

また鼻線維芽細胞で TNF- $\alpha$ 、IL-33、ヒスタミンが Gene X の発現誘導を強く誘導したことは、鼻粘膜における局所炎症により Gene X が誘導されることを示唆すると考えられる。同時に IL-4 及び IL-13 も Gene X を強く誘導することは、アレルギー炎症が増強される過程でも Gene X が関連すると考えられ、Gene X はアレルギー性鼻炎の感作から発症に至るプロセスで重要な因子であろうと思われる。

#### E. 結論

以上の研究成果より、アレルギー性鼻炎に関連する遺伝子、IL-17RB、Intelectin-1、Gene X が同定できた。それぞれの遺伝子は異なった発現パターンを示し、発症にいたる様々な過程で誘導されることが判明した。IL-17RB と Intelectin-1 は発症に関する遺伝子であること、Gene X 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。

今後、目的で述べた3点のことを確実に解決できたならば、スギ花粉に対する感作を防ぐことはできないが、発症は予防できる可能性があると考えている。

#### F. 健康危険情報

本研究における健康有害状況は認めなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

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 B<sub>Ly</sub>S expression and production in human tonsillar fibroblasts. *Clin Immunol*. 141:365-71, 2011.12.

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

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

## 2. 学会発表

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

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

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-Laryngologyicum Amicitiae  
Sacrum 2011.9. Bruges, Belgium

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

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

Fujieda S: New therapeutic strategy for allergic rhinitis. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery 2011.12. Kobe, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

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

制御性T細胞の免疫療法による変化と感作に関連する因子の検討

研究分担者 竹内 万彦 三重大学耳鼻咽喉・頭頸部外科教授  
研究協力者 増田佐和子 国立病院機構三重病院耳鼻咽喉科・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 同皮膚科・講師

研究要旨

スギ花粉症の発症に影響を及ぼす要因については多くの先行研究があるが、いかなる因子が感作に関与しているかは不明な点が多い。スギ花粉飛散期に症状のない53名（20歳～60歳、平均36.1歳、男19名、女34名）を対象とし、感作に影響すると思われる項目をアンケートおよび問診により検討した。血中のスギ特異的IgE抗体を測定し、上記との関連について検討した。ダニの感作（OR 7.6）、年齢が40歳未満（OR 4.16）、他のアレルギー疾患の合併（OR4.0）の3項目のみが有意にスギの感作と関連し、家族歴、住居環境などは影響を及ぼさなかった。

A. 研究目的

スギ花粉症の発症に影響を及ぼす要因については多くの先行研究があるが、いかなる因子が感作に関与しているかは不明な点が多く、この点に関する報告は殆どみられない。そこで、スギ花粉症の感作に及ぼす因子を明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

B. 研究方法

スギ花粉飛散期に症状のない53名（20歳～60歳、平均36.1歳、男19名、女34名）を対象とした。感作に影響すると思われる項目をアンケートおよび問診により検討した。血中のスギおよびダニ特異的IgE抗体を測定し、上記との関連について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は三重大学医学部倫理委員会の審査にて承認されている（No. 2282）。

C. 研究結果

スギ花粉症未発症者のスギ感作（血中IgE抗体陽性）に影響する因子の強さをオッズ比で表すと、ダニに感作されている（OR 7.6）、年齢が40歳未満（OR 4.16）、他のアレルギー疾患の合併（OR4.0）の3項目のみが有意であり、家族歴、住居環境などは影響を及ぼさなかった。また、スギ花粉の感作の強さ（特異的IgE抗体価）と他のアレルギー疾患の合併と関連があった。制御性T細胞の免疫療法による変化は現在検討中である。

D. 考察

今回の検討より、スギ花粉症未発症者においては、個人のスギ花粉の感作の有無あるいは感作の強さは家族歴や周囲の環境より、個人のダニの感作、年齢、他のアレルギー疾患の有無により左右されることが判明した。小笹らは、89名のスギ花粉症患者と花粉症でな

い対照者とを比較し、花粉症の危険因子として、アレルギー疾患の既往のオッズ比が最も高かった（8.80）と報告している。今回の結果も、結局、アトピー素因があるとスギに感作されやすいという一面が明らかになったものと思われる。スギ花粉症の家族歴との関連がみられなかったのはやや意外であったが、小笹らは両親や同胞のアレルギー性鼻炎やスギ花粉症とスギ花粉症との有意な関連はみられなかったと述べている。

E. 結論

スギ花粉症未発症者においては、ダニの感作、年齢、他のアレルギー疾患の合併がスギ花粉の感作に影響を及ぼす。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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）

2. 学会発表

1) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

### 小児科受診患者における代替医療の利用に関する調査

分担研究者 下条直樹（千葉大学大学院医学研究院小児病態学准教授）

研究協力者 森田慶紀（千葉大学大学院医学研究院小児病態学）

#### 研究要旨

千葉市内の6カ所の中学校（総生徒数4880名）に依頼し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に2011年10月にアンケート調査を行い、以下の結果を得た。

1. 969名の有効回答の解析では鼻症状の出現時期は2-5年前が35%、6-10年前が40%、10年以上前が21%と大部分が中学入学以前に発症していた。
2. 通年性アレルゲンであるダニよりもむしろ花粉をアレルゲンとする方が多いことが示唆された。
3. およそ80%の児は何らかの治療を必要とした。
4. 使用薬剤の効果に対する評価は、病院受診者の2/3が有効と回答した。代替医療などの効果を感じているのは1/4程度であり、医療機関を受診した児に比較すると明らかに低かった。
5. これまでのアレルギー性鼻炎の治療（主に薬物療法）には半数が大きな不満がないが、半数は不満があると回答していた。
6. 今後希望する治療としては、病院受診しての薬物療法がもっとも多く（50%）、免疫療法（減感作療法）は10%強であった。減感作療法はエビデンスもあり今後の治療として期待されるが認知度はまだ高くなく適切な情報提供が必要である、と考えられた。

#### A. 研究目的

アレルギー性鼻炎の罹患率は近年増加傾向にあり、およそ全国民の1/3が罹患していると推測されている。このようにアレルギー性鼻炎は国民病とっていいほど罹患率が高いのみでなく発症年齢も低年齢化しており、学校生活や学業にも支障を来すことが少なくない。しかしながら、週日は授業や課外活動等で忙しく、また急性発作などがある喘息などと異なり緊急性が乏しいことからアレルギー性鼻炎をもつ生徒は医療機関を必ずしも受診していない可能性がある。このような場合には適切なアレルギー性鼻炎の治療を受けていないことも考えられる。そこで本年度は、中学生におけるアレルギー性鼻炎の治療法とその効果とを明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

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に2011年10月にアンケート調査を行った。調査項目は、性別、鼻症状の出現時期、検査で判明しているアレルゲン、最近1年間の病院・薬局からの薬物療法および健康食品・民間療法の有無、治療薬の内容、減感作療法・代替医療への評価、今までの治療法に対する

不満点、今後の治療法への期待、などである。

（倫理面への配慮）

本研究はアンケート調査のみであり、また匿名で個人情報保護に関して問題ないものと考えられる。

#### C. 研究結果

- 1) 969名（男児543名、女児420名、性別未記載6名）から解析可能なアンケートを回収した。鼻症状の出現時期は2-5年前が35%、6-10年前が40%、10年以上前が21%と大部分が中学入学以前に発症していた。
- 2) 症状のある時期では、通年性が42%、季節性が55%であり（図1）、検査で陽性になっているアレルゲンについてはダニ単独17%、スギ単独19%、ダニ、スギ両者34%、不明30%であった（図2）。
- 3) 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。複数回答であるために病院受診と薬局で市販薬を購入した児も存在したが（10%）、およそ80%の児は何らかの治療を必要としたと考えられる（図3）。本調査では、健康食品などを利用した児は数%であり、治療の大部分が薬物と思われた。服薬内容としては、病院受診

者では90%が内服薬を、60%が点鼻薬を、40%が点眼薬を処方されていた。薬局では内服薬70%、点鼻薬／点眼薬とも30%であり、病院受診者よりも若干各種の薬剤の使用率が低くなっていた。

- 4) 使用薬剤の効果に対する評価は、病院受診者の2/3が有効と回答したのに対し(図4)、薬局を利用した児では50%強であった(図5)。病院受診者のほうが症状は強いと考えられるので、市販薬よりは医師の診察により処方される薬物のほうが効果があると思われた。代替医療などの効果を感じているのは1/4程度であり(図6)、医療機関を受診した児に比較すると明らかに低かった。
- 5) これまでのアレルギー性鼻炎の治療(主に薬物療法)には半数が大きな不満がないが、半数は不満があると回答していた(図7)。不満の理由としては、治療効果が乏しいと答えたのは26.3%であり、費用(28.5%)や通院が面倒(31.8%)といった理由のほうがより多かった。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(図8)。
- 6) 今後希望する治療としては、病院受診しての薬物療法がもっとも多いのは当然だが(50%)、健康食品や減感作療法が10%を超えていた(図9)。

#### D. 考察

千葉市のアレルギー性鼻炎を有する中学生を対象としたアンケート調査から、通年性アレルゲンであるダニよりもむしろ花粉をアレルゲンとする鼻炎が多いことが示唆された。また大部分が小学生以前に発症しており、大部分が薬物療法を必要としていた。今後、発症や重症化の予防を考えると標的となる年代は小学生以下であると考えられる。現在の薬物療法等に満足する児は約半数であり、今後は従来の薬物療法主体の治療のみでなく、薬物療法以外の治療を望む患者が多いことを示している。しかしながら、免疫療法(減感作法)の希望がそれほど多くないのは本治療法の認知がまだ低い可能性も考えられる。根本的な治療法であり、また発症予防にも効果がある可能性が示されている免疫療法の普及を図るべきと考える。次回調査では免疫療法に対する認知度も調べたい。

#### E. 結論

千葉市内のアレルギー性鼻炎患者およそ1000名のアンケート調査から、1)大部分の児はなんらかの治療を必要としている、2)病院での薬物療法をきちんと受けることが市販の治療薬よりも有効である、3)半数の患者は現在の治療法には満足しておらず、廉価で頻回の通院治療の必要性のない他の治療法を期待している、4)減感作療法はエビデンスもあり今後の治療として期待されるが認知度はまだ高くなく適切な情報提供が必要である、と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

図1. 症状のある時期

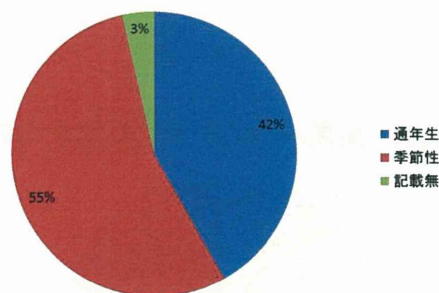
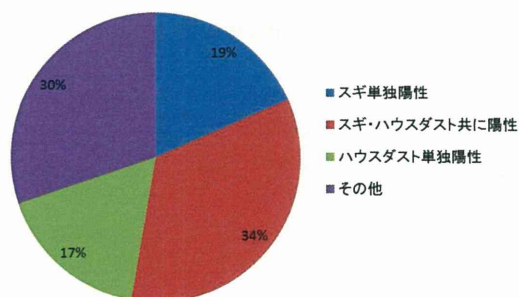
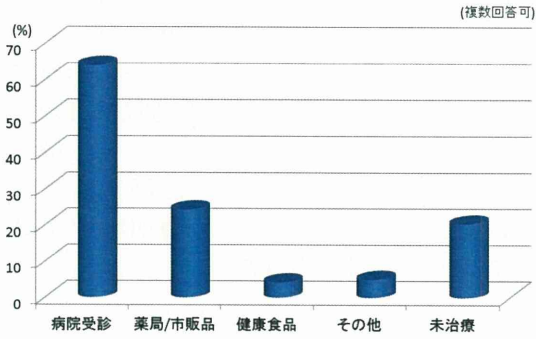


図2. 原因アレルゲン



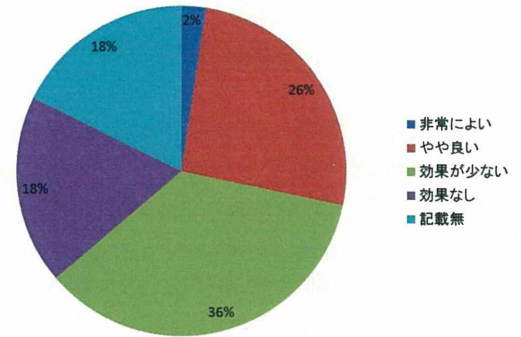
鼻炎症状が明確な人で感作が50%であり、スギ感作率はHDより高い(スギ53%、HD51%)

図3. この1年間のARに対する治療



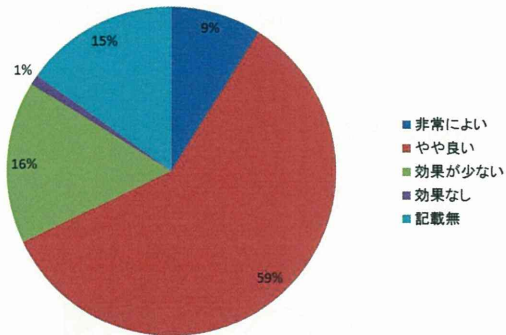
ARありと返答した児の6割は病院受診している

図6. 代替医療治療の効果への評価



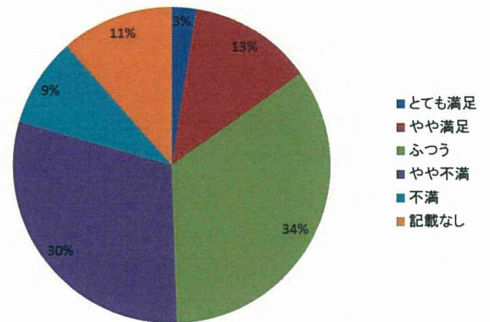
代替医療治療については半数弱は効果を評価していない

図4. 病院処方薬の効果への評価



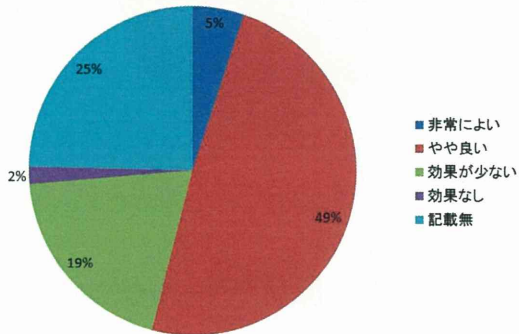
比較的效果には満足している患者が多いがより有効な治療を求める患者もいる

図7. これまでのAR治療に対する感想



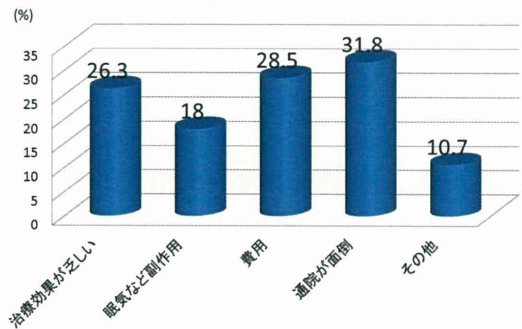
既存の治療(薬物療法が主)については半数弱が満足していない

図5. 薬局/市販薬治療の効果への評価



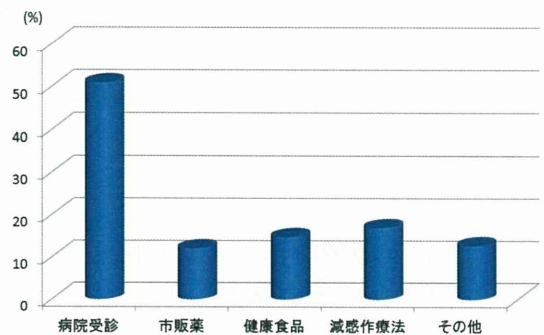
効果については医療機関の処方とあまりかわらない

図8. これまでのAR治療の不満点



不満の理由は多岐にわたるが、自宅で行なえ効果の高い治療法が期待されている

図9. 今後どのような治療を受けたいか



医学的にエビデンスのある治療を受けたい希望が多いが免疫療法の意義はあまり理解されていない

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  
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

研究分担者 大久保公裕 日本医科大学耳鼻咽喉科 教授  
研究協力者 後藤穰 日本医科大学耳鼻咽喉科 准教授

研究要旨

舌下免疫療法（SLIT）は欧州で高い有効性を示し、これを評価した二重盲検比較試験のどれをとってもアナフィラキシーの報告はない。喘息はある程度の確率で生じうるが、重責発作などは小児を含めてもないとされる。我々は1999年に大学倫理委員会の承認を受けて、SLITの臨床研究を開始した。SLITの二重盲検比較試験を日本で初めて行ったのは2005年でスギ・ヒノキ花粉飛散は約12000個と大量飛散の年であった。60症例をランダム化し、プラセボ対照比較試験を行った。スギ花粉症でのSLITがプラセボより有意に症状スコア、QOLスコアを減少させ、特にQOLではプラセボの半分の悪化に抑制したことを発表した。

しかし単年の結果としては鼻症状スコアの減少は僅かなものであり、施行法の改善が考えられた。このため当科では経年的な舌下免疫療法を開始し、最長で6年間のSLIT施行者の評価を1年目のSLIT、そしてプラセボ群と比較検討した。その結果、経年的SLIT施行ではQOLはもちろん各症状スコアもきれいに抑制することが示された。この結果は今後のSLITの施行に関してその実際の使用方法を考慮できるものと考えられた。

A. 研究目的

免疫療法はアレルギー疾患を治癒、長期寛解させることが期待できる唯一の治療法である。しかし、抗原エキスを蛋白として投与する場合、アナフィラキシーショックのような致死的な副作用が発生する危険性がある。そこで、いかに安全で有効性の高い方法に改良していくかが課題である。投与エキスは蛋白のままでも投与経路を注射から舌下に変更すれば、副反応の発生頻度は極めて少なくなることが知られており、舌下免疫療法も安全は方法として期待が大きい。我々は既にプラセボ対照二重盲検比較試験において、2005年の大量飛散時でも単年度の舌下免疫療法がプラセボより有意にQOLを低下させることを明らかにした

(Allergology International 2005)。しかし多くの論文より皮下注射はもちろん舌下免疫療法での経年的効果も単年度での効果を上回ることが示唆されている。今回我々は単年と複数年での効果の検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

投与エキスはトリイ薬品製の標準化スギ花粉エ

キスで、これまでの報告の通り初回の舌下免疫療法は維持量まで4週間、複数年の場合には1週間で同じ維持量の2000JAUの1mlに達するようにプロトコールを設定した。初回の舌下投与は単年度では11月より、複数年では12月より開始した。効果判定の症状はアレルギー日記でくしゃみ、鼻汁、鼻閉、総鼻症状スコアを算出した。

C. 結果

2010年のスギ花粉飛散は東京9地点平均で1418個/1cmであった。くしゃみ、鼻汁、鼻閉、総鼻症状の季節中のそれぞれのスコアはプラセボ、1回目の舌下、複数回の舌下の順で低く推移した(図)。特に鼻閉では本格飛散開始時期よりプラセボでは急に悪化したが、舌下免疫療法群では急激な悪化は認められなかった。QOLもこのプラセボ、1回目の舌下、複数回の舌下の順で悪化が少ない傾向にあったが、有意差は認められなかった。

D. 考察

臨床症状とQOLはいずれも複数回の舌下免疫療法が最も悪化が少ない傾向にあったが、QOLで有

意差が認められなかったのは2010年のスギ花粉飛散数が少なく、プラセボ群でも軽症患者が多かったためと考えられた。しかし、各症状の推移ではどの症状も明らかに複数年の舌下免疫療法が単年の舌下を上回っていた。これは今までの報告同様に現状のアレルゲン免疫療法では舌下免疫療法も1年のみの施行では最大限の効果を示してはいない事を示し、1年より2年以上の施行が望ましいことが考えられた。舌下免疫療法の施行について最適な年限については、複数年というだけで、これからの詳細な検討が求められる。薬物療法ではないので、毎年の施行は必要ないと考えられるが、ペプチド免疫療法のような数回注射の短期免疫療法ではないことも確認された。

#### E. 結論

舌下免疫療法は、副作用の発生が極めて少なく、さらに有用性が期待される新規の治療法である。今回の検討では単年度の舌下免疫療法より複数年の舌下免疫療法の方がより花粉症に対し効果がある事が示された。何年続ければ良いかの検討については今後の詳細な検討に譲るが、対症療法である薬物療法に依存するばかりでなく、疾患を根治させる免疫療法を詳細に検討してゆくことはアレルギー治療に向けての課題である。

#### F. 研究発表

1. Gotoh M, Suzuki H, Okubo K: Delay of onset of symptoms of Japanese cedar pollinosis by treatment with a leukotriene receptor antagonist. *AllergologyInt* 60: 483-489, 2011.
2. Okubo K, Kurono Y, Fujieda S, Ogino S, Uchio E, Odajima H, Takenaka H, Baba K: Japanese guideline for allergic rhinitis. *AllergologyInt* 60: 171-189, 2011.
3. 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

(Rubussuavissimus) on house dust mite allergic rhinitis. *AurisNasus Larynx* 38: 600-607, 2011

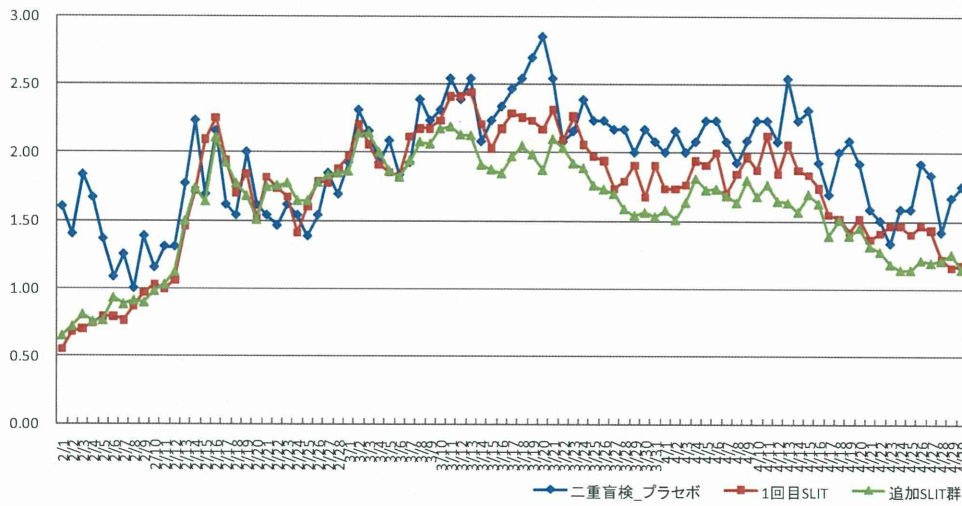
4. Fujikura T, Okubo K: Adrenomedulin level in the nasal discharge from allergic rhinitis cohort. *Peptide* 32: 368-373
5. Fujikura T, Okubo K: Nasal myoepithelioma removed through endonasal endoscopic surgery: A case report. *J Nippon Med Sch* 77(5): 273-276, 2010.
6. 大久保公裕：アレルゲン免疫療法の論理と展望. *呼吸* 30: 759-760, 2011
7. 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
8. 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
9. 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.
10. 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
11. 大久保公裕；スギ花粉症の舌下免疫療法. *Medical Practice* 28: 742-743, 2011.
12. 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.
13. 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
14. 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

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）  
なし

図



症状重症度の平均値の推移 (Base~Endポイント)



## 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

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・頭頸部外科学 准教授  
研究協力者 檜垣貴哉 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学 医員  
牧原靖一郎 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学 医員

### 研究要旨：

今回我々は、スギ・ヒノキ花粉症に対する皮下免疫療法が、気管支喘息など他のアレルギー疾患の新規発症を予防しうるのか検討した。標準化スギ花粉エキスをを用いた特異的免疫療法を行ったスギ・ヒノキ花粉症患者のうち、2005年～2006年に維持療法を施行した患者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、気管支喘息、通年性鼻炎、他の季節性鼻炎の新規発症状況を問診した。フォローアップのできた41例（93.2%）のうち、2例（4.9%）にのみ気管支喘息の新規発症がみられた。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。スギ・ヒノキ花粉症に対する皮下免疫療法は、新規喘息発症や新規通年性鼻炎発症を予防する作用を有する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

薬物療法や手術療法を凌駕する、花粉症に対する免疫療法の特長として、アレルギー疾患の自然経過（Natural history）を修飾する作用、すなわち予防作用が知られている。予防作用は、新規アレルギー感作を予防する作用、気管支喘息など他のアレルギー疾患の新規発症を予防する作用、および免疫療法終了後の再燃を予防する作用（効果継続）、の3点が知られているが、スギ・ヒノキ花粉症に対する免疫療法における予防効果については不明な点が多い。今回我々は、スギ・ヒノキ花粉症に対する皮下免疫療法が、気管支喘息など他のアレルギー疾患の新規発症を予防しうるのか検討した。

### B. 研究方法

標準化スギ花粉エキスをを用いた特異的免疫療法

法を行ったスギ・ヒノキ花粉症患者のうち、2005年～2006年に維持療法を施行した患者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。新規発症者の背景として、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、維持期間などを調査した。

（倫理面への配慮）

面接および電話調査に関しては、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行った。

### C. 研究結果

44 例の内、41 例 (93.2%) が 2011 年 4 月までフォローアップできた。平均年齢は 38.9 歳、性別は男性 15 例、女性 26 例であった。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。

#### D. 考察

これまでに、アレルギー性鼻炎に対する皮下免疫療法が喘息など他のアレルギー疾患の発症を予防することを示した報告がある。例えば PAT-study (Moller C, et al. J Allergy Clin Immunol 2002) では、喘息のない小児花粉症患者を対象とし、3 年間の免疫療法の有無による治療終了 2 年後の喘息発症率を比較したところ、免疫療法を施行しなかった群での喘息発症率 (44.4%) に比較して免疫療法群では喘息発症率が 24.1% と半減することが示されている。今回の検討では、PAT-study などとも比較して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。一方、新規気管支喘息発症率が非常に低いこともあり、新規気管支喘息発症の背景は明らかでなかった。今後は症例数を増やした多施設での検討、あるいはより長期的な検討により、スギ・ヒノキ花粉症に対する皮下免疫療法が他のアレルギー疾患の発症を予防できるのか検証を進める必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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.

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: 124-131, 2011.

3) 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.

4) 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).

5) 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.

6) 岡野光博. スギ花粉飛散後の花粉症. *治療* 93: 395-400, 2011.

7) 岡野光博. 耳鼻科における皮下アレルギー免疫療法. *アレルギー・免疫* 18: 21-31, 2011

8) 岡野光博. 疾患と病態生理: アレルギー性鼻炎. *JOHNS* 27: 1227-1233, 2011.

9) 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.

10) 岡野光博. 脂質メディエーターと PPAR. *JOHNS* 27: 1745-1750, 2011.

11) 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.

12) 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) 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).

2) 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(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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujimura T, Yonekura S, Horiguchi S, Taniguchi Y, Saito A, Yasueda H, Inamine A, Nakayama T, Takemori T, Taniguchi M, Sakaguchi M, 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.	<i>Clinical Immunology.</i>	139	65-74	2011
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.	<i>Journal of Allergy and Clinical Immunology</i>	277	277-279	2011
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	<i>Allergol Int.</i>	60	87-92	2011
岡野光博	耳鼻科における皮下アレルギー免疫療法	アレルギー・免疫	18	21-31	2011
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	201-207	2011
Inamine A, Sakurai D, Horiguchi S, Yonekura S, Hanazawa T, Hosokawa H, Matuura-Suzuki A, Nakayama T, Okamoto Y.	Sublingual administration of <i>Lactobacillus paracasei</i> KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via upregulation of PD-L2 on dendritic cells.	<i>Clinical Immunology</i>	<i>Doi:10.1016</i>		2012
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.	<i>American Journal of Rhinology and Allergy</i>	<i>in press</i>		2012

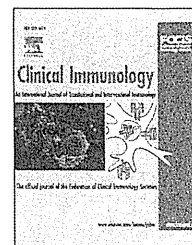


ELSEVIER

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Clinical Immunology

[www.elsevier.com/locate/yclim](http://www.elsevier.com/locate/yclim)



## Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in 2-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis

Takashi Fujimura<sup>a,1</sup>, Syuji Yonekura<sup>a</sup>, Shigetoshi Horiguchi<sup>a</sup>,  
Yuriko Taniguchi<sup>b</sup>, Akemi Saito<sup>c</sup>, Hiroshi Yasueda<sup>c</sup>, Ayako Inamine<sup>a</sup>,  
Toshinori Nakayama<sup>b</sup>, Toshitada Takemori<sup>d</sup>, Masaru Taniguchi<sup>d</sup>,  
Masahiro Sakaguchi<sup>e</sup>, Yoshitaka Okamoto<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

<sup>b</sup> Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

<sup>c</sup> Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, Sagami National Hospital, Kanagawa, Japan

<sup>d</sup> Research Center for Allergy and Immunology, Yokohama Institute, RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), Kanagawa, Japan

<sup>e</sup> Department of Veterinary Microbiology, School of Veterinary Medicine, Azabu University, Kanagawa, Japan

Received 24 September 2010; accepted with revision 31 December 2010

### KEYWORDS

Allergic rhinitis;  
Biomarker;  
Immunotherapy;  
Japanese cedar pollinosis;  
Regulatory T cell;  
Sublingual immunotherapy

**Abstract** The aims of this study were to examine the therapeutic effects of sublingual immunotherapy (SLIT) and to identify potential biomarkers that would predict the therapeutic response in a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. The trial was carried out over two pollinosis seasons in 2007 and 2008. Carry-over therapeutic effects were analyzed in 2009. SLIT significantly ameliorated the symptoms of pollinosis during the 2008 and 2009 pollen seasons. Cry j 1-specific cytokine production in a subgroup of patients with mild disease in the SLIT group was significantly attenuated. The ratio of specific IgE to total IgE before treatment correlated with the symptom-medication score in the SLIT group in 2008. Patients with increased

*Abbreviations:* DBPC, double-blind, placebo-controlled; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ELISPOT, enzyme-linked immunospot assay; iTreg, induced regulatory T cells; ITT analysis, intention-to-treat analysis; JAU, Japanese allergy unit; N.S., not significant; OT analysis, on-treatment analysis; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; RAST, radioallergosorbent test; SLIT, sublingual immunotherapy; SMS, symptom-medication score; Treg, regulatory T cells; QOL, quality-of-life.

\* Corresponding author. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1, Inohara, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan. Fax: +81 43 227 3442.

*E-mail address:* [yokamoto@faculty.chiba-u.jp](mailto:yokamoto@faculty.chiba-u.jp) (Y. Okamoto).

<sup>1</sup> Present address: Research Center for Allergy and Immunology, Yokohama Institute, RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), Kanagawa, Japan.

Cry j 1-iTreg in the SLIT group had significantly improved QOL and QOL-symptom scores. In summary, the specific IgE to total IgE ratio and upregulation of Cry j 1-iTreg are candidates for biomarker of the clinical response to SLIT.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollinosis is a common allergy in Japan, with a prevalence estimated to be 26.5% in a nationwide survey conducted in 2008 [1].

A 2000 Japanese allergy unit (JAU) sample of standardized extract from Japanese cedar pollen is the only available allergen for subcutaneous and sublingual immunotherapy (SLIT) against pollinosis in Japan. The 2000 JAU extract contains 1.5 to 4.2  $\mu\text{g}$  of the major allergen, Cry j 1 [2]. The common monthly cumulative dose for SLIT is 8000 JAU, which contains approximately 10  $\mu\text{g}$  of Cry j 1. This maintenance dose is 200-fold higher than that used in traditional subcutaneous immunotherapy using 0.2 ml of a 200 JAU/ml extract, which contains approximately 50 ng of Cry j 1. Despite using a low dose of the major allergen compared with that in European trials, positive effects on pollinosis have been shown in randomized double-blind, placebo-controlled (DBPC) studies, in which SLIT significantly ameliorated the symptom score, symptom-medication score (SMS), and quality-of-life (QOL) score [3,4].

SLIT induces Cry j 1-specific IgG4 production and attenuates the seasonal increase in the number of Th2 cells specific to epitopes from Cry j 1 and Cry j 2 [3]. Involvement of antigen-specific Tr1 cells or regulatory T cells (Treg) in the therapeutic mechanism has also been suggested [5,6]. We previously found that SLIT increased the levels of Cry j 1-specific induced Treg cells (Cry j 1-iTreg; IL10<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells in CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> leukocytes) and that the increase in Cry j 1-iTreg after the pollen season may serve as a response monitoring biomarker that correlates with a positive therapeutic effect based on the QOL-symptom score and distinguishes responders from non-responders after SLIT [6].

In this report, we examined the reproducibility of the positive therapeutic effects and safety of SLIT and upregulation of iTregs as a response monitoring biomarker, with the goal of confirming our previous results in a larger randomized DBPC study. Therefore, the safety and clinical effect of SLIT for Japanese cedar pollinosis were used as the primary endpoint, and carry-over effects, immunological changes, and biomarkers for a positive clinical effect induced by SLIT were secondary endpoints.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population

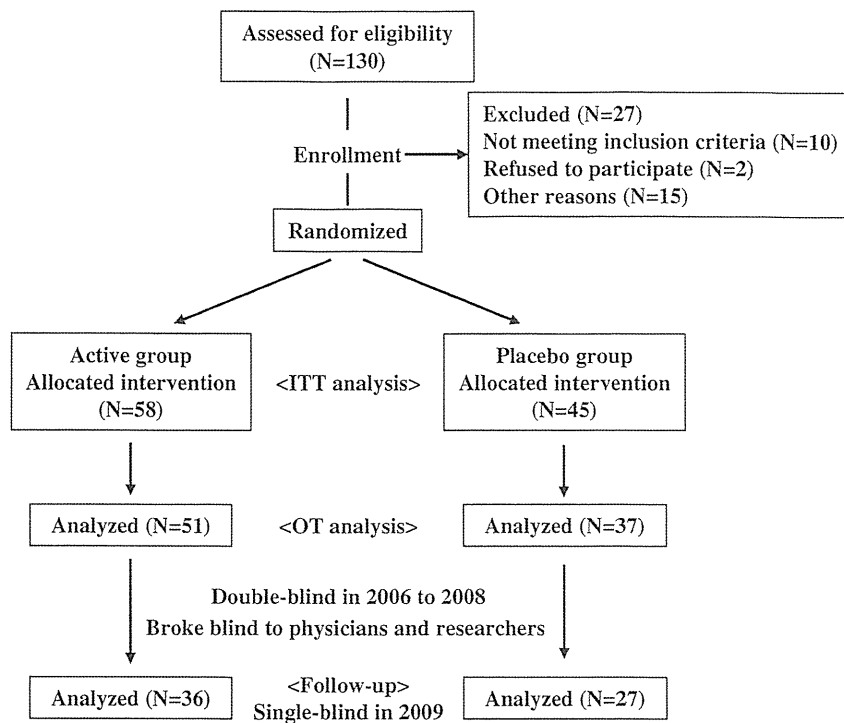
The study was conducted as a randomized, DBPC, parallel-group, single center trial in subjects with Japanese cedar pollinosis. This study was performed for two pollen seasons between September 2006 and May 2008, with follow-up in the pollen season in 2009. We recruited 130 participants in

September 2006. Diagnosis of Japanese cedar pollinosis was based on clinical history and the presence of IgE specific to Japanese cedar pollen of at least class 2 (CAP-RAST method, Phadia, Tokyo, Japan). Participants with a history of immunotherapy or a diagnosis of asthma, or those who were pregnant, were excluded from the study. Patients who suffered seasonal or chronic rhinitis that required medical treatment were also excluded.

A total of 103 patients were eligible for the study, and all had moderate or severe symptoms in the previous pollen season [7]. We anticipated that some participants in the SLIT group would drop out from the study due to side effects and we planned to evaluate the risk of mild or severe side effects due to the vaccination. Therefore, we randomly divided the patients into treatment (SLIT) and placebo groups with a ratio of 6:4 according to the table of random numbers prepared by the Department of Pharmacy at Chiba University Hospital (Fig. 1). The sample size was determined based on a previous study [3]. Briefly, we planned to have 50 patients in each group with anticipation of dropout. We set 1.0 as a magnitude for the difference of average SMS between that from the SLIT and placebo groups and 1.5 as a standard deviation according to the result of previous study. Therefore, when the power was set to 0.8 and the  $\alpha$ -error to 0.05, the number of required cases was 35 in each group. A person who was not directly involved in the study was responsible for group allocation. To prevent leakage of information, the allocation table was kept by this person and a member of the ethics committee who was also not directly involved in the study, until accessed with the key after completion of the study. The protocol was approved by the Ethics Committee of Chiba University, and written informed consent was obtained from each patient prior to participation in the study.

### 2.2. Clinical protocols

The SLIT group included 58 patients who received standardized Japanese cedar pollen extract (Torii Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) [8], and the placebo group included 45 patients who received an inactive placebo. The protocol consisted of treatment with graded courses of the extract in 50% glycerol, followed by maintenance therapy [6]. Briefly, the extract was graded in three strengths: 20, 200, and 2000 JAU/ml. Patients received increasing doses with each vial, beginning with 0.2 ml from the 20 JAU/ml vial and increasing by 0.2 ml a day for 5 days per week. The vaccine was taken sublingually, kept in place for 2 min without a retention reagent, and then spit out. The procedure was repeated until the maximum dose (1.0 ml of 2000 JAU/ml) was reached. The maintenance dose was 1.0 ml of 2000 JAU/ml given once a week until the end of May 2008. The patients in the placebo group received inactive 50% glycerol in saline. All participants were allowed to take symptom-reducing drugs as needed.



**Figure 1** Flow diagram for groups and individuals in the phases of the randomized trial. Fifteen participants from the SLIT ( $N=7$ ) and placebo ( $N=8$ ) groups were lost to follow-up due to reasons such as moving house and transfer. The double-blind status was maintained until completion of analysis of all clinical and immunological parameters (December 2008). Follow-up analysis in 2009 was undertaken in a single-blind manner.

### 2.3. Clinical symptoms and safety measurements

The patients completed a pollinosis diary to record their nasal symptoms and use of symptom-reducing drugs in the 2007, 2008, and 2009 pollen seasons. The total amounts of pollen scattered from Japanese cedar and Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) in Chiba prefecture were 2777, 6596, and 5486 grains/cm<sup>2</sup> during the 2007, 2008, and 2009 pollen seasons, respectively, based on measurements with a Durham pollen sampler. The duration and amount of scattered Japanese cedar pollen differed greatly among these years, but the daily amount of scattered pollen typically followed a wide-based bell-shaped curve over the whole pollen season from the middle of January or early February to the middle or end of May. The duration of the peak pollen season was relatively constant in the 3 years, and therefore, we analyzed the SMS during the peak period. The peak pollen season was defined as the period from the first day that the pollen count was  $\geq 20$  grains/cm<sup>2</sup>/day for 3 consecutive days until the last day that the pollen count was  $\geq 20$  grains/cm<sup>2</sup>/day before a period in which the pollen count was  $< 20$  grains/cm<sup>2</sup>/day for 7 consecutive days.

The daily SMS was calculated as described previously [3]. Briefly, daily episodes of sneezing and nose blowing were rated as 0–4: none, 0; 1–5 episodes, 1; 6–10 episodes, 2; 11–20 episodes, 3; >20 episodes, 4. Daily medication was recorded based on drug types and duration of usage using the following guidelines: antihistamines, mast cell stabilizers, and vasoconstrictors, 1; topical ocular or nasal steroids, 2. Patients with an average daily SMS in the peak pollen season of  $\leq 4$  were

judged to have mild symptoms based on guidelines for allergic rhinitis [7].

In the middle of the 2007 and 2008 pollen seasons, the participants completed the Japanese Allergic Rhinitis QOL Standard Questionnaire No.1 (JRQLQ No.1) for assessment of QOL-symptom and total QOL scores [9]. These scores were calculated as previously described [4,6]. The total QOL-symptom score was calculated as the sum of each component score: none, 0; mild, 1; moderate, 2; severe, 3; and very severe, 4. Nasal and ocular symptoms covered by the questionnaire included runny nose, sneezing, nasal congestion, itchy nose, itchy eyes, and watery eyes. Adverse events were graded using Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v.3.0 [10]. Briefly, adverse events were graded as mild, grade 1; moderate, grade 2; severe, grade 3; life threatening, grade 4; death, grade 5 according to a category for allergy/immunology in the CTCAE v.3.0 scoring system.

### 2.4. Blood samples

Peripheral blood was obtained from each patient before treatment (September to October 2006) and before and after the pollen seasons in 2007 (December 2006 to January 2007, and May to June 2007, respectively) and 2008 (November to December 2007, and May 2008, respectively). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated, frozen, and stored in liquid nitrogen [6]. However, the PBMCs isolated before treatment, and before and after the 2007 pollen season were damaged during storage and we were unable to



analyze their immunological responses. Therefore, immunological data were obtained only from PBMCs collected before and after the 2008 pollen season.

## 2.5. Total and antigen-specific immunoglobulin titer

The Cry j 1-specific IgE and IgG4 titers in plasma were measured by ELISA [3,11]. Total IgE and specific IgE titers for Japanese cedar, orchard grass, mugwort, and house dust mites were evaluated by the CAP-RAST method (Phadia).

## 2.6. Flow cytometric analysis

The levels of Cry j 1-iTreg were analyzed by flow cytometry [6]. Briefly, PBMCs were cultured with or without Cry j 1 for 3 days, followed by a culture with 10 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate, 1  $\mu$ M ionomycin, and 2  $\mu$ M monensin for 6 h. The PBMCs were stained with PE-Cy7-anti-CD4 antibody, APC-anti-IL10 antibody (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), PE-anti-CD25, and FITC-anti-Foxp3 (clone: PCH101) using a Foxp3 staining buffer set (eBioscience, San Diego, CA, USA).

## 2.7. Analysis of the number of IL4-producing cells and the concentration of cytokines

The number of IL4-producing cells stimulated with Cry j 1 was determined by enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay, and the concentrations of IL2, IL5, and IL13 in the culture supernatant were measured using a BD™ Cytometric bead assay (CBA) Flex system (BD Biosciences) [6]. Briefly, a 96-well sterile filter plate (Millipore, Billerica, MA, USA) was coated with monoclonal antibody to human IL4 (Mabtech AB, Nacka Strand, Sweden). The plate was pre-incubated with AIM-V medium at 37 °C for 1 h. The medium was discarded, and then PBMCs ( $3 \times 10^5$  cells/well) were cultured with fresh medium alone or with 10  $\mu$ g/ml Cry j 1 for 17 h at 37 °C in AIM-V medium containing 5% human AB serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The plates were then incubated with a biotinylated monoclonal antibody to human IL4 for 2 h, and then with streptavidin-conjugated alkaline phosphatase for 1 h at room temperature. After washing with PBS, the plates were incubated with BCIP/NBT<sup>PLUS</sup> (Mabtech) for 5 min at 37 °C. For the CBA, isolated PBMCs were cultured at  $2.5 \times 10^6$  cells/ml with or without 5  $\mu$ g/ml Cry j 1 for 3 days at 37 °C in AIM-V medium containing 5% human AB serum (Sigma-Aldrich). After centrifugation at 300 $\times$ g for 10 min, the supernatant was divided into aliquots and stored at -20 °C until the cytokine assay was performed.

## 2.8. Data representation

The full analysis set ( $N=103$ ) was used for the intention-to-treat (ITT) analysis and per protocol populations ( $N=88$ ) were used for on-treatment (OT) analysis (Fig. 1). Cry j 1-specific cytokine production is shown as the difference between cells stimulated with Cry j 1 and controls stimulated with medium only. Changes after the 2008 pollen season are shown as differences between pre- and post-pollen season values.

## 2.9. Statistical analysis

Two-group comparisons were performed using a Wilcoxon *t*-test or Mann–Whitney *U*-test to determine the significance of differences, or using an unpaired *t*-test as indicated. *P*-values <0.05 were considered to be significant.

## 3. Results

### 3.1. Clinical effects and adverse events

A total of 103 patients were included in the overall analysis of efficacy for the 2007 and 2008 pollen seasons. These patients were randomly divided into the SLIT ( $N=58$ ) and placebo ( $N=45$ ) groups at a ratio of 6:4. Diaries and QOL questionnaires for 88 patients were available at the end of the DBPC study. The overall randomized population was considered to be the ITT population. The SMS in the SLIT group did not differ significantly from that in the placebo group in ITT analysis after 2-year SLIT ( $P=N.S.$ ; Student *t*-test, data not shown).

The final sample size included 88 subjects for OT analysis (SLIT;  $N=51$ , placebo;  $N=37$ , ratio 4:3). The demographic characteristics of the OT population before treatment are shown in Table 1. The SMS in the SLIT group did not differ significantly from that in the placebo group in the 2007 peak pollen season (February 19 to March 31,  $P=N.S.$ ; Student *t*-test). However, the average SMS in the 2008 peak pollen season (February 29 to April 1) was significantly ameliorated in the SLIT group compared with the placebo group (4.2 vs. 5.3,  $P=0.02$ ; Student *t*-test). The percentages of subjects with mild symptoms ( $SMS \leq 4$ ) were 55% and 28% in the SLIT and placebo groups, respectively, in the peak pollen

**Table 1** Clinical data of participants at the start of the study.

Group	SLIT	Placebo	<i>P</i> -value
Number	51	37	
Sex (M/F)	17/34	8/29	N.S. <sup>a</sup>
Mean age	44.4	42.3	N.S. <sup>b</sup>
Range	16–73	19–70	
Total IgE [IU/ml]	198	258	N.S. <sup>b</sup>
Range	6.8–1480	8.6–2090	
Specific IgE <sup>c</sup>	27	29	N.S. <sup>b</sup>
Range	0.8–100	1.5–100	
Class [mean]	3.5	3.8	N.S. <sup>b</sup>
Range	2–6	2–6	
Other allergies <sup>d</sup> (%)			
Orchard grass	16 (31%)	11 (30%)	N.S. <sup>e</sup>
Mugwort	5 (10%)	3 (8%)	<0.05 <sup>f</sup>
House dust mite	24 (47%)	13 (35%)	N.S. <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Yates  $2 \times 2$  Chi-squared test.

<sup>b</sup> Student *t*-test.

<sup>c</sup> Specific IgE to Japanese cedar pollen; CAP-RAST raw value [kAU/L], mean.

<sup>d</sup> Number of subjects with specific IgE of at least CAP-RAST class 2.

<sup>e</sup>  $2 \times 2$  Chi-squared test.

<sup>f</sup> Fisher exact probability.

season (Fig. 2A). QOL-symptom and total QOL scores were also significantly ameliorated in the SLIT group compared to those in the placebo group in the middle of the 2008 pollen season (Fig. 2B).

There were no severe adverse events that required a patient to withdraw from the study; however, some subjects reported adverse events of mild discomfort: six of grade 2 (oral pruritus: 2; gingivostomatitis: 2; asthma: 1; rash in nasal cavity: 1) in the SLIT group (6/51; 11.8%); and one of grade 1 (bitter taste) in the placebo group (1/37; 2.7%).

### 3.2. Immunoglobulin production

There were no significant differences in Cry j 1-specific IgE and IgG4 production between patients in the SLIT and placebo groups before treatment, or before and after the pollen seasons. The SLIT group was divided into subgroups based on the SMS in the 2008 peak pollen season: a mild subgroup with SMS  $\leq 4$  (classified as responders;  $N=28$ ) and a severe subgroup with SMS  $>4$  (non-responders;  $N=23$ ). IgE

and IgG4 production in patients in the mild subgroup were both similar to those in patients in the severe subgroup and in the placebo group at various time points (data not shown).

### 3.3. Cry j 1-specific cytokine production

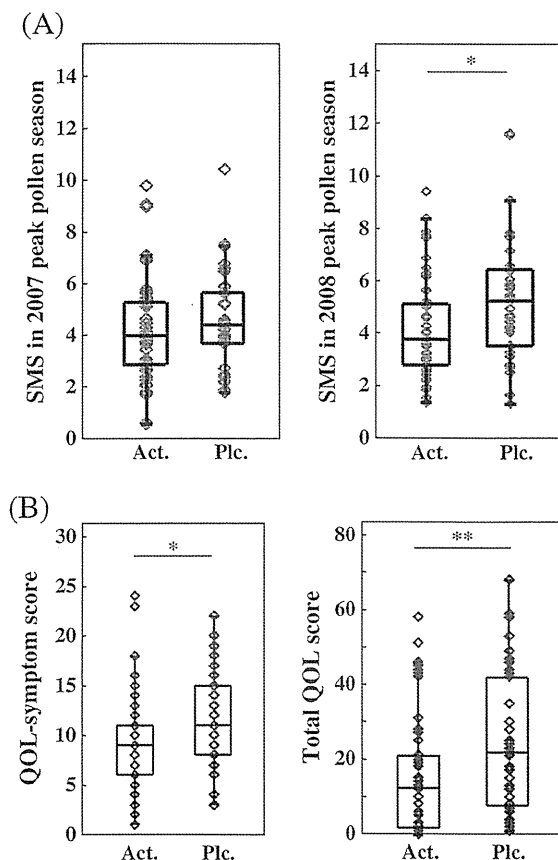
IL2, IL5, and IL13 levels were analyzed in the culture supernatant. The number of IL4-producing cells was measured by ELISPOT because IL4 was undetectable in the supernatant. There were no significant differences between the SLIT and placebo groups in the production of each cytokine following stimulation with Cry j 1 (Fig. 3A). IL5 was significantly increased after the pollen season in all groups ( $P<0.05$ ; Wilcoxon  $t$ -test), and the IL2 and IL13 levels and the number of IL4-producing cells were significantly increased after the pollen season in the SLIT and placebo groups and in the severe subgroup ( $P<0.05$ ; Wilcoxon  $t$ -test). Patients in the mild subgroup (responder to SLIT) did not show significant increase of IL2 and IL13 or of IL4-producing cells after the pollen season ( $P=N.S.$ ; Wilcoxon  $t$ -test). The increases in the number of IL4-producing cells and IL5 level after the pollen season in the mild subgroup were significantly less than those in the severe subgroup (non-responders) and the placebo group. The increase of IL13 in the mild subgroup was significantly less than that in the severe subgroup and showed a tendency to be attenuated compared with the placebo group ( $P=N.S.$ ; Mann-Whitney  $U$ -test). The increase of IL2 in the mild subgroup was significantly less than that in the placebo group ( $P<0.05$ ) and showed a tendency to be attenuated compared with the severe subgroup ( $P=0.053$ ; Mann-Whitney  $U$ -test, Fig. 3B).

### 3.4. Prognostic biomarkers for clinical effects

The average ratio of Japanese cedar pollen-specific IgE to total IgE (slgE/tIgE ratio) in all patients in the study was 0.193 before treatment. The SLIT group was divided into subgroups with a slgE/tIgE ratio  $\leq 0.19$  (low,  $N=28$ ) and  $>0.19$  (high,  $N=23$ ) before treatment. Similar subgroups were established in the placebo group. The SMS in the 2008 peak pollen season for the low subgroup was significantly improved compared to that in the high subgroup in the SLIT group ( $P=0.02$ ; Mann-Whitney  $U$ -test); however, in the placebo group, the low and high subgroups had comparable SMSs ( $P=N.S.$ ; Mann-Whitney  $U$ -test, Fig. 4A). Furthermore, the SMS was correlated with the slgE/tIgE ratio in the SLIT group ( $R_s=0.39$ ,  $P<0.01$ ; Spearman correlation analysis), but not in the placebo group ( $R_s=0.08$ ,  $P=N.S.$ ; Spearman correlation analysis, Fig. 4B).

### 3.5. Upregulation of Cry j 1-iTreg levels as a response monitoring biomarker

A population of IL10<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells in CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> leukocytes was evaluated as a potential marker for iTreg after stimulation with Cry j 1 or medium only before and after the pollen season in 2008. Neither the changes in Cry j 1-iTreg levels after stimulation with and without Cry j 1 nor the upregulation of Cry j 1-iTreg from pre- to post-pollen season differed significantly different between the groups (data not shown).



**Figure 2** Clinical scores after 2-year SLIT. (A) Average daily symptom-medication scores (SMS) in the SLIT (Act.;  $N=51$ ) and placebo (Plc.;  $N=37$ ) groups in the 2007 and 2008 peak pollen seasons. (B) QOL-symptom and total QOL scores from the QOL questionnaire were plotted for the SLIT (Act.;  $N=51$ ) and placebo (Plc.;  $N=37$ ) groups in the middle of the 2008 pollen season. Each diamond shows a value for an individual. Two-group comparisons were performed using an unpaired Student  $t$ -test. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

We previously reported that upregulation of Cry j 1-iTreg is a candidate biomarker that may distinguish SLIT responders from non-responders based on QOL-symptom scores [6]. Therefore, we divided the SLIT group into subgroups based on an increase ( $N=24$ ) or decrease ( $N=27$ ) in Cry j 1-iTreg levels from before to after the pollen season in 2008. QOL-symptom and total QOL scores in the increased iTreg subgroup significantly improved compared with those in the placebo group. In contrast, the scores in the decreased iTreg subgroup were similar to those in the placebo group (Fig. 4C).

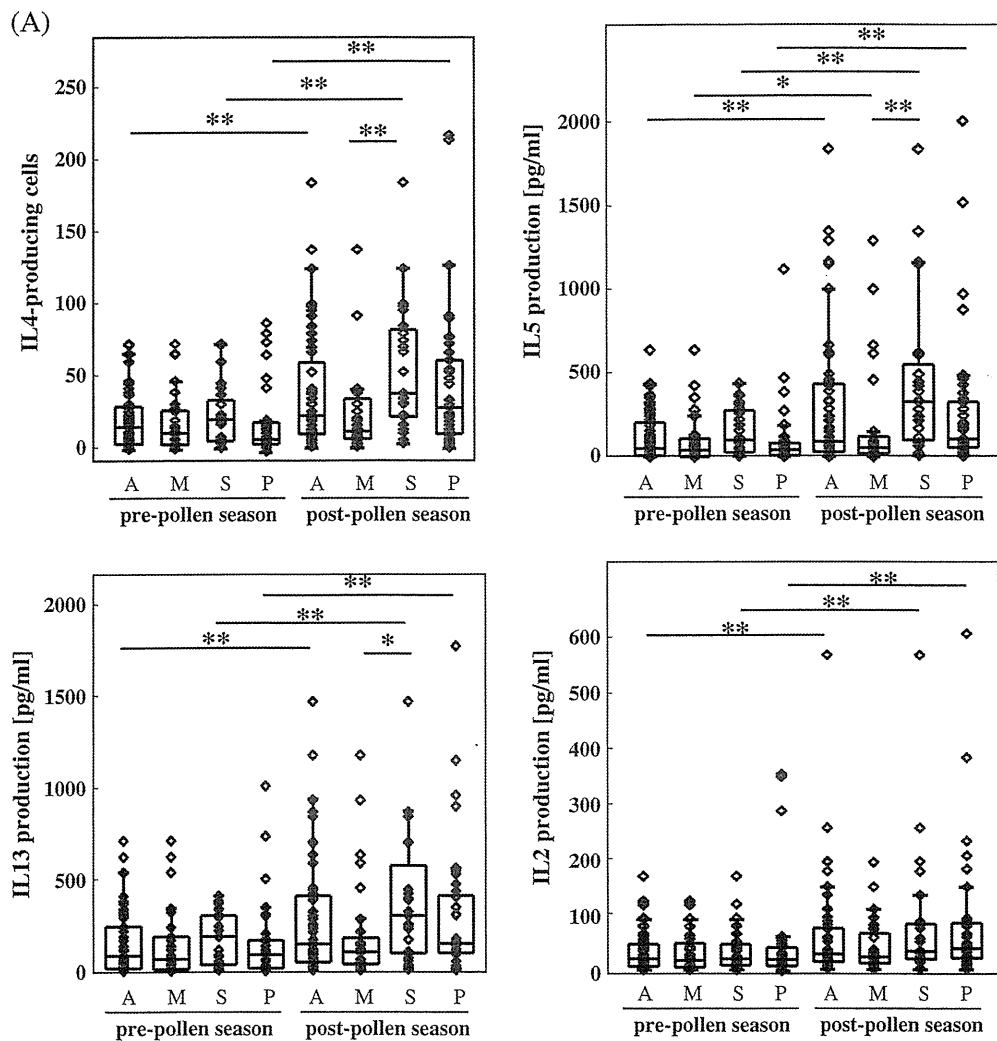
### 3.6. Carry-over effects in the year after treatment

A total of 63 patients completed a pollinosis-symptom diary during the 2009 pollen season; 1 year after the 2-year SLIT

treatment (Fig. 1). All participants remained blinded to their treatment with SLIT or a placebo. The SMS in the peak pollen season in 2009 (February 15 to March 6) in the SLIT group ( $N=36$ ) was significantly attenuated compared to the placebo group ( $N=27$ ,  $P=0.03$ ). The average SMSs for the SLIT and placebo groups were 3.5 and 4.5, respectively, in the peak pollen season (Fig. 5).

## 4. Discussion

The primary endpoint of this randomized DBPC trial was the therapeutic effect evaluated in ITT analysis. No significant positive effect was observed between the SLIT and placebo groups after exchanging the perceived improvement of patients who dropped out with each median score from the counter group. In OT analysis, the SMS in the SLIT group was



**Figure 3** Cytokine production from PBMCs. (A) Number of Cry j 1-specific IL4-producing cells and Cry j 1-specific cytokine levels in the SLIT group (A;  $N=51$ ), the mild subgroup of the SLIT group (M;  $N=28$ ), the severe subgroup of the SLIT group (S;  $N=23$ ), and the placebo group (P;  $N=37$ ) at before and after the 2008 pollen season. Comparisons with a significant difference are indicated as \* and \*\*; otherwise, comparisons are not significantly different ( $P=N.S.$ ). (B) Increases in the number of Cry j 1-specific IL4-producing cells and Cry j 1-specific cytokine levels occurred from before to after the 2008 pollen season in the SLIT group (Act.;  $N=51$ ), the mild subgroup of the SLIT group (Mild;  $N=28$ ), the severe subgroup of the SLIT group (Sev.;  $N=23$ ), and the placebo group (Plc.;  $N=37$ ). Each diamond shows the value for an individual. Two-group comparison was performed using a Mann-Whitney  $U$ -test. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

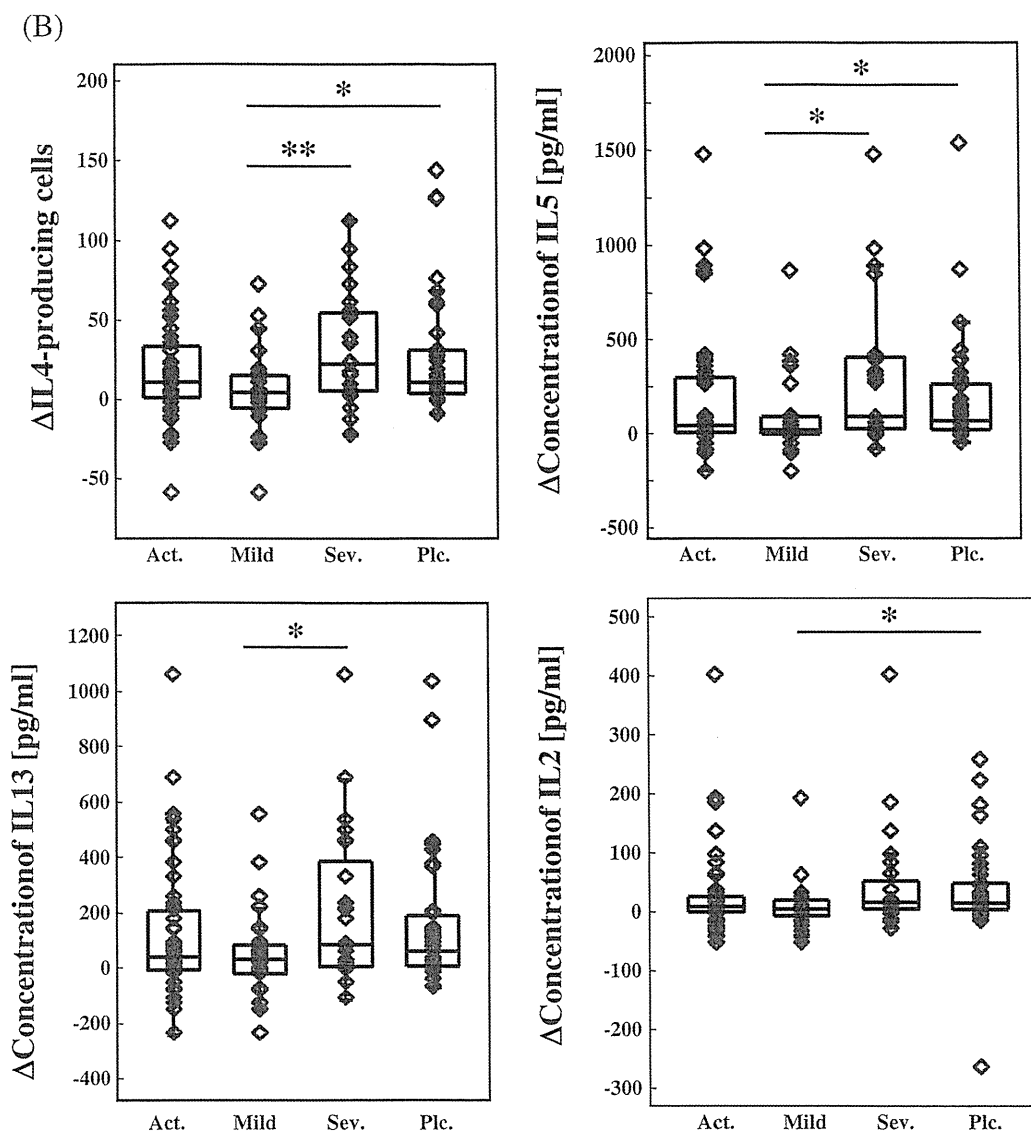


Figure 3 (continued).

significantly ameliorated compared to the placebo group in 2008. The percentage of mild subjects ( $SMS \leq 4$ ) in the SLIT group was 28% higher than that in the placebo group (SLIT, 55%; placebo, 27%), and the SMS was reduced by approximately 21% in the SLIT group compared with the placebo group (SLIT, 4.2; placebo, 5.3). This percentage of mild subjects differ significantly between the SLIT and placebo groups ( $P=0.009$ ;  $2 \times 2$  Chi-squared test). These effects following 2-year treatment were comparable to those in a trial of 1-year daily treatment using grass pollen tablets [12]. The low dose of the extract (about 1/40th of that used in Europe) may be one reason for the poor clinical outcome in the first year [13]. An extract of concentration  $>2000$  JAU is not available for clinical use in Japan, and the clinical effects, safety, and optimum schedule for administration of an extract with a much higher allergen concentration remain unclear.

Positive clinical therapeutic effects were not obtained following 1-year treatment in our study, even in OT analysis

(data not shown). In contrast, two previous reports demonstrated positive therapeutic effects after 1-year SLIT for Japanese cedar pollinosis [3,4]. However, in these studies, the annual pollen count ( $1154$  grains/cm<sup>2</sup>/season) [3] was less than in our study, and daily SMS was significantly attenuated on only 4 days in the pollen season [4]. The severity of SMS is affected by the amount of Japanese cedar pollen in the total and peak pollen season. Natural resolution and tolerance are not usually induced by natural exposure to Japanese cedar pollen, regardless of the amount of pollen [14].

Whether there are detectable alterations in peripheral T-cell responses after specific immunotherapy is still under debate [15–18]. The Cry j 1-specific cytokine profile from the SLIT group did not differ significantly from that in the placebo group. However, the increases in IL2, IL4, IL5, and IL13 production in the mild subgroup in the SLIT group were significantly attenuated (or showed a tendency to be attenuated) compared to the severe subgroup and the placebo