なく医療機関を訪れたアレルギー性鼻炎患者を対象に調査を進めた。調査法、アンケート用紙の内容は千葉大学大学院医学研究院はじめ参加施設の倫理委員会の了解を得た。
- (7) 同様なアンケート調査を千葉市内の 6 カ所の中学校 (総生

徒数 4880 名) に依頼し、毎年全国の学校で行われている保健調査票にて医師からアレルギー性鼻炎の診断を受けている中学生とその保護者を対象に行った。

- (8) スギ花粉症未発症の 53 名につき、スギ特異的 IgE 抗体の測定、アンケートおよび問診により、他のアレルギー疾患の有無、鼻副鼻腔炎の有無、スギ花粉症の家族歴、喫煙の有無、食生活の嗜好、生活環境などを検討因子とし、これらの因子と感作の有無や特異的抗体価との関連について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたり、アンケート調査対象患者、検診対象者には十分な説明を行い了解を得て行われた。小児では保護者から了解を得て行われた。舌下免疫療法を用いた臨床試験の実施にあたっては、厚生労働省の臨床研究に関する指針を遵守して、学内倫理委員会の許可を得た後に十分な説明をして、文書による同意を得た方を対象に実施した。同意の取得にあたっては不参加でも不利益は全く受けないこと、同意後も撤回は可能であることを説明した。使用したスギ花粉エキスについては非常に高額になるため、公正取引委員会へ申請し、許可が得られた後に製造企業より提供を受けた

C. 結果

- (1) 参加 5 大学、協力 2 大学において、舌下免疫療法の介入によるスギ花粉症発症予防の有効性を検討する 2 重盲検試験が開始された。約 200 名が参加しており、平成 24 年 4 月末まで試験は継続される。5 月に鼻粘膜抗原誘発試験により発症の有無を確認する。

- (2) 感作陽性未発症者 33 名が参加した発症の免疫学的な検討では 8 名が翌年の花粉飛散期に初めてスギ花粉症を発症した。発症群と非発症群を比較すると、飛散前のスギ花粉特異的 IgE 抗体値 (sIgE)、総 IgE 値 (tIgE)、ダニに対する感作率に 2 群間に差は認めなかった。飛散後にはいずれの群でもスギ花粉特異的 IgE 値の上昇がみられたが、発症群では非発症群に比較してスギ花粉特異的 IgE 値は有意に高値を示していた。花粉飛散前のスギ花粉特異的 IgE と総 IgE の比 sIgE/tIgE は発症群で非発症群に比較して有意に高値であった。Cry j 1 特異的 IL-4, IL-5, IL-13 産生細胞は花粉飛散前には発症群と非発症群で差は見られなかったが、花粉飛散後には発症群で増加が見られた。非発症群では増加は明らかではなかった。Cry j 1 特異的制御性 T 細胞についてはいずれの群でも花粉飛散前後で有意な変動は無く、また群間での差も明らかではなかった。

- (3) マイクロアレイ解析で、スギ花粉症患者群とコントロール群との間で 10 倍以上の有意な発現変化を認めた遺伝子は 4 遺伝子あり、その中で Intelectin 1 と Gene X で、定量的 PCR でも確認された。Intelectin 1 と Gene X の発現は、コントロール群と比較して感作陽性未発症者に有意な変化は

認めなかった。スギ抗原に対する皮内反応では、スギ花粉症患者群は全員陽性反応を示し、コントロール群では全員陰性を示したが、感作陽性未発症者では 7 名が陽性を示し、6 名が陰性を示した。感作陽性未発症者のうち、皮内反応陽性者 7 名と陰性者 6 名との間には Intelectin 1 の有意な発現変化は認めなかったが、Gene X は陽性者が有意に高い結果を示した。免疫組織化学では Intelectin 1 は鼻粘膜上皮に、Gene X は鼻粘膜上皮及び線維芽細胞に存在がみられ、培養鼻粘膜上皮細胞において Intelectin 1 は IL-4 と IL-13 により、Gene X は papain により誘導されることが判明した。また培養線維芽細胞では Gene X は TNF- α 、IL-33、ヒスタミンで発現が増強することを確認した。

- (4) 卵白アルブミンを抗原としてアジュバントと共に腹腔内に投与した 1 次感作マウスのうち、 α -GalCer と抗原の両方でパルスした樹状細胞を投与した群では鼻への卵白アルブミン投与により発現する症状の有意な改善を非投与マウスに比較して認めた。同群では血中の抗原特異的 IgE 値の低下、頸部リンパ節中のメモリー T 細胞からの IFN- γ 産生増加が有意に認められた。また頸部リンパ節の検討において、IgE へのクラススイッチ抑制作用のある IL-21 の遺伝子発現が有意に上昇していた。

- (5) 免疫療法後の経過観察症例 41 例 (93.2%) が 5 年以上フォローアップできたが、スギ単独免疫療法が 18 例 (43.9%) で残りの 23 例 (56.1%) は複数抗原 (ハウスダスト 7 例、カモガヤ 12 例、ハウスダスト+カモガヤ 3 例、ダニ+ネコ 1 例) による免疫療法を受けていた。フォローアップのできた 41 例のうち、2 例 (4.9%) に気管支喘息の新規発症がみられた。1 例は治療終了 2 年後より運動誘発性喘息を、また別の 1 例は治療中から咳喘息を発症した。他の 39 例 (95.1%) では気管支喘息の新規発症を認めなかった。また新規に通年性鼻炎を合併した患者はおらず、新規の季節性鼻炎を発症したものは 41 例中 2 例 (4.9%) であった。気管支喘息を新規に発症した群と対照群との間に年齢、性、治療前血清総 IgE 量、治療前スギ特異的 IgE 抗体価、維持抗原量、維持期間での有意な差はみられなかった。

- (6) 千葉大学病院に検診で訪れたアレルギー性鼻炎患者を対象に、治療内容に関するアンケートによる調査を行い、通年性 56 名、スギ花粉症 155 名より回答を得た。年齢は 20-70 歳代と比較的広い層にわたった。最近受けた治療は、花粉症患者では病院での治療が 60%以上であったが、通年性では 40%程度で約 45%が無治療であった。治療に対する満足度は、通年性・花粉症とも満足、やや満足を合わせてもその割合が 20%台にとどまり、満足度は決して高くは無かった。治療に対する不満の理由は効果不十分が約半数と最も多く、眠気などの副作用も 40%程度あった。今後希望する治療としては病院治療が花粉症でも 40%程度と低かった。一方、抗原特異的免疫

療法に対しては20%程度であった。

(7) 中学生を対象としたアレルギー性鼻炎に対する治療内容のアンケート調査では、969名の中学生、その保護者から解析可能で、直近1年間にアレルギー性鼻炎の治療のために病院を受診した児は65%、薬局・市販品などで治療薬を購入した児は25%、未治療が20%であった。これまでのアレルギー性鼻炎の治療（主に薬物療法）には半数は不満があると回答し、不満の理由としては、治療効果が乏しい（26.3%）であり、その他、費用（28.5%）や通院が面倒（31.8%）といった理由が多かった。一方、眠気などが困ると答えた児は18%であり、およそアレルギー性鼻炎患者の1/5は薬物の副作用により学校生活に支障を来している可能性がある。今後の希望する治療として病院受診での薬物療法（50%）、一方、健康食品や減感作療法は10%台であった。

(8) スギ花粉症未発症者53名（20歳から60歳まで平均35.1歳）中、18名がスギ特異的IgE陽性であった（陽性率34%）。CAP-RASTスコアが4あるいは5と高値を呈したものは2名であった。スギ花粉症の家族歴の有無と本人の感作との関連は明らかでは無かった。他のアレルギー疾患の罹患の合併は56%に見られた。副鼻腔炎の合併の有無、喫煙の有無、現在の住居環境、幼少時の住居環境、食事の嗜好に関しても感作との関連を調べたがいずれも有意な関連はみいだせなかった。

D. 考察

スギ花粉感作陽性ながら未発症者を対象にスギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法による介入が発症抑制に作用するかどうかを明らかにすべく、7大学が参加してプラセボ投与を対照にした2重盲検試験が開始されたがその結果が注目される。スギ花粉症未発症者を対象にした非介入の前向き検討による発症に関する免疫学的検討では、スギ花粉飛散期前のsIgE/tIgEは発症予測因子に、花粉曝露による特異的Th2細胞のクローンサイズの増加は発症のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。一方、スギ特異的制御性T細胞については発症群、非発症群に差が見られず、発症後にも有意な変化は見られず発症に於ける関与は明らかではなかった。

一方、スギ花粉症の感作・発症に関連する候補遺伝子としてIntelectin 1及びGene Xが同定された。Intelectin 1を誘導するIL-4やIL-13は代表的なTh2サイトカインである。Intelectin 1は有症状者にのみ発現が高いことより、発症に重要な因子であると考えられる。一方Gene XはIntelectin 1と違い、抗原に対する皮内反応が陽性になる過程で誘導され、感作から発症に至る段階で重要であると考えられる。アレルギー炎症を惹起する代表的なproteaseであるpapainによりGene Xが鼻粘膜上皮で誘導されたことは、Gene Xが上皮では抗原に対するprotectorとして関与して

いるとも考えられた。今後は機能解析を進め、Gene Xが発症を抑制する候補因子となりえるか検討を進めていく。

α -GalCerをパルスした樹状細胞の口腔粘膜下投与は、抗原と同時に投与することで抗アレルギー作用を有効に発現させ、特に一次感作マウスの検討から抗原投与による免疫療法による発症予防効果を向上させることが可能であった。これらの症状変化は、局所リンパ節におけるTh1/Th2バランスの改善や、抗原特異的IgE産生の低下に起因する可能性が示唆された。

これまでスギ・ヒノキ花粉症で皮下免疫療法を行った患者の喘息の新規発症率はごく軽度であり、スギ・ヒノキ花粉症に対する免疫療法は喘息の新規発症を予防する効果が期待できることが示唆された。通年性鼻炎の新規発症、他の季節性鼻炎の新規発症についても同様であった。

アレルギー性鼻炎患者に対する治療内容に関するアンケート調査からは、これまで報告されている医療機関での受診患者を対象にした治療、あるいはインターネットを利用した調査に比較して、医療機関、市販薬による治療に対する満足度は低値で、従来の薬物治療の効果を高めるだけでなく、他に免疫療法などの導入の意義が考えられる。ただ、免疫療法そのものについての認知度は一般には高くなく、正しい理解の普及も必要と考えられた。

E. 結論

舌下免疫療法によるスギ花粉症発症に対する2次介入試験が開始された。一方、スギ花粉飛散前のsIgE/tIgEは発症予測因子に、花粉曝露による特異的Th2細胞のクローンサイズの増加は発症のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。また、Intelectin 1とGene Xがスギ花粉症の感作・発症における重要な因子であることが推測された。開始された介入試験で検証を進めその意義を確立する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1、論文発表

1. Fujimura T, Yonekura S, Horiguchi S, Taniguchi Y, Saito A, Yasueda H, Inamine A, Nakayama T, Takemori T, Taniguchi M, Sakaguchi M, and Okamoto Y. Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in two-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis. *Clinical Immunology*. 139:65-74, 2011.
2. Yonekura S, Okamoto Y, Yamasaki K, Horiguchi S, Hanazawa

- T, Matsune S, Kurono Y, Yamada T, Fujieda S, Okano M, Okubo K. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of Ten-Cha (*Rubus suavissimus*) on house dust mite allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx*.38:600-607, 2011.
3. Hisamitsu M, Okamoto Y, Chazono H, Yonekura S, Sakurai D, Horiguchi S, Hanazawa T, Terada N, Konno A, Matsuno Y, Todaka E, Mori O. The influence of environmental exposure to formaldehyde in nasal mucosa of medical students during cadaver dissection. *Allergology International* 60:373-379, 2011.
 4. Imoto Y, Kojima A, Osawa Y, Sunaga H, Fujieda S: Cough reflex induced by capsaicin inhalation in patients with dysphagia. *Acta Otolaryngol.* 131(1):96-100, 2011.1.
 5. Okubo K, Kurono Y, Fujieda S, Ogino S, Uchio E, Odajima H, Takenaka H, Baba K; Japanese Society of Allergology: Japanese guideline for allergic rhinitis. *Allergol Int.* 60(2):171-89, 2011.3.
 6. Matsumoto Y, Noguchi E, Imoto Y, Nanatsue K, Takeshita K, Shibasaki M, Arinami T, Fujieda S: Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int.* 60:87-92, 2011.3.
 7. Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Noguchi E, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M: Variants of C-C motif chemokine 22 (CCL22) are associated with susceptibility to atopic dermatitis: case-control studies. *PLoS One.* 6(11): e26987. 2011.11
 8. Higashino M, Takabayashi T, Takahashi N, Okamoto M, Narita N, Kojima A, Hyo S, Kawata R, Takenaka H, Fujieda S: Interleukin-19 downregulates interleukin -4-induced eotaxin production in human nasal fibroblasts. *Allergol Int.* 60(4):449-57, 2011.12.
 9. Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, saito H, Matsumoto K : Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Geget.* 7:e1002170, 2011.
 10. Yamada T, Jiang X, Kubo S, Sakashita M, Narita N, Yamamoto H, Sunaga H, Fujieda S: B type CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced BLYS expression and production in human tonsillar fibroblasts. *Clin Immunol.* 141:365-71, 2011.12.
 11. Gotoh M, Suzuki H, Okubo K: Delay of onset of symptoms of Japanese cedar pollinosis by treatment with a leukotriene receptor antagonist. *Allergology Int* 60: 483-489, 2011.
 12. Okubo K, Kurono Y, Fujieda S, Ogino S, Uchio E, Odajima H, Takenaka H, Baba K: Japanese guideline for allergic rhinitis. *Allergology Int* 60: 171-189, 2011.
 13. Yonekura S, Okamoto Y, Yamasaki K, Horiguchi S, Hanazawa T, Matsune S, Kurono Y, Yamada T, Fujieda S, Okano M, Okubo K: A randomized double-blind, placebo-controlled study of Ten-Cha (*Rubus suavissimus*) on house dust mite allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx* 38: 600-607, 2011
 14. Fujikura T, Okubo K: Adrenomedulin level in the nasal discharge from allergic rhinitis cohort. *Peptide* 32: 368-373
 15. Okano M, F 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.
 16. 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: 124-131, 2011.
 17. Yonekura S, Okamoto Y, Yamasaki K, Horiguchi S, Hanazawa T, Matsune S, Kurono Y, Yamada T, Fujieda S, Okano M, Okubo K. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of Ten-Cha (*Rubus suavissimus*) on house dust mite allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx* 38: 600-607, 2011.
 18. Yonekura S, Okamoto Y, Sakurai D, Horiguchi S, Konno A. Effect of aging on the natural history of seasonal allergic rhinitis in middle-aged subjects in south Chiba, Japan. *International Archives of Allergy and Immunology.* 157:73-80, 2012.
 19. Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Yonekura S, Shigtoshi H, Shimojo N, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Suzuki Y. Association of the MMP9 gene with childhood cedar pollen sensitization and pollinosis. *J Hum Genet on line publication.* 1-8, 2012.
 20. Uekusa Y, Inamine A, Yonekura S, Horiguchi S, Fujimura T, Sakurai D, Yamamoto H, Hanazawa T, Okamoto Y. Immunological parameters with the development of allergic rhinitis: A preliminary prospective study. *American Journal of Rhinology and Allergy*, 2012. *in press*
 21. Inamine A, Sakurai D, Horiguchi S, Yonekura S, Hanazawa T, Hosokawa H, Matuura-Suzuki A, Nakayama T, Okamoto Y. Sublingual administration of *Lactobacillus paracasei* KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via upregulation of PD-L2 on dendritic cells. *Clinical Immunology*, 2012. *in press*
 22. Yamada T, Saito H, Kimura Y, Kubo S, Sakashita M, Susuki D, Ito Y, Ogi K, Imoto Y, Fujieda S: CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts. *Cytokine.* 57(2):245-50, 2012.2.

23. Makihara S, Okano M, Fujiwara T, Kimura M, Higaki T, Haruna T, Noda Y, Kanai K, Kariya S, Nishizaki K. Early interventional treatment with intranasal mometasone furoate in Japanese cedar/cypress pollinosis: a randomized placebo-controlled trial. *Allergol Int in press*.
24. 岡本美孝. アレルギー性鼻炎における免疫療法, 喘息, 24:42-46, 2011.
25. 岡本美孝. 小児喘息に合併するアレルギー性鼻炎・副鼻腔炎の診断と治療, 小児科, 52:1029-1035, 2011.
26. 岡本美孝. アレルギー疾患の早期治療介入, アレルギー, 60:945-955, 2011.
27. 岡本美孝. 花粉症の舌下免疫療法, 小児内科, 43:1937-1941, 2011.
28. 意元義政, 藤枝重治: スギ花粉症に関する鼻上皮細胞の網羅的遺伝子解析 耳鼻免疫アレルギー 29(3):201-207, 2011.9.
29. 大久保公裕: アレルゲン免疫療法の論理と展望. 呼吸 30: 759-760, 2011
30. 大久保公裕: アレルギー疾患に対する免疫療法の展望. アレルギー免疫 18: 783-787, 2011
31. 大久保公裕: 慢性副鼻腔炎の多様性. アレルギー免疫 18: 1611-1613, 2011
32. 神崎晶, 橋口一弘, 若林健一郎, 藤岡正人, 末松潔親, 大久保公裕: OHIO Chamber におけるスギ・ヒノキ科花粉連続暴露に対するベポタスチンベシル酸塩 OD 錠の効果. 新薬と臨床 60: 2216-2229, 2011.
33. 大久保公裕: アレルギー性鼻炎の現在と未来. 日本医事新報 4530: 74-77, 2011
34. 大久保公裕; スギ花粉症の舌下免疫療法. Medical Practice 28: 742-743, 2011.
35. 増野聡, 大久保公裕: ステロイド点鼻薬の使い方. 呼吸器内科 19: 152-159, 2011.
36. 大久保公裕: アレルギー性鼻炎と気管支喘息の関連 - one airway one disease-. 東京都医師会雑誌 64: 13-18, 2011
37. 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.
38. 岡野光博. スギ花粉飛散後の花粉症. 治療 93: 395-400, 2011.
39. 岡野光博. 耳鼻科における皮下アレルゲン免疫療法. アレルギー・免疫 18: 21-31, 2011
40. 岡野光博. 疾患と病態生理: アレルギー性鼻炎. JOHNS 27: 1227-1233, 2011.
41. 岡野光博. アレルギー性鼻炎に対する薬物療法の展望. アレルギー・免疫 18: 1126-1133, 2011.
42. 岡野光博. 脂質メディエーターと PPAR. JOHNS 27: 1745-1750, 2011.
43. 意元義政, 藤枝重治: 網羅的遺伝子解析によるスギ花粉症発症に関する遺伝子解析 臨床免疫・アレルギー科 57: 39-44, 2012.1.
44. 坂井田 寛, 増田佐和子, 竹内万彦: スギ花粉症未発症者におけるスギ花粉の感作に及ぼす因子の検討. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会誌 (投稿中)
45. 大久保公裕, 奥田稔: インターネットを用いたアレルギー性鼻炎患者に対するアンケート調査. アレルギー・免疫 19(1):113-124, 2012
46. 岡野光博. 代替医療として有効なものに何があるか? JOHNS 28: 85-88, 2012.
47. 岡野光博. ヒノキ花粉症についての知見. アレルギー・免疫 19: 28-35, 2012.

2. 学会発表

1. 稲嶺絢子, 堀口茂俊, 米倉修二, 櫻井大樹, 中山俊憲, 岡本美孝. スギ舌下減感作療法とそのアジュバント開発. 第23回日本アレルギー学会臨床大会, ミニシンポジウム, 千葉, 5月14-15日, 2011.
2. 米倉修二, 岡本美孝. アレルギーマーチの進展予防を目指してアレルギーマーチの実態とその予防の可能性について耳鼻咽喉科の立場から, シンポジウム, 千葉, 5月14-15日, 2011.
3. 櫻井大樹, 米倉修二, 山本陸三朗, 稲嶺絢子, 中山俊憲, 岡本美孝. アレルギー性鼻炎に対する免疫療法, 最新の知見と展望, 第61回日本アレルギー秋季学術大会, シンポジウム, 東京都, 11月10-12日, 2011.
4. 櫻井利興, 稲嶺絢子, 櫻井大樹, 飯沼智久, 石井保之, 中山俊憲, 岡本美孝. α -GalCer パルス DC の口腔粘膜投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明. 第40回日本免疫学術集会, 口頭発表, 千葉, 11月27-29日, 2011.
5. Imoto Y, Fujieda S: Upregulation of Intelectin 1 in nasal epithelial cells during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. Infection and Allergy of the Nose 2011.9. Tokyo, Japan
6. Fujieda S, Sakashita M, Hirota T, Osawa Y, Harada M, Yoshimoto T, Tamari M: Association between genetic variant of interleukin-33 and seasonal allergic rhinitis in the Japanese population. Collegium Oro-Rhio-Laryngologygicum Amicitiae Sacrum 2011.9. Bruges, Belgium
7. Fujieda S: New clinical marker for allergic rhinitis. 14th International Rhinology Society & 30th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose 2011.9. Tokyo, Japan
8. Fujieda S: New therapeutic strategy for allergic rhinitis. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery 2011.12. Kobe, Japan

9. 意元義政、藤枝重治：スギ花粉症に関する鼻上皮細胞も網羅的遺伝子解析 第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2011. 2
10. 意元義政、野口恵美子、有波忠雄、藤枝重治：鼻副鼻腔炎におけるアレルギー性鼻炎関連遺伝子との関連 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011. 11
11. 坂井田 寛、増田佐和子、竹内万彦：スギ花粉症未発症者におけるスギ花粉の感作に及ぼす因子の検討. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2011年：大津
12. 岡野光博. 免疫療法の有用性と限界-スギ花粉症治療の救世主となれるか-. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会, 千葉, 2011年 (シンポジウム)
13. 岡野光博. 小児アレルギー性鼻炎における治療のポイント. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会, 千葉, 2011年.
14. 岡野光博. 免疫療法の有用性と限界-スギ花粉症治療の救世主となれるか-. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会, 千葉, 2011年 (シンポジウム).
15. 岡野光博. 小児アレルギー性鼻炎における治療のポイント. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会, 千葉, 2011年.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1、特許取得

①特願 2011-076653：花粉症ワクチンの治療効果を予測するバイオマーカー：岡本美孝, 稲嶺絢子, 櫻井大樹, 堀口茂俊, 中山俊憲

②特願 2011-213257：情報処理システム、医療情報収集装置、医療情報収集方法、医療情報収集プログラム、申告情報収集方法、申告情報収集プログラム、及び、患者側端末用プログラム：岡本美孝, 米倉修二, 堀口茂俊, 横田匡彦

③藤枝重治、意元義政、野口恵美子、他：スギ花粉症感作・発症と Gene X 遺伝子の関連 (平成 24 年予定)

2、実用新案登録

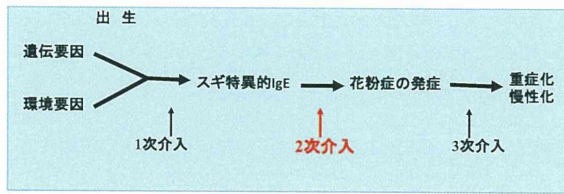
なし

3、その他

なし

図1

スギ花粉症への早期介入



・抗原特異的免疫治療(舌下免疫療法)による2次介入の検討:

舌下免疫ワクチン

多施設共同2重盲検試験; 200名の参加

- ・主要評価項目: スギ花粉飛散後のスギ抗原誘発試験による発症の有無の確認
- ・副次的評価項目: パラメーターの変動

図2

スグトリイエキス®2000JAU: 季節前連日投与 2011年~

参加者: スギ花粉感受陽性だが、2011年まで未発症、スギ抗原誘発陰性 200名を登録

ランダム化: 中央登録 = 1 : 1 の配分、割付け因子は年齢、スギ花粉特異的IgE値

介入: 実薬群・標準化アレルギー治療エキス「スグトリイ」スギ花粉による舌下免疫治療
偽薬群・偽薬(糖剤)による舌下免疫治療

投与方法: Sublingual Spit.連日

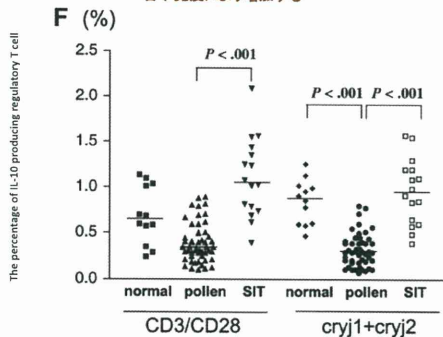
維持量: 2000JAU/回、60,000JAU/月

期間: 2011年12月~2012年4月の9ヶ月間
スギ花粉飛散前後に採血を行い、血清とPBMCを凍結保存。



図3

スギ花粉症発症と免疫治療のパラメーターの検討: IL-10産生抑制性T細胞は未治療の花柳症患者では減少しており、 舌下免疫により増加する



三重大 竹内ら

図4-1

スギ花粉症に関連する遺伝子の同定

マイクロアレイ結果(鼻粘膜擦過細胞): コントロールに対するスギ花粉症患者の遺伝子発現倍率

gene	fold change	q-value	gene	fold change	q-value
Gene A	-7.1	0.030	Gene J	4.3	0.030
Gene B	-4.7	0.024	Gene K	4.3	0.026
Gene C	-4.3	0.038	Gene L	5.5	0.024
Gene D	-4.3	0.038	Gene M	6.3	0.030
Gene E	-4.6	0.023	Gene N	6.6	0.024
Gene F	4.8	0.028	Gene O	15.8	0.026
Gene G	4.8	0.024	Gene P	16.7	0.024
Gene H	4.1	0.023	Intelectin1	17.6	0.024
Gene I	4.1	0.024	Gene R	151.4	0.024

スギ花粉症患者
感受陽性未発症者
感受陰性者

スギ花粉飛散期に鼻粘膜上皮細胞を擦過し、マイクロアレイにて網羅的に遺伝子発現を検討

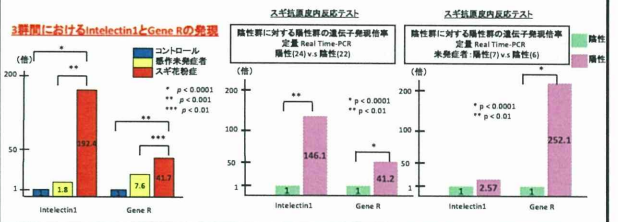
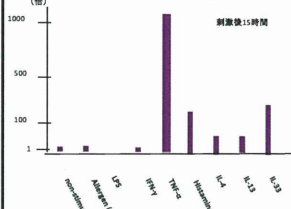


図4-2

Gene R mRNA (線維芽細胞)



【まとめ】

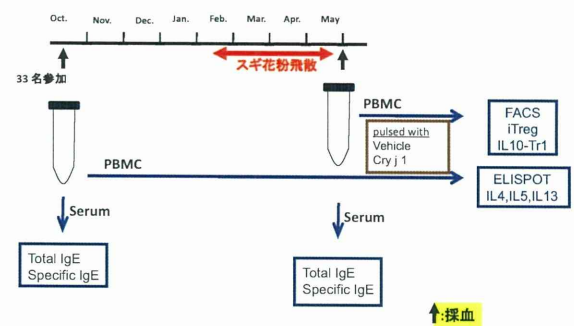
TNF- α 、IL-33、histamine、IL-4、IL-13、スギ抗原は線維芽細胞において、Gene RのmRNAの発現を上昇

Gene Rは鼻粘膜細胞における炎症、Intelectin1は症状(発症)に関連する分子である可能性

福井大: 藤枝ら

図5-1

スギ花粉感受陽性者の発症の免疫パラメーターの検討



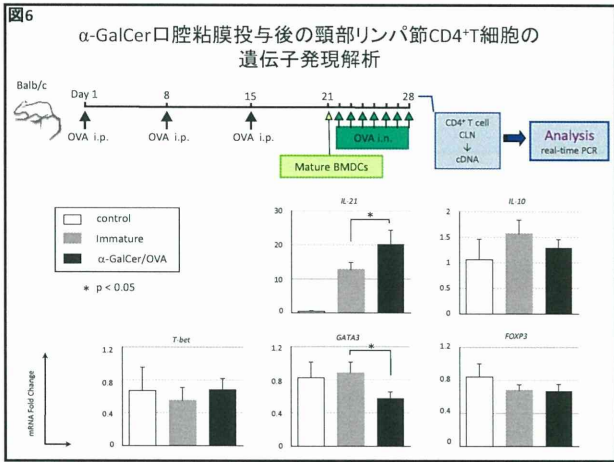
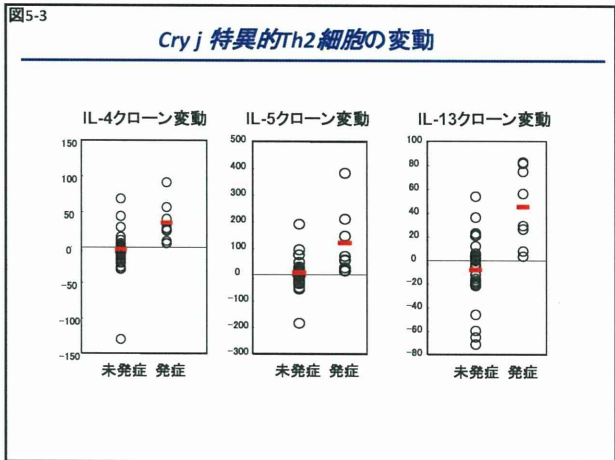
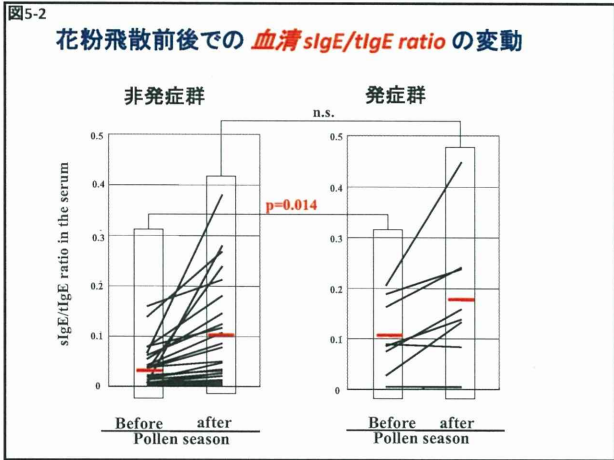


図7-1 アレルギー性鼻炎治療に対する実態調査

調査対象やバイアスを防ぐため検診参加者を対象

- ・医療機関でその機関の受診患者を対象としない
- ・インターネットを利用した調査は一般患者と乖離がある

【方法】 質問紙形式調査

1.年齢、発症時期	6.治療の費用
2.原因抗原	7.治療の満足度
3.最近1年間の治療内容	8.治療への不満の理由
4.病院での治療の効果	9.今後希望する治療
5.OTCの治療の効果	

これまで1169名のアレルギー性鼻炎患者を対象に調査を実施した

図7-2 アンケート調査のまとめ

医療機関での治療者	: 通年性40%、スギ花粉症60%
OTCでの治療者	: 通年性25%、スギ花粉症26%
治療費用	: 通年性1~5万円、スギ花粉症5千円~5万円中心
治療効果(やや良い以上)	: 通年性52%、スギ花粉症81%
治療満足度(やや満足以上)	: 通年性23%、スギ花粉症29%
不満理由	: 60%前後は治療効果が乏しい、副作用40%、通院負担30~50%
免疫治療への期待者は20%前後、治療不満者では、免疫療法や健康食品への期待が高い	
小児患者も同様な受診動向だが、治療に対する満足度はやや満足、満足含めて16%	
OTCによる治療群は、軽症例が多く治療効果も認める群は50%以上だが、満足度は低い、不満理由として医療機関治療者に比較して副作用が高い、治療費用は5000円以下が中心	

副作用、患者負担が少ない免疫療法の導入を図ると同時に、費用負担の配慮が重要

スギ花粉症発症に関する免疫学的パラメーターの前向き研究

研究分担者 岡本 美孝 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 教授
研究協力者 稲嶺 絢子 千葉大学グローバル COE 特任研究員
米倉 修二 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
山本 陸三朗 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員
櫻井 大樹 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 講師

研究要旨

スギ花粉症発症のメカニズムを明らかにするために、スギ花粉感作陽性ながら未発症者を対象に、発症にかかわるパラメーターについての前向き研究を行ったところ、花粉飛散開始前のスギ花粉特異的 IgE と総 IgE の比 (sIgE/tIgE) が発症群で非発症群に比較して有意に高かった。また、スギ花粉主要抗原である Cry j 1 に対する特異的 IL-4, IL-5, IL-13 産生細胞数が発症群では飛散開始前に比較して上昇していたが、非発症群では増加が明らかではなかった。スギ花粉飛散前の sIgE/tIgE は発症予測因子に、花粉曝露による特異的 Th2 細胞のクローンサイズの増加は発症のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。現在、試験規模を拡大した臨床試験で検証を進めている。

A. 研究目的

スギ花粉症患者の増加が認められるが、一方で感作陽性ながら未発症者も多い。感作陽性者からの発症率は年齢、抗原の種類によって大きく異なるが、発症の機序を明らかにすることは有効な発症予防に直ちにつながる可能性がある。本研究班の目的は、発症の機序、バイオマーカーを明らかにし、さらに免疫治療による介入によって発症の予防が可能かどうかを検討することであるが、本年度、約 200 名の感作陽性未発症者をエントリーして来年度の花粉尘散期で発症に関する検討を進めている。本年度は感作陽性未発症者を対象に発症のマーカについて preliminary な検討を行い、これからの検討での基盤としたい。

B 研究方法

スギ花粉に感作陽性ながらこれまで発症したことが無い成人を対象に前向き検討を行った。感作は CAP-RAST でスギに対する抗体が 2 以上を陽性とした。スギ花粉シーズン前の 12 月とシーズン後の 5 月に採血を行い、CAP-RAST 以外に総 IgE 値、スギ花粉主要抗原である Cry j 1 特異的 Th2 細胞数を

ELISPOT 法により、Cry j 1 特異的制御性 T 細胞数を FACS により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたり、アンケート調査対象患者、検診対象者には十分な説明を行い了解を得て行われた。小児では保護者から了解を得て行われた。臨床試験の実施にあたっては、厚生労働省の臨床研究に関する指針を遵守して、学内倫理委員会、病院倫理審査委員会の実施許可を得た後に十分な説明をして、文書による同意を得た患者を対象に実施した。

C 研究結果

参加者は 33 名で年齢は 18 歳から 41 歳までであった。33 名のうち 8 名が翌年の花粉飛散期に初めてスギ花粉症を発症した。発症した 8 名と発症しなかった 25 名について比較すると、年齢、性、飛散前のスギ花粉特異的 IgE 抗体値 (sIgE)、総 IgE 値 (tIgE)、ダニに対する感作率は 2 群間に差は認めなかった。飛散後にはいずれの群でもスギ花粉特異的 IgE 値の上昇が見られたが、発症群では非発症群に比較してスギ花粉特異的 IgE 値は有意に高値を示していた。総 IgE 値は全体としてはいずれの群でも軽度の増

加を認めたと、個人差がいずれの群でも高く、群間でも差は明らかではなかった。一方、花粉飛散前のスギ花粉特異的 IgE と総 IgE の比 (sIgE/tIgE) は発症群で非発症群に比較して有意に高値であった。Cry j 1 特異的 IL-4, IL-5, IL-13 産生細胞は花粉飛散前には発症群と非発症群で差は見られなかったが、花粉飛散後には発症群で増加が見られた。非発症群では増加は明らかではなかった。Cry j 1 特異的制御性 T 細胞についてはいずれの群でも花粉飛散前後で有意な変動は無く、また群間での差も明らかではなかった。

D. 考察

スギ花粉症発症群、非発症群で飛散前のスギ花粉特異的 IgE 値には差が見られず、非発症群でも花粉曝露により sIgE の増加が見られたが、発症群の方で有意に高い増加が見られた。興味深いことに、花粉飛散前の sIgE/tIgE の割合は発症群で有意に高い数値であった。Cry j 1 特異的 Th2 細胞は飛散前には差が見られなかったものの、発症群では飛散後に増加が見られ、非発症群では増加が明らかではなかった。sIgE/tIgE は発症予測因子に、花粉曝露による特異的 Th2 細胞のクローンサイズの増加は発症のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。一方、スギ特異的制御性 T 細胞については発症群、非発症群に差が見られず、発症後にも有意な変化は見られず発症における関与は明らかではなかった。

E. 結論

スギ花粉飛散前の sIgE/tIgE は発症予測因子に、花粉曝露による特異的 Th2 細胞のクローンサイズの増加は発症のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。現在準備を進めている規模の大きな前向き試験で検証し明らかにしたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1、論文発表

1. Fujimura T, Yonekura S, Horiguchi S, Taniguchi Y, Saito A, Yasueda H, Inamine A, Nakayama T, Takemori T, Taniguchi M, Sakaguchi M, and Okamoto Y. Increase of

regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in two-year sublingual immunotherapy (SLIT) for *Japanese cedar pollinosis*. *Clinical Immunology*. 139:65-74, 2011.

2. Yonekura S, Okamoto Y, Yamasaki K, Horiguchi S, Hanazawa T, Matsune S, Kurono Y, Yamada T, Fujieda S, Okano M, Okubo K. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of Ten-Cha (*Rubus suavissimus*) on house dust mite allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx*. 38:600-607, 2011.
3. Hisamitsu M, Okamoto Y, Chazono H, Yonekura S, Sakurai D, Horiguchi S, Hanazawa T, Terada N, Konno A, Matsuno Y, Todaka E, Mori O. The influence of environmental exposure to formaldehyde in nasal mucosa of medical students during cadaver dissection. *Allergology International* 60:373-379, 2011.
4. Yonekura S, Okamoto Y, Sakurai D, Horiguchi S, Konno A. Effect of aging on the natural history of seasonal allergic rhinitis in middle-aged subjects in south Chiba, Japan. *International Archives of Allergy and Immunology*. 157:73-80, 2012.
5. Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Yonekura S, Shigetoshi H, Shimojo N, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Suzuki Y. Association of the MMP9 gene with childhood cedar pollen sensitization and pollinosis. *J Hum Genet on line publication*. 1-8, 2012.
6. Uekusa Y, Inamine A, Yonekura S, Horiguchi S, Fujimura T, Sakurai D, Yamamoto H, Hanazawa T, Okamoto Y. Immunological parameters with the development of allergic rhinitis: A preliminary prospective study. *American Journal of Rhinology and Allergy*, 2012. *in press*
7. Inamine A, Sakurai D, Horiguchi S, Yonekura S, Hanazawa T, Hosokawa H, Matuura-Suzuki A, Nakayama T, Okamoto Y. Sublingual administration of *Lactobacillus paracasei* KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via upregulation of PD-L2 on

dendritic cells. *Clinical Immunology*, 2012. in press

8. 岡本美孝. アレルギー性鼻炎における免疫療法, 喘息, 24:42-46, 2011.
9. 岡本美孝. 小児喘息に合併するアレルギー性鼻炎・副鼻腔炎の診断と治療, 小児科, 52:1029-1035, 2011.
10. 岡本美孝. アレルギー疾患の早期治療介入, アレルギー, 60:945-955, 2011.
11. 岡本美孝. 花粉症の舌下免疫療法, 小児内科, 43:1937-1941, 2011.

2. 学会発表

1. 稲嶺絢子, 堀口茂俊, 米倉修二, 櫻井大樹, 中山俊憲, 岡本美孝. スギ舌下減感作療法とそのアジュバント開発. 第 23 回日本アレルギー学会臨床大会, ミニシンポジウム, 千葉, 5月14-15日, 2011.
2. 米倉修二, 岡本美孝. アレルギーマーチの進展予防を目指してアレルギーマーチの実態とその予防の可能性について耳鼻咽喉科の立場から, シンポジウム, 千葉, 5月14-15日, 2011.
3. 櫻井大樹, 米倉修二, 山本陸三朗, 稲嶺絢子, 中山俊憲, 岡本美孝. アレルギー性鼻炎に対する免疫療法、最新の知見と展望, 第 61 回日本アレルギー秋季学術大会, シンポジウム, 東京都, 11月10-12日, 2011.
4. 櫻井利興, 稲嶺絢子, 櫻井大樹, 飯沼智久, 石井保之, 中山俊憲, 岡本美孝. α -GalCer パルス DC の口腔粘膜投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明. 第 40 回日本免疫学術集会, 口頭発表, 千葉, 11月27-29日, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

①特願 2011-076653 : 花粉症ワクチンの治療効果を予測するバイオマーカー: 岡本美孝, 稲嶺絢子, 櫻井大樹, 堀口茂俊, 中山俊憲

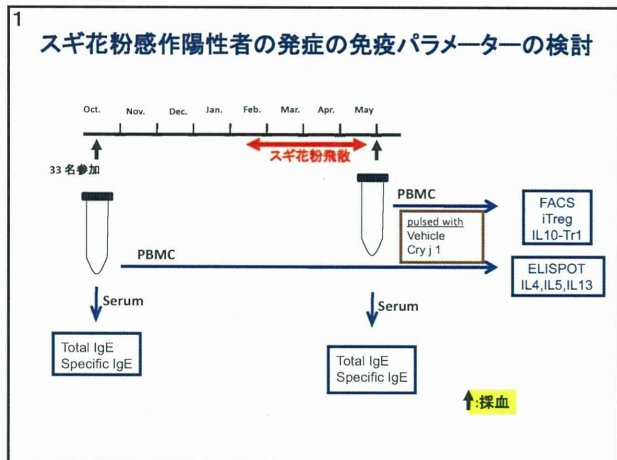
②特願 2011-213257 : 情報処理システム、医療情報収集装置、医療情報収集方法、医療情報収集プログラム、申告情報収集方法、申告情報収集プログラム、及び、患者側端末用プログラム: 岡本美孝、米倉修二、堀口茂俊、横田匡彦

2. 実用新案登録

なし

3. その他

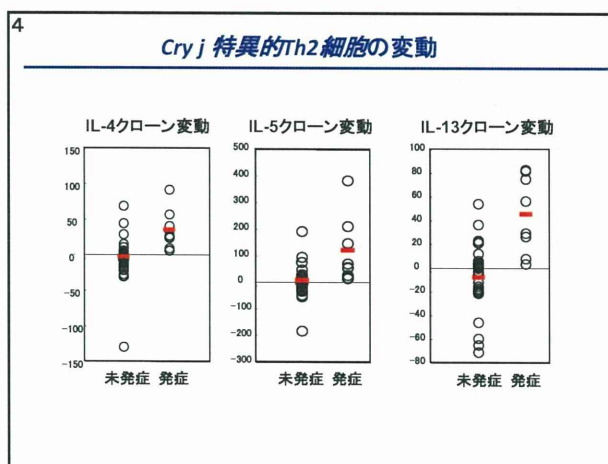
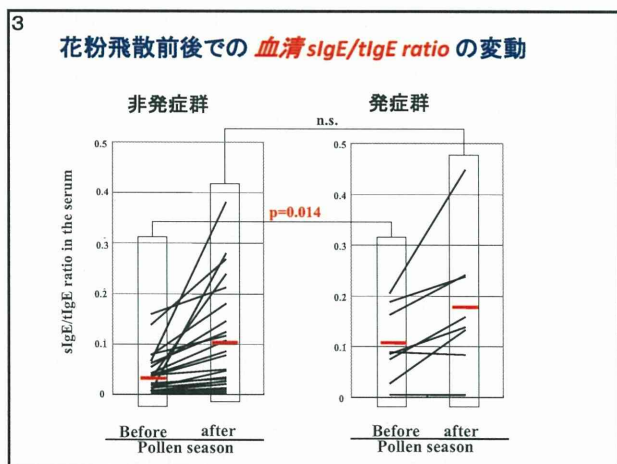
なし



2 試験開始時の背景

	発症群	非発症群
Subjects	8	25
Sex (M/F)	4/4	16/9
Age, years		
Mean	25.1±7.7	26.3±5.7
Range	18-41	19-37
sigE titers (UA/mL)		
Mean	30.9±28.8	10.7±14.1
Range	2.62-79.5	0.77-57.7
tIgE titers (IU/mL)		
Mean	350.3±284.0	390.48±411.6
Range	54.7-886	7.3-1590
Sensitization to house dust mite	6 (75%)	18 (72%)

sigE titers and tIgE titers were at the time beginning of the study
 sigE: The cedar pollen-specific IgE
 tIgE: The total IgE



厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
 分担研究年度終了報告書

アレルギー性鼻炎診療に対するアンケート調査と α -GalCer を利用した二次介入の検討

研究分担者 櫻井 大樹 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 講師
 研究協力者 米倉 修二 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
 稲嶺 絢子 千葉大学特任研究員 (G-COE)
 櫻井 利興 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 医員

研究要旨

アレルギー性鼻炎の患者数は近年増加しており、患者の治療動向や、効果・満足度の実態把握は今後の治療を考える上で重要である。今回アレルギー性鼻炎診療に対するアンケート調査から、現治療により十分に満足のおく効果が得られていない実態と、根治的な治療法となりうる特異的免疫治療への期待が高いことが明らかとなった。またこのような実態からも予防治療の確立は課題であり、NKT細胞免疫系を利用した花粉症に対する新たな治療法の可能性について検討を行った。抗原と同時に α -GalCer をパルスした樹状細胞の口腔粘膜下投与を行ったマウスモデルにおいて、抗アレルギー作用を有効に発現させることが可能であることが示され、舌下免疫療法の治療効果を増強するアジュバントとして働くことで有効な二次介入となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

アレルギー性鼻炎の患者数は近年増加しており、患者の治療動向や、効果・満足度の実態を把握することは今後の治療を考える上で重要である。しかしこれまでの調査では対象者のバイアスの問題など必ずしも実態を反映しているとは限らないと考えられる。また近年様々な薬剤の登場で治療手段に向上がみられるが対症療法にとどまっている。

特異的免疫療法（減感作療法）は、アレルギー性鼻炎に対し唯一自然経過を改善しうる治療法であり、舌下免疫療法は従来の副作用などの問題を大きく軽減する方法として期待されている。しかし舌下投与においても良好な治療効果を得るには複数年の投与が必要という問題もある。

一方、NKT細胞は高い免疫調節能を持ち、 α -galactosylceramide (α -GalCer) という糖脂質の一種によって活性化する。我々はNKT細胞免疫系を利用して、花粉症に対し早期に高い治療効果を発揮し、有効な二次介入となりうる新たな治療法の可能性について検討した。

B. 研究方法

1) 病院外において一般のアレルギー性鼻炎患者を対象に、これまでの治療内容、効果、費用、満足度、不満の理由、今後希望する治療についてアンケートによる調査を行った。

2) 実験的アレルギー性鼻炎モデルマウスを作成し、マウス骨髄由来の樹状細胞を α -GalCer および抗原でパルスし、感作終了後のマウスの口腔底粘膜下に投与した。続いて抗原点鼻による症状誘発を行い、鼻症状、血中および頸部リンパ節における免疫学的パラメーターについて検討を行った。

(倫理面への配慮)

アレルギー性鼻炎に対するアンケート調査

にあたっては、参加者に十分な説明を行い、同意を得て行われた。調査の内容や実施法については千葉大学内の倫理委員会に申請し、許可を得て行われた。動物実験にあたっては、動物実験に対して動物愛護の面からの配慮を最大限払って行い、学内の実験動物実施規定を遵守し、委員会の許可を得て行われた。

C. 研究結果

1) 患者背景は20～70歳代と幅広い年齢層に渡り、通年性56名、スギ花粉症155名より回答を得た。通年性、スギ花粉症とも10年以上の罹患が約90%であった。最近受けた治療は、病院での治療が最も多かったが、通年性では約45%が無治療であった。民間療法は少ないものの年間10万円以上との回答も認められた。治療に対する満足度は、通年性・花粉症ともやや満足以上の割合が20%台にとどまる一方、不満の割合は両者とも30%台であった。不満の理由は効果不十分が約半数と最も多く、眠気などの副作用も40%程度あった。今後希望する治療としては病院治療と減感作療法が多かった。

2) α -GalCer と抗原の両者でパルスした樹状細胞を投与したマウス群では症状の有意な改善を認めた。同群では血中の抗原特異的IgE値の低下、頸部リンパ節中のメモリー T 細胞からのIFN- γ 産生増加が有意に認められた。また頸部リンパ節の検討において、IgEへのクラススイッチ抑制作用のあるIL-21の遺伝子発現が有意に上昇していた。

D. 考察

アレルギー性鼻炎の罹患年数は10年以上と長い患者が多かったが、通年性では無治療の患者も多く、長期にわたる通院の困難さが示唆される。現治療に対する効果や副作用に対する不

満も多い一方、今後希望する治療として病院治療や、根治的な治療法となりうる減感作療法への期待が高いことも明らかとなった。

また α -GalCerをパルスした樹状細胞の口腔粘膜下投与は、抗原と同時に投与することで抗アレルギー作用を有効に発現させることが可能であった。これらの症状変化は、局所リンパ節におけるTh1/Th2バランスの改善や、抗原特異的IgE産生の低下に起因する可能性が示唆された。

E. 結論

アレルギー性鼻炎診療に対するアンケート調査から、症状経過の長さや現治療により十分に満足の内効効果が得られていない実態と、根治的な治療法となりうる減感作療法への期待が高いことが明らかとなった。またこの実態からも予防治療の確立は課題であり、 α -GalCer舌下投与は舌下免疫療法の治療効果を増強するアジュバントとして働くことで有効な二次介入になる可能性が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 櫻井利興、稲嶺絢子、櫻井大樹、飯沼智久、石井保之、中山俊憲、岡本美孝. α -GalCerパルスDCの口腔粘膜投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明. 第40回日本免疫学会. 2011年. 千葉市.
- 2) 櫻井利興、稲嶺絢子、櫻井大樹、飯沼智久、米倉修二、石井保之、中山俊憲、岡本美孝. α -GalCer-Ag DCの口腔粘膜下投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2011. 千葉市.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

スギ花粉症発症に関する遺伝子の同定

研究分担者 藤 枝 重 治 福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授

研究協力者 坂 下 雅 文 福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 助教

意 元 義 政 福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 医員

研究要旨:

スギ花粉症患者がなぜ増加しているのか明確な解明はされておらず、発症に関する責任遺伝子は同定されていない。スギ花粉症発症に関連する遺伝子の同定のために、スギ花粉飛散期末末梢血 CD4 陽性 T 細胞、CD14 陽性単核球細胞と鼻上皮細胞を採取し、これらの mRNA のプロファイルを、マイクロアレイを用いて、スギ花粉症発症者およびスギ特異的 IgE 陽性未発症者、および非アレルギー者（スーパーコントロール群）において比較検討をした。CD4 陽性 T 細胞は、スギ花粉症発症者において有意に IL17RB (Interleukin 17 receptor B) の発現が増大した。鼻上皮細胞についてはスギ花粉症患者群とコントロール群において、発現差が 4 倍以上かつ $p < 0.05$ の 18 遺伝子を同定した。そのうちの Intelectin-1 と Gene X (特許申請予定のため仮称とする) がスギ花粉症患者において高発現であった。またスギ抗原に対する皮内反応の違いにより、Intelectin-1 と Gene X は発現パターンが異なっていた。免疫組織化学では Intelectin-1 は鼻粘膜上皮細胞に、Gene X は鼻粘膜上皮細胞と線維芽細胞に発現していた。Intelectin-1 は IL-4 と IL-13 の刺激により、Gene X は papain とスギ花粉そのものの刺激によって発現が誘導された。また線維芽細胞では Gene X は TNF- α 、IL-33、ヒスタミン、IL-4 及び IL-13 でその発現が高度に誘導され、IFN- γ や LPS では軽度の発現上昇にとどまることが判明した。以上のことから、IL-17RB と Intelectin-1 は発症に関する遺伝子であること、Gene R は感作から発症に関連する遺伝子であることが推測された。

A. 研究目的

最近我々が行ったスギ花粉症大規模疫学調査では、約 60% の人がスギ特異的 IgE を持っており、全体の 35% がスギ花粉症を発症していた。すなわち全体の 25% の人は、スギ花粉に対する感作が成立しているが、何らかの機序が働きまだ発症しておらず、将来的には発症の可能性が高いことになる。

そこで本研究においては、以下の 3 点について検討した。

1. スギ花粉症の発症に関連する遺伝子を網羅的に解析し、責任遺伝子を同定する。
2. 関連遺伝子がどのような発現パターンを示し、感作から発症においてどのように関連するかを同定する。
3. 見つけた関連遺伝子が発現する細胞において、アレルギー性炎症に関連するサイトカインによってどのように誘導され、アレルギー炎症にどのように関与するかを解明する。

B. 研究方法

【対象】

福井大学アレルギーデータベースからスギ花粉症患者群（血清スギ特異的 IgE immuno CAP スコア 2 以上、2 年以上スギ花粉飛散時期での有症者（スギ花粉症群）とコントロール群である非アレルギー群（7 項目吸入アレルギー特異的 IgE 陰性、無症状者）を抽出した。特異的 IgE はスギ、ヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ、カモガヤ、ブタクサ、アスペルギルス、カンジダの 7 項目である。同時に、気管支喘息やアトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどの既往も調べられている。2 群とも気管支喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーの既往がない対象者を選んだ。スギ花粉症群では、血清スギ特異的 IgE 陽性であり、他の 6 項目は陰性である者を選択した。さらにスギ特異的 IgE 陽性未発症者群も抽出した。

対象者には本研究の内容を説明し、文書で同意を得た本研究は福井大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

【方法】

1. 遺伝子発現解析

対象者より末梢血 100ml を採取し、末梢血単核球を分離した。その後 CD4 MicroBeads (Miltenyi Biotec) 及び CD14 MicroBeads にて標識し、AutoMACS™ Separator (Miltenyi Biotec) により CD4 陽性 T 細胞ならびに CD14 陽性単球細胞を分離した。鼻粘膜上皮細胞は下甲介粘膜を、細胞診用ブラシで数回擦過し、採取した。採取した細胞をすぐに TRIzol (Invitrogen, Leek, the Netherlands) に溶解し、-80°C で保存した。Total RNA の抽出には、miRNeasy Mini キット (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いた。Total RNA (100-500ng) から、Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により、ビオチンラベル化した cRNA を合成し、HumanRef-8 ver3 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) によってマイクロアレイの解析を行った。アレイの蛍光強度は BeadsStation 500X 遺伝子発現解析システム (Illumina) により検討した。抽出した total RNA から cDNA を合成し、定量的 PCR を行った。遺伝子の内在性コントロールとして Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) で定量的 PCR を行った。PCR 反応におけるプロトコールは、95°C 10 分後 PCR による増幅サンプルが指数関数的に起こる領域で、一定の増幅産物になるサイクル数 (Threshold Cycle; Ct) を検出し、各遺伝子発現量は GAPDH の発現量に対する比を $\Delta\Delta Ct$ 法で算出した。

2. 免疫組織化学

免疫組織化学は、Intelectin-1 と Gene X に対するポリクローナル抗体と、ヒツジ IgG に対する 2 次抗体 (R&D) を使用した。染色に用いた組織は福井大学において手術時に採取されたアレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜を用いた。

3. 鼻粘膜上皮細胞培養及び線維芽細胞培養

鼻粘膜上皮細胞初代培養細胞株は、通年性アレルギー性鼻炎患者から樹立した。RNA 用の鼻粘膜上皮細胞回収と同様に数回擦過し、すぐにペニシリン (100unit/ml) とストレプトマイシン (100µg/ml) を含む培養液に回収した。鼻粘

膜線維芽細胞は手術時に採取された通年性アレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜より分離し、10% FCS を含む RPMI にて培養した。回収した鼻粘膜上皮細胞及び線維芽細胞を 37°C、5%CO₂ のインキュベーターにて培養し、LPS (100ng/ml)、IFN-γ (20ng/ml)、TNF-α (10ng/ml)、ヒスタミン (1x10⁻⁴M/ml)、IL-4 (10ng/ml)、IL-13 (10ng/ml)、IL-33 (10ng/ml)、を添加し、刺激後 15 時間後に細胞を回収し、RNA 抽出した。

(倫理面への配慮)

「アレルギー性鼻炎を中心としたアレルギー疾患の遺伝子解析と蛋白質解析に関する研究」の題名で福井大学医学部倫理委員会の承認を受け、本研究を行った。ヒト末梢血及び鼻粘膜擦過細胞の採取は、福井大学規程に則り、患者もしくはボランティアから文書での研究材料使用承諾書を取り行った。

C. 研究結果

1. 遺伝子発現解析

スギ花粉飛散時期の末梢血 CD4 陽性 T 細胞におけるスギ花粉症群と非アレルギー群との間で 1.5 倍以上有意な発現変化を認めた遺伝子は、AT rich interactive domain 4B (*ARID4B*)、serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1)、Interleukin 17 receptor B (*IL17RB*) の 3 遺伝子であった。しかしこれら 3 遺伝子の mRNA を定量 real-time PCR にて検討すると、再現性が示された遺伝子は *IL17RB* のみであった。一方、CD14 陽性単球細胞ではスギ花粉症群と非アレルギー群で有意な発現変化を示す遺伝子はなかった。

鼻粘膜上皮擦過細胞におけるマイクロアレイの解析では、スギ花粉症群とコントロール群との間で 4 倍以上有意な発現変化を認めた遺伝子は 18 遺伝子であった。そのうちスギ花粉症群において 13 遺伝子は非アレルギー群と比較して発現が有意に上昇していた。スギ花粉症群で 10 倍以上遺伝子発現上昇が認められた遺伝子は 4 遺伝子あった。その一つである Intelectin-1 (*ITLN1*) は非アレルギー群と比較して 17.6 倍、Gene X は 151.4 倍発現が上昇

していた。Intelectin-1 と Gene X とともに定量的 PCR 結果でも、スギ花粉症群が非アレルギー群と比較して有意に上昇していた ($p < 0.0001$)。また、感作陽性未発症群の中で、スギ抗原に対する皮内反応で陽性を示す群と陰性を示す群での比較では、Intelectin-1 の発現には差がなかった。一方で Gene X は皮内反応陽性者が陰性者に比べ有意に発現上昇していた。

2. 免疫組織化学

通年性アレルギー性鼻炎患者の下鼻甲介粘膜を用いて Intelectin-1、Gene X の免疫組織化学を行った。Intelectin-1 は鼻粘膜上皮細胞に発現していた。また Gene X は鼻粘膜上皮細胞と線維芽細胞に発現していた。

3. 鼻粘膜上皮細胞培養及び線維芽細胞培養

鼻粘膜上皮細胞の採取直後は Intelectin-1 の発現は確認できたが、初代培養した鼻粘膜上皮細胞では Intelectin-1 の発現が認められなくなった。LPS、IFN- γ 、TNF- α 、ヒスタミン、IL-4、IL-13、IL-33 で 15 時間刺激をすると、IL-4 と IL-13 の刺激で Intelectin-1 の発現が認められた。一方 Gene X は上記刺激では誘導されず、papain とスギ花粉の刺激により発現誘導された。

鼻線維芽細胞では Gene X は TNF- α 、IL-33、ヒスタミン、IL-4 及び IL-13 でその発現が高度に誘導され、IFN- γ や LPS では軽度の発現上昇にとどまることが判明した。

D. 考察

CD4 陽性 T 細胞は、Th2 type のアレルギー反応を担う代表的な細胞である。IL-17RB は IL-17 receptor family の一つである。IL17RB のリガンドは IL-17B、IL-17E (IL-25) であり、IL-25 がより高い親和性をもつとされ、気道上皮細胞などで産生された IL-25 が IL-17RB に結合することにより、アレルギー反応が増強すると考えられている。CD4 陽性 IL-17RB 陽性 natural killer (NK) T 細胞に、IL-25 による刺激を加えると IL-4 や IL-13 の産生が亢進するとともに、IL-17RB 抗体によって気道でのアレルギー炎症を抑制することが報告されている。我々の行ったマイクロアレイの結果におい

ても、スギ花粉症群の CD4 陽性 T 細胞における IL17RB が上昇していたことは、アレルギー炎症において IL17RB が重要な役割を担っている可能性を裏付ける結果であると考えられる。以上のことより IL17RB はアレルギー性気道炎症を増悪させる分子であることが推測される。

末梢血細胞と比較して、鼻粘膜擦過細胞においては多数の遺伝子変化が認められた。この鼻粘膜擦過細胞には鼻粘膜上皮細胞をはじめアレルギー炎症に関する様々な血球成分、鼻粘膜を構築する細胞が含まれている。その構成に関わる細胞の多様性の結果だと推測される。鼻は常に様々な抗原にさらされているため、容易に生体に抗原が入らないように、あるいは排除する機能を有している。そのため、スギ花粉飛散時期における鼻粘膜擦過細胞のマイクロアレイの結果はアレルギー炎症のみならず、鼻粘膜のバリア機構を明確に反映していると考えられる。Intelectin は、ヒトとマウスにおいて Intelectin-1 と Intelectin-2 の 2 つのタイプが同定されている。Intelectin-1 は Omentin、小腸における Lactoferrin receptor と呼ばれ、鉄の吸収やインスリン刺激による糖代謝や脂肪代謝に関連する。また Intelectin は arabinogalactan を認識し結合する。この arabinogalactan は細菌や真菌、原虫に存在するが、ヒトでは存在しないため、Intelectin が細菌や真菌などに結合し、生体の防御機構に関与している可能性があると考えている。マウスの気道上皮細胞では Intelectin-1 が IL-13 により誘導されることが報告されており、我々も鼻粘膜上皮培養細胞において、IL-4 及び IL-13 で Intelectin-1 の発現が誘導されることを確認した。また、ヒト喘息患者での気管支上皮では、Intelectin-1 の発現が上昇していること、遺伝子解析では Intelectin-1 の遺伝子多型と喘息との関連が報告されている。以上から Intelectin-1 は喘息やアレルギー性鼻炎など、気道のアレルギー炎症において重要な分子である可能性が示唆される。

Gene X の発現に関連する要素としては、スギ抗原に対する皮内反応が陽性になることが一つの要因として考えられる。皮内反応には好塩基球や肥満細胞が関与する。これらの細胞が抗原と反応しヒスタミンが遊離されるときに Gene X が何らかの関連を持つと考えられる。