

201322006A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

(免疫アレルギー疾患等予防・治療事業 免疫アレルギー研究分野)

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡本 美孝

平成26 (2014) 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 2

II. 分担研究報告

1. スギ花粉感作陽性者に対する舌下免疫療法の発症予防効果の検討、ならびに
スギ花粉エキスをを用いた免疫療法のヒノキ花粉症への影響に関する研究

岡本 美孝 8

2. アレルゲン免疫療法に関するアンケート調査とバイオマーカーおよび予防的
二次介入の検討

櫻井 大樹 11

3. スギ花粉症発症に関する遺伝子の同定

藤枝 重治 13

4. スギ花粉症の感作と発症および舌下免疫療法の効果に関連する因子の検討

竹内 万彦 16

5. 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 19

6. アレルゲン舌下免疫療法に対する小児科医の認知：千葉県内小児科医への
アンケート調査

下条 直樹 22

7. スギ花粉症における minimal important difference (MCID)に関する検討

岡野 光博 26

III. 研究成果の刊行に関する一覧

. 29

IV. 研究成果の刊行物・別刷

. 30

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の作成に取り組むことを目的に、本年度は以下の検討を行った。

(1) 研究班にて作成したアレルギー性鼻炎治療の内容、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患者への調査をおこなった。また、アレルギー性鼻炎患者を診察する機会を有する耳鼻咽喉科医、内科医、小児科医を対象に現在の治療法の評価、舌下免疫療法への関心や実施に関するアンケート調査を行った。現在のアレルギー性鼻炎の治療に対する満足度は成人、小児患者ともに低く、免疫療法への一定の期待がみられた。医師の免疫療法への関心は高く、実施希望者もすべての科の医師に比較的高い割合でみられた。

(2) スギ花粉感作陽性でかつ未発症者を対象に、スギ花粉エキスによる舌下免疫療法を用いた発症予防についての介入試験を、プラセボエキス（溶剤）を対照とした2重盲検試験を行った。4施設での参加症例は平成25年4月末では230例で、3施設では実薬群に有意に発症抑制効果が認められ、実薬群では特異的な制御性T細胞の増加も確認された。

(3) スギ花粉症患者群、感作陽性未発症者群、非アレルギー群からなる参加者を対象に、発症に及ぼす好塩基球、T細胞、鼻粘膜上皮細胞の検討を行った。好塩基球の抗原に対する反応性、および血清IgEとFcεRIとの反応性は発症者と比較して感作陽性未発症者では低い傾向がみられた。発症者では大量のTh2サイトカインを産生するCD4陽性メモリーT細胞が存在した。また、発症者ではCystatin SNが高発現しており、発症マーカーになる可能性が示唆された。

(4) ヒノキ花粉症の特徴とスギ花粉エキスを用いた免疫療法の有効性について花粉飛散室を用いた検討を行った。ヒノキ花粉症症状は同じ濃度のスギ花粉曝露に比較して誘導する鼻症状は軽く評価を困難にしているが、T細胞の反応性の検討からはスギ花粉免疫療法はヒノキ花粉症に対しても一定の効果が期待される結果であった。

(5) 舌下免疫療法のアジュバントとしてNKT細胞のリガンドであるα-GalCerを含むリポソームの有効性についてマウスで確認された。

(6) アレルギー性鼻炎/花粉症患者のQOL調査票の最小変動値の有効性について検討を行い、明らかにした。

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	山本陸三朗	千葉大学大学院医学研究院 先進気道アレルギー学専攻講座 特任助教
竹内 万彦	三重大学 耳鼻咽喉・頭頸部外科 教授	櫻井 利興	千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員
大久保公裕	日本医科大学大学院医学研究科頭頸部感覚器科学分野 教授	新井 智之	千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員
下条 直樹	千葉大学大学院医学研究院 小児病態学 教授	坂下 雅文	福井大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 助教
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	意元 義政	福井大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 助教
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	野山 和廉	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
研究協力者		山本 健	千葉大学大学院医学研究院小児病態学
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	増田佐和子	国立病院機構三重病院 耳鼻咽喉科 医長
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	坂井田 寛	三重大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
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	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

アレルギー性鼻炎/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。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アレルギー免疫療法のみである。このアレルギー免疫療法によって新規感作の予防も図れることが欧米で報告され一定のエビデンスがあるものと評価されている。しかし、アレルギー免疫療法が発症の予防効果を有するかどうかについての検討、報告はこれまでない。スギ花粉に感作陽性ながら未発症者は「発症予備軍」として捉えられ、感作陽性者の小学生では約70%、青壮年で約50%に達する。そこで、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アレルギー免疫療法による2次介入の有効性を、このような感作陽性ながら未発症者を対象に検討する。これまでの検討で安全性を確認した舌下免疫療法を用いて、プラセボ対照二重盲検試験から発症予防効果を明らかにし、かつスギ花粉症発症の免疫学的機序についても検討を行う。

一方、今後花粉症治療に期待される舌下免疫療法であるが、医師の舌下免疫療法に対する対応、期待について、また、患者の新規治療に対する期待についてアンケート調査を行う。患者への調査にはバイアスがかからないように住民検診、学校健診参加者の中でアレルギー性鼻炎患者を対象に調査を進める。また舌下免疫療法の確立に向け、作用機序、バイオマーカー、効果予測因子について検討をさらに進めると共にガイドラインの作成に活用できる内容として取り組む。

B. 方法

(1) 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に対して調査を行った。また、アレルギー性鼻炎患者を診察する機会を有する耳鼻咽喉科医、内科医、小児科医を対象に現在の治療法の評価、舌下免疫療法への関心や実施に関するアンケート調査を行った。

(2) 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)を対照とした2重盲検試験を行った。対象者は、スギCAP-RASTスコアが2以上の18歳以上でスギ花粉に感作陽性ながら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陰性であることを確認した感作陽性未発症者である。平成23年12月から平成24年4月末まで、あるいは平成24年12月から平成25年4月末までそれぞれ半年間、連日トリスギ花粉エキス® 2000 JAU/mlを毎朝

1日1回の投与をおこなった。発症の確認はシーズン終了後にスギ抗原ディスクを用いた誘発試験による陽性反応により行った。データを固定後に平成25年8月にキーオープンを行った。スギ特異的IgE抗体値、総IgE値、スギ特異的制御性T細胞数の変動についても検討を行った。

(3) スギ花粉症患者17名、スギ感作陽性未発症者9名、健常者(スギ花粉非感作非発症者)9名を対象に、末梢血を用いてbasophil activation test(BAT)による好塩基球のスギ抗原反応性を検討した。また、RS-ATL8細胞を用いたIgE crosslinking-induced luciferase expression(EXiLE)法を用いてIgE抗体とFcε受容体との反応性について比較検討を行った。

(4) スギ花粉症患者群、感作陽性未発症者群、非アレルギー群からなる参加者を対象に、スギ花粉飛散時期に鼻粘膜を擦過し、抽出したRNAサンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。得られた候補遺伝子を、アレルギー性鼻炎患者由来の下甲介粘膜を用いて発現部位を確認し、同時に培養した鼻粘膜上皮細胞と線維芽細胞において同定した候補遺伝子がどの様な刺激により誘導されるかを確認し、機能解析を行った。

(5) 18ヶ月間、連日スギ花粉エキス投与による舌下免疫療法の有効性を検討したプラセボ対照2重盲検試験に参加したスギ花粉症患者40名を対象に、舌下免疫療法の有効性を示すバイオマーカー、効果予測因子としてスギ花粉特異的Th2細胞、特異的制御性T細胞、EXiLE法によるIgEの反応性、BAT法による好塩基球の反応性、特異的IgE抗体価/総IgE抗体価についての有用性の検討を行った。

(6) スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法のヒノキ花粉症に対する有効性について、舌下免疫療法参加者を対象に花粉飛散室を用いたヒノキ花粉曝露、スギ花粉曝露から検討を行った。また、花粉飛散室でみられる症状とスギ、あるいはヒノキ花粉特異的Th2細胞の変動との関連について解析を行った。

(7) アレルギー性鼻炎モデルマウスを用い、NKT細胞のリガンドであるα-GalCerを含むリポソームおよび抗原を感作後のマウスの口腔底に投与した。抗原点鼻による症状誘発を行った後、鼻症状・免疫学的パラメーターの解析、症状抑制機序の検討を進めた。

(8) 舌下免疫によるスギ花粉症の治療研究に参加している患者のQOL調査を行った。また、薬物治療も含めたスギ花粉治療の臨床試験に参加したスギ花粉症患者の日本アレルギー性鼻炎標準QOL調査票(JRQLQ)のフェイススケールのデータを基に、QOLスコアの最小変動値(Minimal clinically important difference: MCID)の検出を行った。(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で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) 舌下免疫療法による介入によりスギ花粉症発症予防の有効性を検討する2重盲検試験には全体で230名が完了した。プラセボ群107名では32%が発症し、実薬群123名では22%が発症した(p=0.09)。千葉大学では91名が参加し、プラセボ群40名中37.5%が、実薬群51名中17.7%が発症した(p=0.03)。未発症者ではスギ花粉(Cry j)特異的制御性T細胞数が有意に高値であった。一方、発症者では花粉飛散シーズン後の特異的IgE値が高く、シーズン前の特異的IgE値/総IgE値が低い傾向がみられた。三重大学では33名が参加し、プラセボ群17名では47%、実薬群16名では25%に発症を認めた。実薬群ではIL-10産生T細胞、B細胞、単球がいずれも増加した。鹿児島大学では10例中、プラセボ群の1名のみが発症していた。一方、福井大学では84名が参加したが、プラセボ群39名中26%、実薬群45名中31%が発症した。

(2) 末梢血のBAT法、EXiLE法の検討から感作陽性未発症者において、好塩基球の反応性は特異的IgEの濃度に依存する結果であったが、好塩基球の抗原に対する反応性、および血清IgEとFcεRIとの反応性は発症者と比較して感作陽性未発症者では低い傾向がみられた。

(3) マイクロアレイ解析で、スギ花粉症患者群と非アレルギー群との間で最も発現に違いがあったCystatin SN(CST-1)は花粉症患者で151.4倍増加していた。コントロール群と感作陽性未発症者には有意な変化は認めなかった。3群間でのスギ抗原に対する皮内反応の陽性者と陰性者間では皮内反応陽性者では有意に陰性者よりCystatin SNが高発現していた。Cystatin SNは鼻粘膜上皮に存在していることが免疫染色で確認され、培養鼻粘膜上皮細胞では、Cystatin SNはスギ花粉(粗抗原)とprotease活性を有するpapain、その他スギ花粉、IL-4とIL-13、IL-25とTSLPとの共刺激により誘導された。鼻粘膜にスギ花粉投与を行うと、スギ花粉のみの刺激では鼻粘膜のZO-1、claudin-1のmRNAが減少したが、花粉を前もってCystatin SNと培養したものでは発現減少が抑制された。

(4) 舌下免疫療法の作用機序としてEXiLE法による検討

から、プラセボ群では花粉飛散期にスギIgE値およびmax EXiLE値が増加したが、実薬群ではIgEのみ上昇を認め、max EXiLE値の上昇は抑えられていた。実薬群におけるIgE値の上昇とmax EXiLE値の変動に関連は認めなかった。

(5) スギ花粉症患者25名に花粉飛散室でスギ花粉8000個/m³の濃度で3時間、ヒノキ花粉8000個/m³ならびに12000個/m³の濃度で3時間の曝露試験を行ったが、いずれもヒノキ花粉に比較して有意に強い鼻症状がスギ花粉曝露で認められた。ただ、喉頭症状はヒノキ花粉曝露で強く認められた。

(6) 次にヒノキ花粉12000個/m³の濃度で2日連続で3時間の花粉曝露を行いその前後で末梢血中のヒノキならびにスギ花粉特異的Th2細胞数をELISPOT法により解析したところ症状が強く発現した症例ではヒノキ特異的Th2細胞が有意に上昇し、また同時にスギ花粉に対するTh2細胞数も増加していた。一方、曝露前の特異的Th2細胞数には曝露症状の強弱での差は認めなかった。

(7) 鼻アレルギーモデルマウスの検討から、α-GalCerを含むリポソームを抗原と共に口腔底に投与すると有意な改善を認め、特異的IgE値の低下、リンパ節T細胞からのTh2型サイトカインの産生抑制、IFN-γ産生増加を認めた。

(8) 昨年に続いてアレルギー性鼻炎の治療内容に関するアンケートによる調査を対象患者を増やして行った(2810名)。成人患者では最近受けた治療は、花粉症患者では病院での治療が64%であったが、通年性では45%程度で無治療患者も39%と多かった。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%台にとどまった。治療に対する不満の理由は効果不十分が半数を越えて最も多く、眠気などの副作用も40%程度であった。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。小児患者では通年性アレルギー性鼻炎患者の無治療者は少なかったが、治療に対する保護者の満足度はやや満足以上で20%前後と成人患者に比べてもさらに低値であった。一方、抗原特異的免疫療法への期待度は25%程度で、無回答者も多く免疫療法に対する患者の認知度は低い結果であった。

(9) 医師へのアンケート調査では、患者が現在の治療に満足、あるいはほぼ満足していると考えている医師は耳鼻咽喉科医で45%、内科医で26%、小児科医で36%であり、舌下免疫療法に関心のある医師は80-90%に達し、病院勤務医、診療所医師に関わらず期待が高かった。舌下免疫療法を実施する、検討するといった医師は70%を越えていたが、実施に当たっては一定の講習会など教育の必要性の指摘が半数以上を占めた。

(10) JRQLQのフェイススケール1変動に対応する総QOLスコアの変化値であるMCIDは5年間の花粉飛散シーズンでの検討から平均で6.804で1項目当たりでは0.400であった。年ごとの変化は少なく、抗原曝露量、あるいは治療薬の影響も少なかった。

(11) 舌下免疫療法を行っているスギ花粉症患者の経年的なQOL調査からは花粉飛散が多いと2年間の施行症例では3年以上の症例に比較してQOLスコアが低かった。

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るべく、プラセボ投与を対照にした2重盲検試験を多施設共同試験として行った。その結果、230名の解析が可能で、実薬投与群で発症が抑制される傾向にあった。試験参加3施設では有意に実薬群に高い抑制効果が確認されたが、1施設の症例では差がみられなかった。舌下免疫療法については従来から治療脱落率が高いことが報告されており、今後、アレルギー疾患治療における舌下免疫療法を普及させるうえで大きな課題とされる。特に今回のような発症予防試験では実際にエキスの投与を続けているのか定期的な確認、検証が必要と考えられた。一方、発症機序に関する解析からは、制御性リンパ球の関与が示された。実薬投与群で増加がみられたことは客観的にも予防投与の意義を示していると考えられる。さらに平成25年度も新たに100名の感作陽性未発症者が参加して試験を行っており、検証とさらに詳細な解析を進めている。

また、スギ花粉症の感作・発症に関連するマーカーとして、抗原特異的制御性T細胞以外にprotease inhibitorであるCystatin SNが期待される。Cystatin SNはスギ花粉症患者だけでなく、抗原に対する皮内反応が陽性になる過程で誘導される遺伝子で発症関連マーカーの一つとして期待される。その他、感作陽性未発症者では発症者と比較して好塩基球とスギ花粉との反応性、血清IgE抗体とFcε受容体との反応性が低値であった。

スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法のヒノキ花粉症への効果については、これまでの自然飛散期での検討では結果は一致せず、効果を認めるシーズンもあれば花粉飛散が少ない年にはヒノキ花粉症への効果が明らかではないシーズンもあった。花粉飛散室を用いた検討では、ヒノキ花粉飛散数をスギ花粉飛散数の1.5倍に増やしても誘発される鼻症状はスギ花粉曝露による症状よりも軽い結果であった。ヒノキ花粉曝露により誘発される症状では舌下免疫療法の実薬群とプラセボ群の差は明らかではなかった。症状が弱いことが解析を困難にしている可能性がある。一方、ヒノキ花粉曝露により強い症状が出現する症例ではヒノキ花粉特異的Th2細胞数が花粉曝露前に比較して増加し、かつスギ花粉特異的Th2細胞も同時に増加がみられた。このことは、ヒノキ花粉曝露で誘導されるヒノキ花粉特異的Th2細胞はスギ花粉も認識することを示すものと

考えられ、スギ花粉エキスをを用いた免疫療法は、ヒノキ花粉症にも一定の効果は期待出来るものと考えられる。

一方、免疫療法の新たなアジュバントとしてNKT細胞免疫系の活用が期待される。

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非常に低値であった。アレルギー免疫療法は患者QOL、満足度が高いことが報告されている。今回QOLスコアの変化の意味づけが明らかになった事は今後の免疫療法の評価、普及に役立つものと期待される。ただ一方で、免疫療法そのものについての患者の認知度は低い。実際の免疫療法の実施に当たっては内容、メリット、デメリットについての十分な情報提供が必要である。医師を対象としたアンケート調査からも医師教育の必要性が強く示されている。

E. 結論

舌下免疫療法によってアレルギー性鼻炎の治療は大きく変わることが想定される。正しい普及を目指したガイドラインの作成を進めていく必要がある。舌下免疫療法は患者満足度を高める治療としてのみならず、発症の危険がある感作陽性未発症者に2次介入の手段として活用できる事が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1、論文発表

- (1) Okamoto Y, Ohta N, Okano M, Kamijo A, Gotoh M, Suzuki M, Takeno S, Terada T, Hanazawa T, Horiguchi S, Honda K, Matsune S, Yamada T, Yuta A, Nakayama T, Fujieda S. Guiding principles of subcutaneous immunotherapy for allergic rhinitis in Japan. *Auris Nasus Larynx*. 2013;41:1-5.
- (2) Yonekura S, Okamoto Y, Yamamoto H, Sakurai T, Iinuma T, Sakurai D, Hanazawa T: Randomized double-blind study of prophylactic treatment with an antihistamine for seasonal allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;162:71-8
- (3) Hamasaki S, Okamoto Y, Yonekura S, Okuma Y, Sakurai T, Iinuma T, Yamamoto H, Sakurai D, Horiguchi S, Yokota M.: Characteristics of the Chiba Environmental Challenge Chamber. *Allergol Int* 2013;63:41-50.

- (4) Higaki T, Okano M, Kariya S, Fujiwara T, Haruna T, Hirai H, Murai A, Gotoh M, Okubo K, Yonekura S, Okamoto Y, Nishizaki K.: Determining minimal clinically important differences in Japanese cedar/cypress pollinosis patients. *Allergol Int.* 2013; 62:487-93
- (5) Yamaide F, Undarmaa S, Mashimo Y, Shimojo N, Arima T, Morita Y, Hirota T, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Sato K, Suzuki S, Nishimuta T, Watanabe H, Hoshioka A, Tomiita M, Yamaide A, Watanabe M, Okamoto Y, Kohno Y, Tamari M, Hata A, Suzuki Y. Association study of matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and asthma in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;160(3):287-96.
- (6) Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M.: Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy.* 2013 ;68(1)92-100.
- (7) 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* 61; 295-304, 2012
- (8) Sakaida H, Masuda S, Takeuchi K. Analysis of factors influencing sensitization of Japanese cedar pollen in asymptomatic subjects. *Auris Nasus Larynx.* 2013 ;40(6):543-7.
- (5) 岡本美孝.医学の窓、各科の話題. 本年改訂されたアレルギー性鼻炎診療ガイドライン.千葉県医師会雑誌. 2013;65:485.
- (6) 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
- (7) 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, 2011
- (8) 岡野光博:こどものアレルギー性鼻炎.耳鼻咽喉・頭頸部外科 84: 23-28, 2012.
- (9) 岡野光博:序～真菌とアレルギー・炎症～.アレルギー・免疫 19: 1041-1042, 2012.
- (10) 岡野光博:アレルギー性鼻炎における治験の問題点.アレルギー・免疫 19: 1693-1700, 2012.
- (11) 岡野光博:スギ・ヒノキ花粉症に対する免疫療法.臨床免疫・アレルギー科 58: 689-696, 2012.

2. 学会発表

- (1) 櫻井利興、稲嶺絢子、飯沼智久、米倉修二、櫻井大樹、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62回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012年. 大阪市.
- (2) 櫻井利興、稲嶺絢子、舩越うらら、米倉修二、櫻井大樹、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31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2013年. 倉敷市.
- (3) 森田慶紀他. 千葉市内中学生を対象とするアレルギー性鼻炎の治療法とその効果に関するアンケート調査. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012年. 大阪市.
- (4) 竹内万彦、坂井田 寛、増田佐和子、岡本美孝. 小中学生を対象としたアレルギー性鼻炎に対する治療の実態と治療に対する満足度調査. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2013年. 倉敷市.
- (5) 坂井田 寛、増田佐和子、竹内万彦. 鼻汁中のスギ特異的IgE抗体測定を試み. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2013年. 倉敷市.
- (6) 坂井田 寛、岩田賢治、山崎皓亮、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. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012年. 大阪市.
- (7) 岡野光博. スギ・ヒノキ花粉症に対する免疫療法. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会. 大阪. 2012年(シンポジウム).
- 2、総説
- (1) 岡本美孝、鈴木五男. 小児通年性アレルギー性鼻炎に対するモメタゾンフランカルボン酸エステル水和物点鼻液の多施設共同、二重盲検、無作為化、プラセボ対照試験. *耳鼻臨*,2013;106:1045-1057.
- (2) 岡本美孝. 花粉症、通年性アレルギー性鼻炎.今日の処方 2013. 浦部晶夫、大田健編, pp641-647、メディカルレビュー社
- (3) 岡本美孝. アレルギーをめぐるトレンド. 舌下免疫療法. *皮膚アレルギーフロンティア*. 2013;11:172-173.
- (4) 岡本美孝、稲嶺絢子. 粘膜アジュバントとしての乳酸菌. *医学のあゆみ*. 2013;247:12-13.

(8)

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

スギ花粉感作陽性者に対する舌下免疫療法の発症予防効果の検討、ならびにスギ花粉エキスをを用いた免疫療法のヒノキ花粉症への影響に関する研究

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 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 千葉大学医学部先進気道アレルギー学寄付講座 特任助教
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発症予防効果の有無についてプラセボ対照 2 重盲検試験により検討した。91 名が試験に参加して、21 名にスギ花粉症も発症が花粉飛散期の症状ならびに誘発試験で確認されたが、実薬舌下投与群では有意に発症の抑制がみられた。また、非発症群ではスギ花粉特異的制御性 T 細胞の増加がみられた。ヒノキ花粉症の特徴を明らかにするために花粉飛散室でヒノキ花粉曝露試験を行ったが、同じ花粉数でのスギ花粉曝露に比較して誘発症状は軽度であった。一方、ヒノキ花粉曝露によりヒノキ特異的並びにスギ特異的 Th2 細胞の増加がみられ、両者に相関も確認され、スギ花粉症とヒノキ花粉症との関連を示す結果であった。

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。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を目的として、感作陽性未発症者を対象に舌下免疫療法の予防効果の検討を進める。また、スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法がヒノキ花粉症に効果を示すのかどうかについても検討を進める。

B. 方法

1. 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。2011 年 12 月から 2012 年 4 月末、2012 年 12 月から 2013 年 4 月末まで、トリイスギ花粉エキス 2000JAU 連日舌下投与をプラセボ投与対照に 2 重盲検試験として実施した。
2. スギ花粉症患者 30 名を対象に千葉大学亥鼻キャンパスの花粉飛散室でヒノキ花粉の 3 時間曝露試験を 2 日間行い、症状解析と 1 日目の花粉飛散室入室前、2 日目の花粉曝露後の飛散室退室時に採血を行い、スギ花粉、ならびにヒノキ花粉特異的な Th2 細胞を ELISPOT 法により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたり、舌下免疫療法を用いた臨床研究への参加者からは十分な了解を得ることとし、十分な説明後に文書による同意を得て行った。

提供される血液の解析に際しては、本研究の方法、必要性、安全性および有用性、さらに拒否しても不利益にならないことを十分説明した後、同意の得られた場合にのみ行った。これらの検討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。

C. 結果

参加者は 91 名でプラセボ群 40 名、実薬群 51 名で、平均年齢はプラセボ群 30.6 歳、実薬群 33.7 歳で差はなかった。性別、喘息合併率、アトピー性皮膚病合併率、通年性アレルギー性鼻炎合併率、スギ IgE 値、ダニ IgE 値、総 IgE 値についても 2 群間に差は認めなかった。プラセボ群では 15 名 37.5%に、実薬群では 6 名 17.7%にスギ花粉症の発症が認められたが、実薬群で有意に低かった。末梢血中の IL-10⁺Foxp3⁺/CD25⁺CD4⁺ iTreg の比率は実薬群の非発症群で有意な増加がみられた。スギ IgE 値は介入開始前と花粉飛散後では、発症群では非発症群に比較して有意に上昇していた。また、スギ IgE 値/総 IgE 値が低い事が舌下免疫療法によるスギ花粉発症予防の効果予測因子となる可能性が示唆された。

スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の 2 重盲検試験の解析からヒノキ花粉が中心となる 4 月の症状薬物スコアを舌下実薬群、プラセボ舌下群と比較すると年により実薬群でスコアが低値を示す年もあれば差を認めない年もあった。花粉飛散が少ないと差が明らかで

はない傾向があった。花粉飛散室の検討ではヒノキ花粉曝露は12000個/m³/hrの濃度でも、スギ花粉曝露で用いている8000個/m³/hrで見られる症状よりも軽症であった。しかし、2日間連続のヒノキ花粉曝露前後での末梢血のヒノキ特異的Th2細胞数は増加がみられ、同時に測定したスギ花粉特異的Th2細胞数と相関がみられた。

D. 考察

スギ花粉感作陽性未発症者に対するスギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法はスギ花粉症の発症を有意に抑制した。スギIgE値は発症群で非発症群に比較して花粉飛散後には有意に増加していたが、プラセボ群と実薬群では差は明らかではなかった。花粉飛散前の花粉エキスの投与期間が2カ月未満で短かった影響もあると考えられた。一方、スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の臨床効果は花粉飛散数による影響を受け、かつヒノキ花粉による症状はスギ花粉による症状に比較して軽症であることが評価を難しくしている可能性がある。しかし、ヒノキ花粉による花粉飛散室での検討から、ヒノキ花粉を認識するTh2細胞はスギ花粉も認識することが示唆され、スギ花粉エキスをを用いた免疫療法はヒノキ花粉症にも効果を示すことが示唆された。

E. 結論

花粉症発症の二次介入として舌下免疫療法の有効性が示された。スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法はヒノキ花粉症にも一定の有効性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Okamoto Y, Ohta N, Okano M, Kamiyo A, Gotoh M, Suzuki M, Takeno S, Terada T, Hanazawa T, Horiguchi S, Honda K, Matsune S, Yamada T, Yuta A, Nakayama T, Fujieda S.(2013) Guiding principles of subcutaneous immunotherapy for allergic rhinitis in Japan. *Auris Nasus Larynx*. 41:1-5.
2. Yonekura S, Okamoto Y, Yamamoto H, Sakurai T, Iinuma T, Sakurai D, Hanazawa T: Randomized double-blind

study of prophylactic treatment with an antihistamine for seasonal allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;162:71-8.

3. Hamasaki S, Okamoto Y, Yonekura S, Okuma Y, Sakurai T, Iinuma T, Yamamoto H, Sakurai D, Horiguchi S, Yokota M.: Characteristics of the Chiba Environmental Challenge Chamber. *Allergol Int* 2013;63:41-50.
4. 岡本美孝、鈴木五男. 小児通年性アレルギー性鼻炎に対するモメタゾンフランカルボン酸エステル水和物点鼻液の多施設共同、二重盲検。無作為化、プラセボ対照試験. *耳鼻臨*, 2013;106:1045-1057.
5. 岡本美孝 編. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科疾患 Q&A*. 中外医学社.
6. 岡本美孝. 花粉症、通年性アレルギー性鼻炎. *今日の処方* 2013. 浦部晶夫、大田健編, pp641-647、メディカルレビュー社.
7. 岡本美孝. アレルギーをめぐるトレンド. 舌下免疫療法. *皮膚アレルギーフロンティア*. 2013;11:172-173.
8. 岡本美孝、稲嶺絢子. 粘膜アジュバントとしての乳酸菌. *医学のあゆみ*. 2013;247:12-13.
9. 岡本美孝. 医学の窓、各科の話題. 本年改訂されたアレルギー性鼻炎診療ガイドライン. *千葉県医師会雑誌*. 2013;65:485.
10. 岡本美孝. 花粉症の舌下免疫療法の安全性・有効性・作用機序. *日本医事新報*. 2013; 4651:66-67.
11. 岡本美孝. 患者視点からのアレルギー性鼻炎へのアプローチ. *日本医事新報*. 2013;4640:90-91.
12. 米倉修二, 岡本美孝:【アレルギー疾患治療の最前線】セルフメディケーションの現状: *医薬ジャーナル* 2013/49 (1) /129-132

学会発表
国際学会

1. Okamoto Y. Immunological changes after immunotherapy and their clinical uses IFOS(国際耳鼻咽喉科学会)、シンポジウム、2013年6月 ソウル

2. Okamoto Y. Allergen specific immunotherapy against cedar pollinosis.、小児アレルギー学会、国際シンポジウム、2013年10月、横浜
3. Okamoto Y. Development of New Treatments for Allergic Rhinitis 16th Asian research symposium in rhinology. 2013.8月 Tokyo

国内学会シンポジウムなど

1. 岡本美孝. アレルギー性鼻炎に対する「舌下免疫療法」. 日本耳鼻咽喉科学会専門医講習会、教育講演、2013年11月名古屋
2. 岡本美孝. 舌下免疫療法の臨床効果：現状と課題 第63回日本アレルギー学会、シンポジウム、2013年11月 東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アレルギー免疫療法に関するアンケート調査とバイオマーカーおよび予防的二次介入の検討

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
	山本 陸三郎	千葉大学大学院医学研究院 先進気道アレルギー学寄付講座 特任助教
	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
	新井 智之	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

アレルギー舌下免疫療法に関わる可能性のある耳鼻咽喉科および内科医師を対象に、一般治療における患者満足度、舌下免疫療法の認知の程度、治療実施の意向、講習会及び治療資格に関する考え方について調査した。一般治療における患者の満足度は低いと感じており、今後のアレルギー舌下免疫療法に対する期待は高いと考えられる結果であった。またアレルギー免疫療法の治療効果を判定するバイオマーカーがなく、今後の普及に際しマーカーの確立が期待されている。今回舌下免疫療法の機序に関連し変動するマーカーを検討し、特異的制御性 T 細胞の変動と症状との関連および血清 IgE の反応性を解析した。今後予防治療の確立は課題であり、NKT 細胞免疫系を利用した新たな治療法の可能性について検討した。 α -GalCer が組み込まれた liposome と抗原の舌下投与は、有効な抗アレルギー作用を発現させる可能性が示された。この効果は、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、舌下免疫療法の治療効果を増強する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

スギ花粉症に対する舌下免疫療法の安全性と有効性が認められ、今後一般診療として普及することが期待されている。アレルギー舌下免疫療法に関わる可能性のある医師を対象に、一般治療における患者満足度、舌下免疫療法の認知度、治療実施の意向、講習会及び治療資格に関する考え方などについて調査した。またアレルギー免疫療法の治療効果を客観的に判定するバイオマーカーがないことは大きな問題であり、舌下免疫療法の普及に際しマーカーの確立が期待されており、機序の解明とマーカーの検討を行った。さらに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) 参加者の背景として、専門科、勤務施設、医師経験年数、アレルギー専門医であるか、皮下投与による免疫療法を施行したことがあるかについて調査を行った。治療に関して、一般治療における患者の治療満足度、アレルギー舌下免疫療法に関心があるか、治療を自分で実施したいと考えているか、講習会及び治療資格に関する考え方について質問項目を設け調査した。

2) 舌下免疫療法のプラセボ対照二重盲検比較試験参加者を対象とし、舌下免疫療法の施行前、施行中、施行後に採取された採血を用い、スギ特異的制御性T細胞の変動と症状改善度との関連を調べた。また血清を用いIgE Crosslinking-induced Luciferase Expression (EXiLE) 法を施行した。ヒトIgEレセプターを発現するラット肥満細胞にスギ花粉症患者の血

清を加え、スギ抗原にて刺激しルシフェラーゼの発現をEXiLE値として評価した。

3) アレルギー性鼻炎モデルマウスを用い、誘導した樹状細胞を α -GalCerおよび抗原でパルスし、感作後のマウスの口腔粘膜下に投与した。抗原点鼻による症状誘発を行った後、鼻症状・免疫学的パラメーターの解析、症状抑制機序の検討を行った。さらに同様の検討を α -GalCerが組み込まれたリン脂質二重層のナノカプセル (liposome- α -GalCer) を舌下投与し、鼻症状ならびに免疫学的パラメーターの検討を行った。

(倫理面への配慮)

アンケート調査、臨床試験において、参加者に書面による十分な説明を行い、同意を得たうえで行われた。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) 耳鼻咽喉科医師163名、およびアレルギーを専門とする内科医師39名がアンケート調査に参加した。それぞれ勤務先は、クリニック：耳鼻科60.1%、内科23.1%、一般病院19.0%、46.2%、大学病院18.4%、28.2%であった。アレルギー専門医の割合は9.8%、59.0%、免疫療法の経験があるのはともに50%程度であった。治療に満足しているのは44.8%、25.6%で、満足していないが53.4%、71.8%と半数以上を占めていた。舌下免疫療法に関心があると回答したのは90.2%、82.1%で、このうち、舌下免疫療法をぜひ自

分で実施したいはともに25%程度、場合によっては自分での実施が59.9%、46.9%自分で実施する気はないが8.2%、21.9%であった。講習を受けた専門の耳鼻咽喉科医やアレルギー専門医が実施すべきが60.7%、81.3%、安全性が高いのだから講習を受ければ耳鼻咽喉科医やアレルギー専門医以外に誰でも実施可能にすべきが28.3%、15.6%であった。

2) 舌下免疫療法の実薬群において施行1年目からスギ特異的誘導性制御性T細胞 (IL-10+iTreg) の上昇を認め、2年目においてさらに上昇を認めた。舌下免疫療法実薬群におけるIL-10+iTregの上昇例では、花粉飛散ピーク時の症状が軽症である傾向を認めた。また飛散前の1年目と2年目を比較すると、プラセボ群・実薬群ともに特異的IgE値は有意に上昇していたが、EXiLE値の上昇は実薬群で抑えられていた。2年目の飛散前後間を比較すると、IgE値は実薬群で有意に低下しており、またプラセボ群において有意に上昇していたEXiLE値は実薬群において上昇が抑えられていた。

3) α -GalCerと抗原でパルスした樹状細胞投与群では鼻アレルギー症状の有意な改善を認め、特異的IgE値の低下、リンパ節T細胞からのTh2型サイトカインの産生抑制、IFN- γ 産生増加を認めた。また頸部リンパ節においてIgE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おり、同時にIL-21産生性NKT細胞数の増加も確認された。上記の症状軽減作用はNKT細胞非存在下では認められず、抗IL-21抗体、抗IFN- γ 抗体の腹腔投与によってこれらの症状抑制効果やIgE値の低下は解除されることを確認した。以上のことから、活性化したNKT細胞はIL-21やIFN- γ の産生増加を介してアレルギー応答の軽減効果を発揮したと考えられた。一方、liposome- α -GalCerを感作後のマウス舌下粘膜上へ抗原とともに投与する方法でも、鼻アレルギー症状の増悪や抗原特異的IgE値、リンパ節T細胞におけるTh2型サイトカインの産生はいずれも有意に抑制された。

D. 考察

1) 耳鼻咽喉科、内科ともに一般治療における患者の満足度は低いと感じており、今後のアレルギー舌下免疫療法に対する期待は高いと考えられる。耳鼻咽喉科医師の9割以上、内科医師の8割以上がアレルギー免疫療法に関心があるが、実際に自分で治療を行うと回答したのは25%前後であり、「場合によっては自分での実施を考える」という慎重な意見が最も多かった。これは、治療資格取得の詳細や、今後保険収載された際の診療報酬などが明かになっていないことも影響していると考えられる。治療資格に関しては、「講習を受けた専門の耳鼻咽喉科医やアレルギー専門医が実施すべき」との回答が最も多かったが、「安全性がたかいのだから講習を受ければ耳鼻咽喉科医やアレルギー専門医以外に誰でも実施可能にすべき」と治療の門戸を広げける意見も少なからず認めた。

2) 特異的制御性T細胞は (IL-10+iTreg) は舌下免疫療法実薬群で早期に上昇し、iTregの上昇と症状改善の関連が示唆され、マーカーとしての有用性が期待された。また舌下免疫療法は早期にはIgE抗体の産生を増加させるが、継続することでIgE抗体の低下・不応答を誘導する可能性が考えられる。さらに、IgE抗体の変動とは独立しIgE抗体の反応性を低下させている可能性が示唆された。

3) α -GalCerと抗原をパルスした樹状細胞の口腔粘膜下投与や α -GalCer が組み込まれたliposomeと抗原の舌下投与は、抗アレルギー作用を有効に且つ迅速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

今後のアレルギー舌下免疫療法に対する期待は高く、治療資格の認定、診療報酬など環境が整えば多くの医師が治療を積極的に行うことが予想される。特異的制御性T細胞の変動は舌下免疫療法の効果と関連しマーカーとしての有用性が期待される。舌下免疫療法は長期的にはIgE抗体値の低下と共にIgEの反応性を抑制する事が示唆された。また抗原とliposome- α -GalCerの舌下投与によるNKT細胞免疫系を利用した新たな免疫療法は、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) 櫻井大樹 シンポジウム5 ,アレルギー性鼻炎の発症メカニズムと治療:制御性T細胞の役割. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2013.横浜市.

2) 櫻井大樹 基礎シンポジウム,アレルギー性鼻炎の感作と発症における免疫細胞の役割:感作陽性未発症者の検討から.第52回日本鼻科学会総会・学術講演会. 2013年. 福井市

3) 櫻井大樹,米倉修二,佐々木絢子,山本陸三朗,岡本美孝. シンポジウム19,アレルギー疾患の免疫療法-舌下免疫療法の導入に向けて-:舌下免疫療法における作用機序と効果判定および予測因子の検討. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013年. 東京都

4)櫻井利興. α -GalCerパルス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24回気道病態研究会. 2012. 東京都千代田区.

5)櫻井利興,稲嶺絢子,飯沼智久,米倉修二,櫻井大樹,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62回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012. 大阪市.

6)櫻井利興,稲嶺絢子,船越うらら,米倉修二,櫻井大樹,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31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会.2013年.倉敷市.

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 助教

研究要旨：

スギ花粉症をはじめとするアレルギー性鼻炎患者が増加していることは、日本における公衆衛生的な大きな問題である。しかしながらなぜ患者数が増加しているか、発症のメカニズムに関しては十分に解明されていない。アレルギー性鼻炎の発症には抗原特異的 IgE が産生される“感作”が必須である。どのように感作され、その後感作から発症に至るかを明確にすることは、今後のアレルギー性鼻炎の新規治療のみならず、アレルギー性鼻炎の予防という観点からも貢献できる可能性が高い。本研究ではスギ花粉症の発症に関連する遺伝子を同定するために、スギ花粉飛散期に鼻上皮細胞を擦過、採取し、これらの mRNA について網羅的遺伝子解析を行った。対象はスギ花粉症発症者、スギ特異的 IgE 陽性未発症者、および非アレルギー者とし、3 群間で比較検討をした。その結果鼻上皮細胞ではスギ花粉症患者群とコントロール群間において、発現差が 2 倍以上かつ $p < 0.05$ の 32 遺伝子を同定した。その中でスギ花粉症患者で高発現していた *Cystatin SN (CST-1)* に注目した。CST-1 はスギ花粉症患者のみならず、感作陽性未発症者のうちスギ抗原に対する皮内反応が陽性である対象者も高発現しており、感作から発症における重要な因子である可能性が示唆された。アレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜の免疫組織化学では、CST-1 は鼻粘膜上皮細胞に発現していることを確認できたが、非アレルギー者の鼻粘膜では CST-1 の発現は認めなかった。鼻粘膜上皮培養細胞では、CST-1 はパパイインとスギ花粉、IL-4 と IL-13、そして IL-25 と TSLP の共刺激により発現が誘導された。また、鼻粘膜上皮細胞にスギ花粉を作用させると、ZO-1 と claudin-1 の mRNA の低下が認められたが、recombinant CST-1 の前処理により、ZO-1 と claudin-1 の mRNA の低下が抑制された。

A. 研究目的

スギ花粉症患者は増加傾向を示しており、ここ 10 年間で罹患者数が約 10%増加した。また患者の低年齢化も進んでおり、今後より一層の患者数の増加が危惧されている。これまで福井県における一般集団約 3300 人の調査では、約 60%がスギ花粉に対する血清特異的 IgE を有し、他の吸入系アレルギーと比較して最も感作率が高いことが判明した。一方その中で、約 25%が血清スギ特異的 IgE を有しながら発症していない“感作陽性未発症者”であった。感作された人がどのようにして発症するか、そのメカニズムについては現時点で全く解明されていない。これまで末梢血 CD4 陽性 T 細胞を用いた網羅的遺伝子解析により、スギ花粉症患者において Interleukin 17 receptor B (IL17RB) が有意に増加していることを報告してきた。本研究では、スギ花粉症発症者と非発症者（感作陽性未発症者と非アレルギー者）における鼻粘膜擦過細胞の遺伝子を網羅的に解析し、発症に関連する遺伝子を同定し、その機能解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

【対象】

対象者は、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）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）とした。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 項目を測定した。同時に、血清スギ特異的 IgE が陽性でありながら、これまで全くスギ花粉症の症状を認めていない感作陽性未発症者も対象とした。これらの 3 群は、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者を対象者とした。スギ花粉症患者群と感作陽性未発症者群では、血清スギ特異的 IgE のみ陽性であり、他の 6 項目は陰性である者を選択した。

【方法】

1. 遺伝子発現解析

鼻粘膜上皮細胞はスギ花粉飛散中である 3 月中旬に、下甲介粘膜を細胞診用ブラシで数回擦過し採取した。スギ花粉飛散が毎年異なるため、2009 年と 2010 年の 2 年に分けてサンプルを採取した。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°C10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、CST-1 に対するポリクローナル抗体 (Abnova)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と非アレルギー患者の下甲介粘膜を用いた。

3. 鼻粘膜上皮細胞培養

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かつスギ花粉症患者から樹立した。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) とのストレプトマイシン (100 μ g/ml) を含む培養液に回収した。培養した鼻粘膜上皮細胞を 37°C、5%CO₂ のインキュベーターにて培養し、LPS、IFN- γ 、TNF- α 、ヒスタミン、IL-4、IL-13、IL-33、パパイン、スギ花粉、Cryj-1、IL-25、TSLP 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)

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。鼻粘膜細胞の採取は、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と、行った。

C. 研究結果

1. 遺伝子発現解析

2009 年度の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 2 倍以上有意な発現変化を認めた遺伝子は 32 遺伝子であった。その一つである CST-1 は 151.4 倍発現が上昇していた。定量的 PCR の結果でも、スギ花粉症群が非アレルギー群と比較して有意に高い ($p < 0.0001$) ことを再確認できた。2010 年度のサンプルにおいても、スギ花粉症患者ではコントロール群と比較して、CST-1 の発現が有意に高いこと

を定量的 PCR で確認した。まは、感作陽性未発症者のうち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を比較すると、皮内反応陽性者では CST-1 の発現が有意に上昇していた。

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た免疫組織化学では、CST-1 は鼻粘膜上皮細胞に発現していた。

3. 鼻粘膜上皮細胞培養

鼻粘膜上皮細胞の初代培養細胞を用いてどの刺激が CST-1 を誘導するかを調べた。LPS、IFN- γ 、TNF- α 、ヒスタミン、IL-4、IL-13、IL-33、パパイン、スギ花粉、Cryj-1 (スギ精製抗原)、IL-25、TSLP で 15 時間刺激をするとパパイン、スギ花粉、IL-4 と IL-13、そして IL-25 と TSLP の共刺激により CST-1 は発現誘導された。他の刺激では CST-1 の発現は認めなかった。次に recombinant CST-1 をスギ花粉と 37°C で 30 分間 incubation 後、鼻粘膜上皮細胞に刺激を行い、鼻粘膜上皮細胞の ZO-1 と claudin-1 発現への影響を調べた。その結果スギ花粉による刺激では、鼻粘膜の ZO-1 と claudin-1 の mRNA が減少したのに対し、スギ花粉と recombinant CST-1 で前処理すると、ZO-1 と claudin-1 の mRNA の発現が非刺激の状態に戻る事が判明した。

D. 考察

鼻粘膜擦過細胞における多数の遺伝子変化は、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内で起こっていることを反映している結果と推測される。鼻は気道の first line として存在しており、容易に抗原が入らないような、もしくは排除するようなバリア機能を有している。

本研究では、スギ花粉症発症関連遺伝子の同定のために、非アレルギー者とスギ花粉症患者のみならず、感作陽性未発症者についても遺伝子発現変化を調べた。その結果、CST-1 の発現は非感作→感作陽性未発症 (皮内反応陰性)→感作陽性未発症 (皮内反応陽性)→発症の順に上昇しており、CST-1 が発症に関連する遺伝子であることが示唆された。CST-1 は cystatin ファミリーに属する protease inhibitor の一つであり、細菌や寄生虫、ウイルス感染などに関係するという報告がある。CST-1 の誘導には、パパインやスギ花粉といった protease による刺激と、IL-4、IL-13、IL-25 と TSLP といった Th2 サイトカインが必要であった。これらは抗原 (protease) とそれに伴う上皮や炎症細胞から放出されるサイトカインであり、CST-1 は抗原の持つ protease による上皮への刺激を緩衝するために働き、Th2 環境を利用して、気道上皮の恒常性を維持しているかもしれない。

E. 結論

以上の研究成果より、アレルギー性鼻炎の発症に関連する遺伝子として CST-1 が同定できた。CST-1 は発症に関連する遺伝子であり、抗原の protease 活性に対し、防御因子として生体から誘導され、抗原に対する上皮のバリア機能を維持させることが推測された。

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

Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Imoto Y, Tokunaga T, Fujieda S, Konno S, Nishimura M, Hizawa N. : Genome-Wide Association Study for Levels of Total Serum IgE Identifies *HLA-C* in a Japanese Population. PLoS One, 2013 in press

Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Morishima Y, Tokunaga T, Imoto Y, Noguchi E, Kanemaru K, Imai M, Shibayama S, Hizawa N, Fujieda S, Yamagata K, Shibuya A. : Expression and Function of Allergin-1 on Human Primary Mast Cells. PLoS One. 7;8:e76160, 2013

Imoto Y, Tokunaga T, Matsumoto Y, Hamada Y, Ono M, Yamada T, Ito Y, Arinami T, Okano M, Noguchi E, Fujieda S. : Cystatin SN Upregulation in Patients with Seasonal Allergic Rhinitis. PLoS One. 12;8:e67057, 2013

Haenuki Y, Matsushita K, Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. : A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 130:184-94, 2012

Ono M, Hamada Y, Horiuchi Y, Matsuo-Takasaki M, Imoto Y, Satomi K, Arinami T, Hasegawa M, Fujioka T, Nakamura Y, Noguchi E.: Generation of induced pluripotent stem cells from human nasal epithelial cells using a sendai virus vector. PLoS One. 2012 ; 7(8):e42855.

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. 2012 ;57:245-50.

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

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

2. 学会発表

意元義政、坂下雅文、山田武千代、藤枝重治: スギ花粉症発症関連遺伝子の機能解析. 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2013.2

意元義政、坂下雅文、徳永貴広、山本英之、加藤雄士、山田武千代、藤枝重治: アレルギー性鼻炎のバイオマーカー, 第 25 回日本アレルギー学会春季学術大会 2013.5

意元義政、徳永貴広、藤枝重治: スギ花粉症圧勝に関する遺伝子解析. 第 52 回日本鼻科学会総会, 2013.9

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

スギ花粉症の感作と発症および舌下免疫療法の効果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
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

スギの感作に有意に関連する因子は、多変量回帰ロジスティック分析の結果、ダニ感作とスギ花粉症の家族歴であった。一方、スギ花粉症の発症に影響を及ぼす因子として、スギ花粉症家族歴、1回30分以上の運動を週2回以上、1年以上していることの2項目が有意であった。

舌下免疫の臨床試験に関しては、平成24年度は実薬群で有意に発症が抑えられたが、平成23年度では実薬群と偽薬群で発症率の差がみられなかった。実薬群において、治療開始前のスギ特異的IgE/総IgEの比を発症群と非発症群で比較すると、非発症群でこの比が有意に低く、免疫療法開始前の効果のパラメータとなると思われた。IL-10産生の諸細胞の動きは、平成23年度では実薬群においてTr1およびIL-10産生性単球の割合が投与後有意に増加した。平成24年度におけるTr1とIL-10産生性B細胞の割合は実薬群で有意に増加し、IL-10産生性単球の割合は偽薬群で投与後に有意に減少した。また、平成24年度の全例でみるとmiR-223の血清での発現は試験薬投与後に有意に増加していたが、実薬群と偽薬群で差はみられなかった。let-7bの発現は偽薬群と発症群では投与後に有意に低値を示したが、実薬群と非発症群では投与前後に有意差はみられなかった。

A. 研究目的

スギ花粉症の感作と発症に関してはいくつかの先行研究があるが、最近の急激な患者の増加を考えると、遺伝因子より環境因子の関与が強いと推定される。これまでスギ花粉症未発症感作陽性者を対象に感作に関与する因子を検討した結果、多変量解析ではダニの感作のみが有意にスギの感作と関連した。しかし、最近のライフスタイルの変化などが関与している可能性は否定できず、今回対象を増やして検討し、スギ花粉症の感作と発症に関連する因子を明らかにすることを目的とした。また、平成23年度から行ってきたスギ花粉症未発症感作陽性者に対する舌下免疫療法のキーオープンもなされたので、舌下免疫療法の予防投与の効果と関連する因子を明らかにすることを目的にした。

B. 研究方法

三重県に勤務あるいは在住する5～75歳（平均41歳）160名（男性53名、女性107名）を対象に、スギ、ヒノキ、ダニの特異的IgE抗体を測定し、スギ花粉症を含むアレルギー疾患の罹患状況、家族歴、運動、ペットの飼育、食品の嗜好などについてアンケート調査を行った。

平成23年度、24年度とも17名がスギ舌下免疫予防投与の二重盲検比較試験に参加し完遂した。試験薬投与前後でのIL-10産生性T細胞(Tr1)、IL-10産生性B細胞、IL-10産生性単球の割合を測定した。具体的には、患者末梢血からficolleを用いて末梢血中単核球数を精製、これをスギ花粉標準化アレルギー治療エキスと一晚培養し、抗CD4抗体、抗IL-10抗体、抗CD14抗体、抗CD19抗体を用い染色後、FACSにてIL-10産生性細胞の割合を測定した。また、平成24年度のみ前後の血清を用いてア

アレルギー性炎症に関与するとと思われる14のmicroRNAsの測定を行った。

(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。

C. 研究結果

多変量回帰ロジスティック分析 (JMP version 5. 1. 1(SAS Institute Inc., USA)) の結果、スギの感作に有意に関連する因子はダニ感作とスギ花粉症の家族歴であった。前者ではダニのImmunoCAP値が1増加するとオッズ比は1.8増加した。また、家族にスギ花粉症患者がいるとオッズ比は3.7増加した。一方、スギ花粉症の発症に影響を及ぼす因子として、スギ花粉症家族歴 (オッズ比 5.2)、1回30分以上の運動を週2回以上、1年以上していること (オッズ比0.33) の2項目が有意であった。

2012年(平成23年度)の三重県津市におけるスギの総飛散数は5372個、2013年(平成24年度)のそれは11098個と多数であった。平成24年度は実薬群で有意に発症が抑えられたが、平成23年度では実薬群と偽薬群で発症率の差がみられなかった。実薬群において、治療開始前のスギ特異的IgE/総IgEの比を発症群と非発症群で比較すると、非発症群でこの比が有意に低く、免疫療法開始前の効果のパラメータとなると思われた。IL-10産生の諸細胞の動きは、平成23年度では実薬群においてTr1およびIL-10産生性単球の割合が投与後有意に増加した。平成24年度におけるTr1とIL-10産生性B細胞の割合は実薬群で有意に増加し、IL-10産生性単球の割合は偽薬群で投与後に有意に減少した。また、平成24年度の全例でみるとmiR-223の血清での発現は試験薬投与後に有意に増加していたが、実薬群と偽薬群で差はみられなかった。let-7bの発現は偽薬群と発症群では投与後に有意に低値を示したが、実薬群と非発症群では投与前後に有意差はみられなかった。そのほかのマイクロRNAでは実薬群と偽薬群で差はみられなかったが、全例の血清で発現が認められた。

D. 考察

スギ花粉症の感作と発症に関連する因子に関してさらに対象数を増やして検討すべきであり、今後、何らかの因子が明らかになれば、スギ花粉症を予防するための提言が可能になるとと思われる。

二重盲検比較試験の結果は平成23年度と平成24年度で異なっていたがその原因を明らかにすることはできなかった。スギ花粉舌下免疫療法の予防投与においてIL-10を産生するT細胞、B細胞、単球が変化した。このことより、スギ花粉に感作された未発症者においても舌下免疫療法はIL-10産生細胞を増加させることにより効果を発揮するものと思われる。微量の血清を用いた検討であったが、14のmiRNAが全て測定可能であった。また、このうちのいくつかは、舌下免疫療法により変化することが判明した。この意義は今後の検討課題である。

E. 結論

IL-10産生性単球、T細胞、B細胞の動きが予防的舌下免疫の効果発現に関与している。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakaida H, Masuda S, Takeuchi K. Measurement of Japanese cedar pollen-specific IgE in nasal secretions. *Allergology International* (in press)

Sakaida H, Masuda S, Takeuchi K. An analysis of factors influencing sensitization of Japanese cedar pollen in asymptomatic subjects. *Auris Nasus Larynx.* 2013;40(6):543-7

2. 学会発表

坂井田 寛、山中恵一、増田佐和子、竹内万彦、岡本美孝:スギ花粉感作陽性未発症者を対象とした舌下免疫療法による末梢血中の免疫学的変化の検討. 第32回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、徳島、2014年

中村 哲、坂井田 寛、増田佐和子、竹内万彦:スギ花粉症の感作と発症に関連する因子の検討. 第32回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、徳島、2014年

坂井田 寛、竹内万彦、増田佐和子、岡本美孝:アレルギー性鼻炎に対する治療の実態と治療に対する満足度調査. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2013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

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 日本医科大学大学院医学研究科頭頸部感覚器科学分野 教授

研究要旨

舌下免疫療法（SLIT）は欧州で1984年に開始され以来、二重盲検比較試験では高い有効性を示している。アナフィラキシーの報告は現在まで11症例にされているが、複数抗原やラテックスでのものなど特殊性もあり、二重盲検比較試験では評価されていない。喘息も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ことが証明され、2014年から保険適応が決まっている。2013年の研究としては昨年に引き続き、複数年の季節前SLITの効果の検討を行った。実際にそのQOLの悪化程度などから複数年、特に3年以上の方が単年度より花粉症に対し効果がある事が示された。しかし今年度は施行年数が長い方がQOLの悪化を抑制できる可能性を証明することは出来なかった。1年、2年という短いスパンでは、特に季節前パルスのようなSLITの場合には効果のある事は証明できても最大の効果を発揮できるわけではない。今後SLITの方法論を季節中、季節外を含めての連日投与、あるいは季節前からのパルスのSLITなどを分けて、免疫学的変動や、症状の詳細な検討をしてゆくことは、アレルギー治療に向けて進めてゆくべき検討課題と考えられる。

A. 研究目的

アレルギー免疫療法は現在、皮下免疫療法のみ一般医療で行われているが、アナフィラキシーショックのような重大な副作用が存在するため、根本的治療法であっても広がりがない治療法となっている。舌下免疫療法として抗原エキスの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、安全は方法としても期待が大きい。この舌下免疫療法は1年だけでもスギ花粉症に効果のある事は既に我々をはじめ報告されている。また国際的な論文から舌下免疫療法の経年的効果は単年度での効果を上回ることが示唆されているが、スギ花粉症についてはまだ不確実である。そこで昨年度に続き、我々は2013年のスギ花粉症のQOLを舌下免疫療法の施行期間により評価し、2012年と比較検討した。

B. 方法

投与エキスはトリイ薬品製の皮下注射用の標準化スギ花粉エキスを使用し、その舌下免疫療法は複数年の場合には初回投与より維持量の

2000JAUの1mlで1週間に1回投与とした。初回の舌下投与は2012年12月より開始し、花粉飛散季節終了後まで継続した。効果判定の症状はJRQLQを用いて、3月、4月の鼻眼の症状、健康関連QOL、総括的状況を算出した。症例は3年以上スギ花粉症の症状があり、RAST2以上の経年的スギ花粉症患者142名である。

C. 結果

2013年のスギ花粉飛散は大飛散となり、東京9地点平均では9522個/cmと平年の倍以上であった。くしゃみ、鼻汁、鼻閉などの鼻眼の症状は3年以上5年未満(n=57, M±SD, 4.26±2.21)の舌下免疫療法の施行期間で2年以下(n=35, 6.28±2.53)の試行期間に比べ、スコアは低く推移した。5年以上の症例(n=50, 4.78±2.43)とは有意差は認められなかったが、経年期間が長い症例で症状合計スコアは低く推移した。健康関連QOL、総括的状況も同様に3年以上ではどの年度でもピークの3月で変化がなかったが、2年以下では3年以上と比較してQOLスコアは有意に高値であった（健康関連QOL合計スコア