研 究

スギ花粉症に対する 1 年間の免疫療法

— 末梢血単核球の抗原反応性の変化 —

名 迫 佳 郎

Effect of a Single Year of Allergen-Specific Immunotherapy for Seasonal Allergic Rhinitis Caused by Japanese Cedar Pollens

—Changes in Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Cry j 1—

Yoshiro Nasako

(Osaka City University)

This study was designed to investigate the effect of a single year of immunotherapy on cytokine synthesis by allergen-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with seasonal allergic rhinitis. This study included 12 nonatopic subjects (nonatopic group) and 28 patients with seasonal allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. Immediately after the pollen season 1998, 14 patients started receiving immunotherapy (immunotherapy group), and the remaining were treated with antihistamines during the pollen season 1999 (medication group). PBMCs (1.0×10^6 cells/mL) were obtained from each subject before and during the pollen season 1999, and cultured for 96 hours in the absence of and in the presence of $10 \mu\text{g/mL}$ of Cry j 1. The levels of IL-4, IL-5 and IFN- γ in the supernatants were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Seasonal increase in Cry j 1-specific IL-4 and IL-5 synthesis was significant in the medication group and in the immunotherapy group, but not in the nonatopic group. Although the levels of Cry j 1-dependent IL-4 and IL-5 before the pollen season did not differ significantly between the untreated group and the immunotherapy group, the levels of Cry j 1-dependent IL-4 and IL-5 during the pollen season were significantly lower in the immunotherapy group than in the untreated group. The levels of Cry j 1-dependent IL-4 before as well as during the pollen season did not differ significantly between the good and poor responders to immunotherapy, whereas the levels of Cry j 1-dependent IL-5 during the pollen season were significantly lower in the good responders than in the poor responders to immunotherapy. Therefore, we concluded that the suppression of Cry j 1-dependent IL-5-producing Th2 cells during the pollen season is a major working mechanism of a single year of immunotherapy for seasonal allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen.

Key words : immunotherapy, seasonal allergic rhinitis, Japanese cedar pollen, interleukin-5

はじめに

花粉抗原による季節性アレルギー性鼻炎に対して免疫療法が有効であることは明らかにされている¹⁾²⁾。わが国特有の季節性アレルギー性鼻炎の一つであるスギ花粉症に対しても免疫療法は有用な治療法であることが報告されている。著者の教室においても、免疫療法を施行中のスギ花粉症患者の1/3~1/4では花粉飛散期にも鼻症状が出現せず、抗アレルギー薬が不要であることを報告してきた³⁾。しかし、スギ花粉症に対する免疫療法の効果発現機序は十分には解明されておらず、不明な点も多い。著者の教室では免疫療法中のスギ花粉症患者と免疫療法を施行していないスギ花粉症患者の血清中の免疫学的パラメーターを比較解析し、スギ特異的IgE抗体の季節性増加の抑制やスギ特異的IgG4抗体の増加^{4)~6)}、IL-4濃度の季節性増加の抑制⁴⁾、可溶性IL-2受容体の季節性増加の抑制⁷⁾、可溶性CD23の季節性増加の抑制⁴⁾⁸⁾や可溶性ICAM-1の季節性増加の抑制⁷⁾などがスギ花粉症に対する免疫療法の効果発現機序に関与している可能性を報告してきた。

ところで、免疫療法はTh細胞機能を変調させる治療法であり、この抗原特異的なTh細胞機能の変調作用が免疫療法の主たる効果発現機序である可能性が報告されている¹⁾。すなわち、抗原刺激に対するTh2反応の抑制やTh1反応の誘導が免疫療法の機序であると考えられてきた。しかし、これまでは未治療と免疫療法中のアレルギー性鼻炎患者のTh細胞機能を群間比較した成績に基づいて検討されてきた。しかし、免疫療法の作用機序を論じるにはこのような群間比較の成績だけではなく、各患者の免疫療法前後におけるTh細胞の抗原反応性を検討することも重要であると考えられる。そこで、本研究ではスギ花粉症患者より採取した末梢血単核球の抗原反応性を1年間の免疫療法前後で比較し、その反応性の変化と臨床成績の相関性を検討した。

研究対象および方法

(1) 対象患者

本研究への参加を同意した12名の非アトピー健康人(男性:7名,女性:5名,年齢:18~45歳,非アトピー群)と28名のスギ花粉症患者(男性:12名,女性:16名,年齢:16~51歳,花粉症群)を対象とした。12名の非アトピー群は、1)アレルギー疾患の既往がない、2)アレルギー疾患を疑わせる症状や所見が現在もない、3)ハ

ウスダスト、ダニ、スギ花粉、ヒノキ花粉、ブタ草、カモガヤ花粉などのわが国における主要アレルゲンに対する特異的IgE抗体がCAPで測定限界(0.34 U/mL)以下である、のすべてを満たすボランティアとした。28名の花粉症群は、1)1998年のスギ花粉飛散期にスギ花粉症に特徴的な鼻症状を示し、鼻症状の程度がOkudaらの基準⁹⁾で重症であった、2)1998年のスギ花粉飛散期に皮膚試験および鼻誘発試験が陽性であった、3)1998年のスギ花粉飛散前とスギ花粉飛散期に血清中のスギ花粉特異的IgE抗体がCAPで測定限界(0.34 U/mL)以上であった、4)1998年のスギ花粉飛散期に採取した末梢血単核球(1×10^6 個/mL)をスギ花粉の主要抗原であるCry j 1 (10 μ g/mL)で刺激し、培養上清中に産生されるIL-5とIFN- γ 濃度が測定されている、のすべてを満たす者とした。

(2) 研究デザイン

1998年のスギ花粉飛散終了直後に花粉症群の28名に免疫療法の目的と本研究の目的を説明し、このうち14名(男性:6名,女性:8名,免疫療法群)は自らの意思で1998年の花粉飛散終了後に免疫療法を開始した。一方、残りの14名(男性:6名,女性:8名,薬物療法群)は免疫療法を希望せず、1999年のスギ花粉飛散前より第二世代抗ヒスタミン薬による薬物療法を施行することとした。

大阪における1999年のスギ花粉飛散は2月第3週に始まり、4月の第2週まで継続した。非アトピー群の12名と花粉症群の28名より、スギ花粉飛散前(1999年1月)とスギ花粉飛散期間中(1999年3月第3週から4月第2週)に末梢血を採取した。採取した末梢血を用いて血清中のスギ特異的IgE抗体量をCAPで測定した。また、Ohashiら¹⁰⁾の方法を用いてCry j 1刺激下でのIL-4、IL-5およびIFN- γ 産生量を測定した。すなわち、比重遠心法により分離した末梢血単核球(1×10^6 個/mL)を無刺激下およびスギ花粉抗原の主要抗原であるCry j 1 (10 μ g/mL)の存在下で96時間培養し、その培養上清中のIL-4、IL-5およびIFN- γ 濃度をELISAキット(大塚製薬)を用いて測定した。なお、培養上清中のサイトカイン濃度が測定限界(5 pg/mL)以下の場合には測定値を5 pg/mLとし、以下の計算式によりCry j 1特異的サイトカイン産生量を算出した。

Cry j 1 特異的サイトカイン産生量

= Cry j 1 存在下でのサイトカイン産生量 - 無刺激下でのサイトカイン産生量

(3) 免疫療法の方法

免疫療法はトリイ製スギ花粉エキスをを用いて Ohashi ら⁷⁾の皮下注射法で施行した。すなわち、皮膚反応閾値検査と CAP による血清中のスギ特異的 IgE 抗体濃度を参考にして初回の抗原注射濃度を決定し、その後は 1 回/週の頻度で抗原量を 50~100% 増量した。免疫療法群の 14 名のいずれも 4~8 カ月以内に予定の維持量 (1:100 wt/vol×0.1 mL) に到達した。維持量に達した後は 1 回/週の頻度での抗原注射を 2~3 カ月継続し、その後は 1 回/2 週の頻度で抗原注射を継続した。なお、抗原の皮下注射後は最低 30 分間は病院内に留まるように注意を促し、全身反応の早期発見に努めた。

(4) 免疫療法の効果判定

免疫療法の臨床効果は Ohashi らの基準³⁾で判定した。すなわち、1999 年のスギ花粉飛散期に鼻症状がなく抗アレルギー薬の投与を必要としなかった場合は著効と判定し、1999 年のスギ花粉飛散期に鼻症状があったか、あるいは抗アレルギー薬の投与を必要とした場合は不良と判

定した。

(5) 統計学的検定

対応のない 2 群間の比較には Mann-Whitney の U 検定を用い、対応のある 2 群間の比較には Wilcoxon の順位符号検定を用いた。いずれの検定に際しても $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

成 績

(1) 対象患者の免疫学的背景

1998 年のスギ花粉飛散前における血清中スギ特異的 IgE 抗体量は薬物療法群が 12.7 ± 24.5 U/mL (平均 ± 標準偏差) で免疫療法群が 12.7 ± 11.4 U/mL で両群間に有意差を認めなかった ($P = 0.1680$)。一方、1998 年のスギ花粉飛散期における血清中スギ特異的 IgE 抗体量は薬物療法群が 15.9 ± 25.2 U/mL で免疫療法群が 18.7 ± 17.8 U/mL で両群間に有意差を認めなかった ($P = 0.0731$)。また、薬物療法群と免疫療法群のいずれの群においても、1998 年花粉飛散期のスギ特異的 IgE 抗体

図1 薬物療法群と免疫療法群の血清中のスギ特異的 IgE 抗体濃度の推移

薬物療法群では1998年と1999年の両方でスギ特異的 IgE 抗体濃度は季節性に有意に増加していた。一方、免疫療法群では1999年にはスギ特異的 IgE 抗体濃度の季節性増加は抑制されていた。

なお、イタリックゴシック体で示された P 値は統計学的に有意差のあることを示している。

量は花粉飛散前よりも有意に増加していた(薬物療法群: $P=0.0276$, 免疫療法群: $P=0.0012$, 図1)がスギ特異的 IgE 抗体の季節性増加率には有意差を認めなかった(薬物療法群: $40.3 \pm 53.1\%$, 免疫療法群: $63.5 \pm 83.9\%$, $P=0.3231$). また, 1998年の花粉飛散期に採取した末梢血単核球からの Cry j 1 特異的 IL-5 産生量(薬物療法群: 1150.5 ± 836.4 pg/mL, 免疫療法群: 1381.1 ± 721.7 pg/mL, $P=0.3827$, 図2)および IFN- γ 産生量(薬物療法群: 329.7 ± 375.6 pg/mL, 免疫療法群: 214.1 ± 206.9 pg/mL, $P=0.7302$, 図3)は薬物療法群と免疫療法群で有意差を認めなかった。

(2) 非アトピー群

1999年のスギ花粉飛散前における Cry j 1 特異的 IL-4, IL-5 および IFN- γ 産生量はそれぞれ 2.69 ± 3.58 pg/mL, 36.6 ± 36.5 pg/mL および 178.1 ± 159.6 pg/mL で, 1999年のスギ花粉飛散期における Cry j 1 特異的 IL-4, IL-5 および IFN- γ 産生量はそれぞれ 5.03 ± 4.71 pg/mL, 65.8 ± 67.5 pg/mL および 283.5 ± 351.6 pg/mL で

あった。いずれのサイトカイン産生量も1999年の花粉飛散前と花粉飛散期で有意な差異を認めなかった(IL-4: $P=0.2477$, IL-5: $P=0.1137$, IFN- γ : $P=0.3078$)。

(3) 薬物療法群

1. 血清中のスギ特異的 IgE 抗体

1999年のスギ花粉飛散前におけるスギ特異的 IgE 抗体量は 8.9 ± 13.2 U/mL で, スギ花粉飛散期におけるスギ特異的 IgE 抗体量は 19.8 ± 29.5 U/mL で, スギ特異的 IgE 抗体の季節性増加は有意であった($P=0.0015$, 図1)。また, 1999年の花粉飛散期におけるスギ特異的 IgE 抗体の季節性増加率($142.2 \pm 121.6\%$)は1998年の花粉飛散期におけるスギ特異的 IgE 抗体の季節性増加率($40.3 \pm 53.1\%$)よりも有意に大であった($P=0.0110$)。

2. Cry j 1 特異的サイトカイン産生量

1999年のスギ花粉飛散期における Cry j 1 特異的 IL-4 (37.8 ± 18.8 pg/mL) および IL-5 産生量 (1289.5 ± 864.3 pg/mL) は1999年のスギ花粉飛散前における Cry j 1 特異的 IL-4 (10.9 ± 15.6 pg/mL) および IL-5 産生量 (102.1

図2 薬物療法群と免疫療法群の Cry j 1 特異的 IL-5 産生量の推移

1998年花粉飛散期および1999年花粉飛散前の IL-5 産生量は薬物療法群と免疫療法群で有意差を認めなかったが, 1999年花粉飛散期における免疫療法群の IL-5 産生量は薬物療法群よりも有意に低値であった。

なお, イタリックゴシック体で示された P 値は統計学的に有意差のあることを示している。

図3 薬物療法群と免疫療法群のCry j 1 特異的IFN- γ 産生量の推移

薬物療法群と免疫療法群のIFN- γ 産生量はいずれの時点でも有意差を認めなかった。また、薬物療法群のIFN- γ 産生量は1998年花粉飛散期と1999年花粉飛散期で有意差を認めなかったが、免疫療法群では1999年花粉飛散期におけるIFN- γ 産生量は1998年花粉飛散期よりも有意に低値であった。

なお、イタリックゴシック体で示されたP値は統計学的に有意差のあることを示している。

± 116.6 pg/mL) よりも有意に増加していた (IL-4 : $P=0.0010$, 図4 ; IL-5 : $P=0.0010$, 図2)。一方, Cry j 1 特異的IFN- γ 産生量は1999年の花粉飛散前 (162.1 ± 203.7 pg/mL) と花粉飛散期 (402.0 ± 491.3 pg/mL) で有意差を認めなかった ($P=0.1823$, 図3)。また, 1998年と1999年の花粉飛散期におけるCry j 1 特異的IL-5 ($P=0.2455$, 図2) およびIFN- γ 産生量 ($P=0.1823$, 図3) には有意差を認めなかった。

(4) 免疫療法群

1. 血清中のスギ特異的IgE抗体

1999年のスギ花粉飛散前におけるスギ特異的IgE抗体量は 37.4 ± 33.3 U/mL で, スギ花粉飛散期におけるスギ特異的IgE抗体量は 36.4 ± 30.4 U/mL で, スギ特異的IgE抗体は有意な季節性変化を示さなかった ($P=0.9165$, 図1)。しかし, 1999年の花粉飛散前のスギ特異的IgE抗体量は1998年の花粉飛散前のスギ特異的IgE抗体量よりも有意に高値となっており ($P=0.0010$,

図1), 1999年の花粉飛散期のスギ特異的IgE抗体量も1998年の花粉飛散期のスギ特異的IgE抗体量よりも有意に高値となっていた ($P=0.0043$, 図1)。また, 1999年の花粉飛散前のスギ特異的IgE抗体量は1998年の花粉飛散期のスギ特異的IgE抗体量よりも有意に高値であった ($P=0.0029$, 図1)。また, 1999年の花粉飛散期におけるスギ特異的IgE抗体の季節性増加率 ($3.0 \pm 37.2\%$) は1998年の花粉飛散期におけるスギ特異的IgE抗体の季節性増加率よりも有意に低値となっていた ($P=0.0132$)。

2. Cry j 1 特異的サイトカイン産生量

1999年のスギ花粉飛散期におけるCry j 1 特異的IL-4 (22.4 ± 19.4 pg/mL) およびIL-5産生量 (502.9 ± 319.7 pg/mL) は1999年のスギ花粉飛散前におけるCry j 1 特異的IL-4 (5.0 ± 9.8 pg/mL) およびIL-5産生量 (66.9 ± 114.7 pg/mL) よりも有意に増加していた (IL-4 : $P=0.0015$, IL-5 : $P=0.0024$, 図2, 4)。一方, Cry j 1 特

図4 薬物療法群と免疫療法群のCry j 1 特異的IL-4産生量の推移

1999年花粉飛散前のIL-4産生量は薬物療法群と免疫療法群で有意差を認めなかったが、1999年花粉飛散期における免疫療法群のIL-4産生量は薬物療法群よりも有意に低値であった。しかし、1999年の花粉飛散期におけるIL-4産生の季節性増加は両群ともに有意であった。

なお、イタリックゴシック体で示されたP値は統計学的に有意差のあることを示している。

異的IFN- γ 産生量は1999年の花粉飛散前(72.5 $\pm$ 128.6 pg/mL)と花粉飛散期(67.8 $\pm$ 66.1 pg/mL)で有意差を認めなかった(P=0.3304, 図3)。また、1999年の花粉飛散期におけるCry j 1 特異的IL-5およびIFN- γ 産生量はいずれも1998年の花粉飛散期におけるCry j 1 特異的IL-5およびIFN- γ 産生量よりも有意に低値となっていた(IL-5 : P=0.0015, IFN- γ : P=0.0159, 図2, 3)。

(5) 非アトピー群と薬物療法群の比較

1999年のスギ花粉飛散前におけるCry j 1 特異的サイトカインの産生量はいずれも非アトピー群と薬物療法群の間で有意差を認めなかった(IL-4 : P=0.7004, IL-5 : P=0.2777, IFN- γ : P=0.5677)。1999年の花粉飛散期におけるCry j 1 特異的IL-4およびIL-5産生量は薬物療法群が非アトピー群よりも有意に大であった(IL-4 : P<0.0001, IL-5 : P<0.0001)が、1999年の花粉飛散期におけるCry j 1 特異的IFN- γ 産生量は非アトピー群と薬物療法群の間で有意差を認めなかった(P=0.8370)。

(6) 非アトピー群と免疫療法群の比較

1999年のスギ花粉飛散前におけるCry j 1 特異的サイトカインの産生量はいずれも非アトピー群と免疫療法群の間で有意差を認めなかった(IL-4 : P=0.8046, IL-5 : P>0.9999, IFN- γ : P=0.0742)。1999年の花粉飛散期におけるCry j 1 特異的IL-4およびIL-5産生量は免疫療法群が非アトピー群よりも有意に大であった(IL-4 : P=0.0064, IL-5 : P=0.0014)が、1999年の花粉飛散期におけるCry j 1 特異的IFN- γ 産生量は免疫療法群が非アトピー群よりも有意に低値となっていた(P=0.0220)。

(7) 薬物療法群と免疫療法群の比較

1. 血清中のスギ特異的IgE抗体

1999年のスギ特異的IgE抗体量は花粉飛散前にも花粉飛散期にも免疫療法群が薬物療法群よりも有意に高値であった(花粉飛散前 : P=0.0004, 花粉飛散期 : P=0.0274)。しかし、1999年の花粉飛散期におけるスギ特異的IgE抗体量の季節性増加率は免疫療法群が薬物療法群よりも有意に低値であった(P=0.0005)。

2. Cry j1 特異的サイトカイン産生量

1999年のスギ花粉飛散前の Cry j1 特異的サイトカイン産生量は薬物療法群と免疫療法群で有意差を認めなかった (IL-4 : $P=0.5580$, IL-5 : $P=0.4661$, IFN- γ : $P=0.3790$, 図2~4) が, 1999年のスギ花粉飛散期の Cry j1 特異的 IL-4 産生量および IL-5 産生量は免疫療法群が薬物療法群よりも有意に低値であった (IL-4 : $P=0.0273$, IL-5 : $P=0.0387$, 図2, 4). 一方, 1999年のスギ花粉飛散期の Cry j1 特異的 IFN- γ 産生量は薬物療法群と免疫療法群で有意差を認めなかった ($P=0.1124$, 図3).

(8) 免疫療法著効群

14名の免疫療法群患者の中で7名が著効群と判定された。

1. 血清中のスギ特異的 IgE 抗体

1998年のスギ特異的 IgE 抗体量は花粉飛散前が 13.9 ± 13.8 U/mL で花粉飛散期が 23.1 ± 22.9 U/mL であっ

た。また, 1999年のスギ特異的 IgE 抗体量は花粉飛散前が 40.2 ± 41.7 U/mL で花粉飛散期が 31.4 ± 28.5 U/mL であった。花粉飛散期におけるスギ特異的 IgE 抗体の季節性増加は1998年には有意であった ($P=0.0178$) が, 1999年には有意ではなかった ($P=0.2489$, 図5)。また, 1999年の花粉飛散期におけるスギ特異的 IgE 抗体の季節性増加率 ($-11.4 \pm 41.8\%$) は1998年の花粉飛散期におけるスギ特異的 IgE 抗体の季節性増加率 ($99.0 \pm 107.1\%$) よりも有意に低値であった ($P=0.0180$)。

2. Cry j1 特異的サイトカイン産生量

1999年のスギ花粉飛散前の Cry j1 特異的 IL-4, IL-5 および IFN- γ 産生量は 7.8 ± 13.4 pg/mL, 60.3 ± 90.1 pg/mL および 96.9 ± 180.1 pg/mL で, 1999年のスギ花粉飛散期の Cry j1 特異的 IL-4, IL-5 および IFN- γ 産生量は 20.8 ± 24.3 pg/mL, 258.4 ± 239.0 pg/mL および 61.6 ± 72.5 pg/mL であった。Cry j1 特異的 IL-4 産生量は季節性に有意に増加した ($P=0.0180$) が, IL-5 ($P=$

図5 免疫療法著効群と不良群の血清中のスギ特異的 IgE 抗体濃度の推移

免疫療法著効群と不良群のいずれでも1998年の花粉飛散期にスギ特異的 IgE 抗体濃度は季節性に有意に増加していた。また, 免疫療法著効群と不良群のいずれでも1999年の花粉飛散期にスギ特異的 IgE 抗体濃度は季節性に有意に増加しなかった。

なお, イタリックゴシック体で示されたP値は統計学的に有意差のあることを示している。

図6 免疫療法著効群と不良群のCry j 1 特異的IL-4産生量の推移

免疫療法著効群と不良群の両群間で1999年花粉飛散前と花粉飛散期のIL-4産生量は有意差を認めなかった。また、いずれの群においてもIL-4産生の季節性増加は有意であった。

なお、イタリックゴシック体で示されたP値は統計的に有意差のあることを示している。

0.0747) および IFN- γ ($P=0.8655$) は有意な季節性変化を示さなかった(図6～8)。また、1999年の花粉飛散期のCry j 1 特異的IL-5産生量は1998年の花粉飛散期のCry j 1 特異的IL-5産生量(1314.3 ± 802.4 pg/mL)よりも有意に低値であった($P=0.0180$) が、1999年の花粉飛散期のCry j 1 特異的IFN- γ 産生量は1998年の花粉飛散期のCry j 1 特異的IFN- γ 産生量(191.0 ± 231.0 pg/mL)と有意差を認めなかった($P=0.1159$, 図7, 8)。

(9) 免疫療法不良群

14名の免疫療法群患者の中で7名が不良群と判定された。

1. 血清中のスギ特異的IgE抗体

1998年のスギ特異的IgE抗体量は花粉飛散前が 11.6 ± 9.3 U/mLで花粉飛散期が 14.3 ± 10.8 U/mLであった。また、1999年のスギ特異的IgE抗体量は花粉飛散前が 34.5 ± 25.3 U/mLで花粉飛散期が 41.4 ± 33.5 U/mLであった。花粉飛散期におけるスギ特異的IgE抗体の季節性増加は1998年には有意であった($P=0.0280$) が、1999年には有意ではなかった($P=0.1282$, 図5)。また、

1999年の花粉飛散期におけるスギ特異的IgE抗体の季節性増加率($17.3 \pm 27.8\%$)は1998年の花粉飛散期におけるスギ特異的IgE抗体の季節性増加率($27.9 \pm 28.8\%$)と有意差を認めなかった($P=0.4990$)。

2. Cry j 1 特異的サイトカイン産生量

1999年のスギ花粉飛散前のCry j 1 特異的IL-4, IL-5およびIFN- γ 産生量は 2.1 ± 3.0 pg/mL, 73.6 ± 141.3 pg/mL および 48.1 ± 44.6 pg/mL で、1999年のスギ花粉飛散期のCry j 1 特異的IL-4, IL-5およびIFN- γ 産生量は 23.6 ± 14.9 pg/mL, 747.3 ± 158.0 pg/mL および 74.0 ± 64.2 pg/mL であった。Cry j 1 特異的IL-4およびIL-5産生量は季節性に有意に増加した(IL-4 : $P=0.0277$, IL-5 : $P=0.0180$, 図6, 7) が、IFN- γ は有意な季節性変化を示さなかった($P=0.1763$, 図8)。また、1999年の花粉飛散期のCry j 1 特異的IL-5産生量は1998年の花粉飛散期のCry j 1 特異的IL-5産生量(1447.9 ± 688.6 pg/mL)よりも有意に低値であった($P=0.0277$, 図7) が、1999年の花粉飛散期のCry j 1 特異的IFN- γ 産生量は1998年の花粉飛散期のCry j 1 特異的IFN- γ 産生量(237.1

図7 免疫療法著効群と不良群のCry j 1 特異的IL-5産生量の推移

免疫療法著効群と不良群の両群間で1998年花粉飛散期と1999年花粉飛散前のIL-5産生量は有意差を認めなかったが、1999年花粉飛散期におけるIL-5産生量は著効群が不良群よりも有意に低値であった。また、1999年花粉飛散期にIL-4産生の季節性増加は不良群では有意であったが、著効群では有意ではなかった。なお、イタリックゴチック体で示されたP値は統計学的に有意差のあることを示している。

±195.3 pg/mL) と有意差を認めなかった ($P=0.1159$, 図8)。

(10) 免疫療法著効群と免疫療法不良群の比較

1. 血清中のスギ特異的IgE抗体

血清中のスギ特異的IgE抗体量はいずれの時期にも著効群と不良群の間に有意差を認めなかった(1998年花粉飛散前: $P=0.7981$, 1998年花粉飛散期: $P=0.4062$, 1999年花粉飛散前: $P=0.8478$, 1998年花粉飛散期: $P=0.3379$, 図5)。また、1998年および1999年の花粉飛散期におけるスギ特異的IgE抗体の季節性増加率も著効群と不良群で有意差を認めなかった(1998年: $P=0.0845$, 1999年: $P=0.1102$)。

2. Cry j 1 特異的サイトカイン産生量

1998年のスギ花粉飛散期のCry j 1 特異的IL-5およびIFN- γ 産生量は著効群と不良群で有意差を認めなかった(IL-5: $P=0.7494$, IFN- γ : $p=0.8473$, 図7, 8)。また、1999年のスギ花粉飛散前のCry j 1 特異的サイトカイン

産生量は著効群と不良群で有意差を認めなかった(IL-4: $P=0.7235$, IL-5: $P=0.8446$, IFN- γ : $P=0.8473$, 図6～8)。1999年のスギ花粉飛散期のCry j 1 特異的IL-4産生量およびIFN- γ 産生量は著効群と不良群で有意差を認めなかった(IL-4: $P=0.5224$, IFN- γ : $P=0.7012$, 図6, 8)が、1999年のスギ花粉飛散期のCry j 1 特異的IL-5産生量は著効群が不良群よりも有意に低値であった($P=0.0027$, 図7)。

考 察

本研究の主目的はスギ花粉症患者の抗原刺激末梢血単核球のサイトカイン産生に及ぼす1年間の免疫療法の影響を検討することであった。そこで、1998年のスギ花粉飛散期に抗アレルギー薬で治療した28名のスギ花粉症患者に本研究の目的を説明し、患者自身の選択によって14名は1998年5月より免疫療法を開始し、1999年のスギ花粉飛散終了まで継続した。一方、残りの14名は免疫療法

図8 免疫療法著効群と不良群の Cry j 1 特異的 IFN- γ 産生量の推移

免疫療法著効群と不良群の IFN- γ 産生量はいずれの時点でも有意差を認めなかった。また、1999年花粉飛散期における IFN- γ 産生量はいずれの群でも有意な季節性変化を認めなかった。

を希望せず、1999年の1月末より第二世代抗ヒスタミン薬を中心とした薬物療法で治療した。したがって、本研究は二重盲検法によるものではないが、1998年のスギ花粉飛散期における臨床的重症度、血清中のスギ特異的 IgE 抗体量および Cry j 1 特異的 IL-5 と IFN- γ 産生量のいずれも薬物療法群と免疫療法群の間で有意差を認めなかった。抗原刺激末梢血単核球のサイトカイン産生能に及ぼす1年間の免疫療法の効果を客観的に判定しうると考えられる。

スギ花粉症患者では血清中のスギ特異的 IgE 抗体濃度は花粉飛散期には増加することが知られている¹¹⁾が、これまでの報告と同様に免疫療法群では血清特異的 IgE 抗体の季節性増加は抑制されていた^{2)~8)}。しかし、スギ花粉飛散前後におけるスギ特異的 IgE 抗体濃度や季節性増加率は免疫療法著効群と免疫療法不良群に有意差はなく、免疫療法による特異的 IgE 抗体の季節性増加の抑制は必ずしも臨床効果に関連した作用機序とは考えられない。

1999年の花粉飛散前の Cry j 1 特異的 IL-4、IL-5 およ

び IFN- γ 産生量はいずれも非アトピー群、薬物療法群および免疫療法群の間で有意差がなかった。したがって、スギ花粉の非飛散期には花粉症患者の Th 細胞のスギ抗原に対する反応性は非アトピー健常人と差異がなく、また免疫療法は花粉非飛散期における Th 細胞の抗原反応性に影響を及ぼさないことを示唆している。1999年の花粉飛散前および飛散期の Cry j 1 特異的サイトカイン産生量の比較から花粉症患者においては花粉暴露により Th1 細胞の反応性は影響を受けないが、Th2 細胞の抗原反応性は亢進し、IL-4 と IL-5 産生量は有意に増加することが認められた。1999年の花粉飛散期における免疫療法群の Cry j 1 特異的 IL-4 および IL-5 産生量は未治療群よりも有意に低値であったので、免疫療法は花粉飛散期における Th2 細胞の抗原反応性を抑制することを示している。さらに本研究では免疫療法は花粉飛散期における Th1 細胞の抗原反応性もある程度は抑制することを示しているが、これらの成績は著者の教室でなされてきた一連の研究成績と合致している^{10)~15)}。

これまでにも免疫療法が Th 細胞の抗原反応性を変調

させることは多くの研究者によって報告されてきた。Secrist ら¹⁶⁾ や Söderlund ら¹⁷⁾ は抗原特異的 Th 細胞による IFN- γ の産生は免疫療法によって変化しないが、IL-4 の産生は免疫療法によって減少することを示している。また、Ohashi ら¹⁸⁾ も通年性アレルギー性鼻炎患者における血清中の IL-4 濃度は免疫療法によって減少することを示している。これとは対照的に IFN- γ の産生能に及ぼす免疫療法の影響が重要であることを示した研究も多い。Verney ら¹⁹⁾ と Durham ら²⁰⁾ はブタ草花粉症患者の皮膚、あるいは鼻粘膜の炎症細胞をハイブリダイゼーション法で解析し、免疫療法は IL-4 の産生に影響を及ぼさなかったが、IFN- γ の産生を増加させると報告している。逆に、MacDonald ら²¹⁾ はブタ草花粉症患者の末梢血単核球からの IL-4 産生量は免疫療法で変化しないが、IFN- γ 産生量は免疫療法によって有意に抑制されたと報告している。O'Brien ら²²⁾ はダニアレルギー患者の抗原刺激末梢血リンパ球における IL-4 と IFN- γ の mRNA 発現を解析し、いずれのサイトカインの mRNA の発現も免疫療法によって抑制されていたと報告している。

このように Th 細胞の抗原反応性やサイトカインの産生に及ぼす免疫療法の影響は研究者によって大きく異なり、統一した見解は得られていない。研究者間で対象としたアレルギーのタイプ(通年性か季節性か)、免疫療法年数、標的臓器(末梢血か炎症組織か)あるいは実験系(in vitro か in vivo か)などが異なっていることが相違の理由と考えられる。

ところで、これまでの研究の多くは Th2 および Th1 サイトカインの代表として IL-4 および IFN- γ を取り上げてきた。しかし、アレルギーに関与している他のサイトカインとして IL-5 があり、IL-5 はアレルギー性鼻炎や気管支喘息などのアレルギー疾患における症状発現に大きく関与していることが明らかになりつつある^{10)23)~25)}。しかし、IL-5 産生に対する免疫療法の影響を論じた研究は少ないのが現状である。Söderlund ら¹⁷⁾ はシラカンバアレルギー患者の末梢血単核球における IL-5 mRNA 発現に及ぼす免疫療法の影響を検討しているが、免疫療法は IL-5 mRNA 発現に影響を及ぼさなかったと報告している。一方、著者らの施設での研究成績は通年性および季節性アレルギー性鼻炎患者の抗原刺激末梢血単核球からの IL-5 産生が免疫療法によって抑制されることを示している^{12)~15)26)}。

免疫療法は Th 細胞の抗原反応性を変化させることは疑う余地のないところであるが、この Th 細胞に及ぼす影響が免疫療法の臨床効果発現に関連した作用機序であるとは必ずしも断言できない。免疫療法はアレルギー疾患に対して有効な治療法ではあるが、すべての症例に有効な治療法でないことも事実である。したがって、Th 細胞の抗原反応性が免疫療法で臨床症状が改善された症例と改善されなかった症例の間でどのような差異があるかを解析することによって、免疫療法の作用機序を解明する必要がある。しかし、免疫療法による臨床効果と Th 細胞の抗原反応性の変化に言及した研究はきわめて乏しい。著者の教室でなされた一連の研究では、Der f 1 特異的 IL-5 産生量は通年性アレルギー性鼻炎の鼻症状スコアと有意に相関していた¹²⁾。また、スギ花粉症においても、末梢血単核球からの Cry j 1 特異的 IL-5 産生抑制が免疫療法の臨床的效果と有意に関連していた¹⁴⁾¹⁵⁾。

しかし、これら過去の研究においては、未治療のアレルギー性鼻炎患者と種々の治療期間の免疫療法中のアレルギー性鼻炎患者における抗原特異的 IL-5 産生量を群間比較した成績から論じられている。免疫療法による末梢血単核球の抗原反応性の変化や作用機序をより論理的に解明するためには、同一患者で免疫療法導入前と免疫療法導入後の抗原反応性を検討することが重要であると考えられる。そこで、28人の免疫療法患者を著効群と不良群に分類し、両群間における Cry j 1 特異的サイトカイン産生量を統計学的に分析した。免疫療法は IL-4 と IFN- γ 産生量を抑制していたが、著効群と不良群の間に有意な差異が認められなかったので、IL-4 と IFN- γ 産生量抑制は免疫療法の臨床効果に関連しているとは考え難い。一方、花粉飛散期における Cry j 1 特異的 IL-5 産生の抑制は免疫療法著効群に特徴的所見であった。

以上の研究成績より、スギ花粉症患者に対する1年間の免疫療法は花粉飛散期に採取した末梢血単核球からの Cry j 1 特異的 IL-4、IL-5 および IFN- γ 産生を抑制するが、臨床効果に関連した主たる作用機序は Cry j 1 特異的 IL-5 の産生抑制であると考えられた。しかし、アレルギー性鼻炎は複雑な疾患であり、IL-5 の産生抑制以外の免疫学的な機序も免疫療法の作用機序に関連していると考えられる。また、より長期間の免疫療法は他の免疫学的あるいは非免疫学的機序を介してその臨床効果を発揮している可能性も否定できない。

ま と め

スギ花粉症患者より採取した末梢血単核球をスギ抗原で刺激し、サイトカイン産生量を解析し、以下の成績を得た。

1) スギ花粉飛散前にはサイトカイン産生量は非アトピー健常人とスギ花粉症患者の間に有意差がなかった。

2) スギ花粉症患者では花粉飛散期には IL-4 および IL-5 産生量が増加したが、非アトピー健常人ではこのような増加は認められなかった。

3) 非アトピー健常人でもスギ花粉症患者でも IFN- γ 産生量は季節性に变化しなかった。

4) 免疫療法はスギ花粉症患者で認められる IL-4 および IL-5 産生の季節性増加を抑制した。また、免疫療法はスギ花粉飛散期の IFN- γ 産生量も抑制した。

5) 免疫療法による臨床効果発現機序の一つとして花粉飛散期における IL-5 産生抑制が考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導を賜りました山根英雄教授に謝意を表します。また、本研究の当初より直接にご指導と助言を賜りました大橋淑宏助教授ならびに恩師中井義明名誉教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究にご協力を賜りました教室の阪本浩一助手、鷲尾有司学士、中井義紀学士、アクティ大阪耳鼻咽喉科の田中亜矢樹博士、PL 病院耳鼻咽喉科の柿木裕史博士、耳原総合病院耳鼻咽喉科の正本建夫博士に感謝の意を表します。また、本研究に際して Cry j 1 をご提供下さいました谷口美文博士(林原生物化学研究所)ならびにサイトカインの測定にご尽力を賜りました大本安一博士(大塚製薬細胞工學研究所)に感謝の意を表します。なお、本論文は文部省科学研究費助成(No. 11671698)を受けたことを付記いたします。

なお、本研究の一部は第62回耳鼻咽喉科臨床学会(平成12年7月8日、福井市)で発表した。

参考文献

- 1) Lichtenstein LM, Norman PS and Winkenwerder WL : A single year of immunotherapy for ragweed hay fever ; immunologic and clinical studies. *Ann Intern Med* **663** : 75~83, 1971.
- 2) Varney VA, Gaga M, Frew AJ, et al : Usefulness of immunotherapy in patients with severe summer hay fever uncontrolled by anti-allergic drugs. *Br Med J* **302** : 265~269, 1991.
- 3) Ohashi Y, Nakai Y, Tanaka A, et al : Allergen-specific immunotherapy for allergic rhinitis ; a new insight into its clinical efficacy and mechanism. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* **538** : 178~190, 1998.
- 4) Ohashi Y, Nakai Y, Kakinoki Y, et al : Immunotherapy affects the seasonal increase in specific IgE and interleukin-4 in the serum of patients with seasonal allergic rhinitis. *Scand J Immunol* **46** : 67~77, 1997.
- 5) Ohashi Y, Tanaka A, Kakinoki Y, et al : Effect of immunotherapy on seasonal changes in serum-specific IgE and IgG4 in patients with pollen allergic rhinitis. *Laryngoscope* **107** : 1270~1277, 1997.
- 6) Ohashi Y, Nakai Y, Tanaka A, et al : The clinical role of specific IgE and IgG4 antibodies in patients having immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Clin Otolaryngol* **23** : 128~135, 1998.
- 7) Ohashi Y, Nakai Y, Tanaka A, et al : Serum levels of specific IgE, soluble interleukin-2 receptor, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in seasonal allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* **79** : 213~220, 1997.
- 8) Ohashi Y, Nakai Y, Kakinoki Y, et al : Immunotherapy affects the seasonal increase in specific IgE and interleukin-4 in the serum of patients with seasonal allergic rhinitis. *Scand J Immunol* **46** : 67~77, 1997.
- 9) Okuda M, Sakaguchi K and Ohtsuka H : Intranasal beclomethasone ; mode of action in nasal allergy. *Ann Allergy* **50** : 116~120, 1983.
- 10) Ohashi Y, Nakai Y, Tanaka A, et al : Allergen-induced synthesis of interleukin-5, but not of IgE, is a key mechanism linked to symptomatic episodes of seasonal allergic rhinitis in sensitized individuals. *Scand J Immunol* **47** : 596~602, 1998.
- 11) Kakinoki Y, Ohashi Y, Kato A, et al : Seasonal increase in specific IgE in serum induced by natural Japanese cedar pollen exposure in asymptomatic and symptomatic sensitized individuals. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* **538** : 152~155, 1998.
- 12) Tanaka A, Ohashi Y, Kakinoki Y, et al : Immunotherapy suppresses both Th1 and Th2 responses by allergen stimulation, but suppression of the Th2 response is a more important mechanism related to the clinical efficacy of immunotherapy for perennial allergic rhinitis. *Scand J Immunol* **48** : 201~211, 1998.
- 13) Kakinoki Y, Ohashi Y, Nakai Y, et al : Allergen-induced mRNA expression of interleukin-5, but not of interleukin-4 and interferon-gamma, in peripheral blood mononuclear cells obtained before the pollen season predicts the clinical efficacy of immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Scand J Immunol* **51** : 202~208, 2000.
- 14) Nakai Y, Ohashi Y, Tanaka A, et al : Cry j 1-induced syn-

- thesis of interleukin-5 and interferon-gamma by peripheral blood mononuclear cells of patients with seasonal allergic rhinitis due to Japanese cedar pollens. *Acta Otolaryngol Suppl* (Stockh) 538 : 143~151, 1998.
- 15) Kakinoki Y, Ohashi Y, Nakai Y, et al : Pollen immunotherapy inhibits both T helper 1 and T helper 2 cell responses, but suppression of T helper 2 response is a more important mechanism related to the clinical efficacy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126 : 63~70, 2000.
- 16) Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, et al : Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 178 : 2123~2130, 1993.
- 17) Söderlund A, Gabrielsson S, Paulie S, et al : Allergen induced cytokine profiles in type I allergic individuals before and after immunotherapy. *Immunol Letter* 57 : 177~181, 1997.
- 18) Ohashi Y, Nakai Y, Okamoto H, et al : Serum level of interleukin-4 in patients with perennial allergic rhinitis during allergen-specific immunotherapy. *Scand J Immunol* 43 : 680~686, 1996.
- 19) Verney VA, Hamid QA, Gaga M, et al : Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. *J Clin Invest* 92 : 644~651, 1993.
- 20) Durham SR, Ying S, Varney VA, et al : Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increase the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma. *J Allergy Clin Immunol* 97 : 230~265, 1996.
- 21) MacDonald SM, Naclerio RM and Hamilton RG : Cytokine measurements in patients receiving standard immunotherapy (Abstract). *J Allergy Clin Immunol* 93 : 230, 1994.
- 22) O'Brien RM, Byron KA, Varigos GA, et al : House dust mite immunotherapy results in a decrease in Der p 2-specific IFN- γ and IL-4 expression by circulating T lymphocytes. *Clin Exp Allergy* 27 : 46~51, 1997.
- 23) Mori A, Suko M and Tsuruoka N : Atopic diseases and eosinophil inflammation -possible management with agents which downregulate IL-5 gene transcription. *Environ Dermatol* 1 : 42~54, 1994.
- 24) Till S, Dickason R, Huston D, et al : IL-5 secretion by allergen-stimulated CD4+ T cells in primary culture ; relationship to expression of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 99 : 563~569, 1997.
- 25) Nakai Y, Ohashi Y, Kakinoki Y, et al : Allergen-induced mRNA expression of IL-5, but not of IL-4 and IFN-gamma, in peripheral blood mononuclear cells is a key feature of clinical manifestation of seasonal allergic rhinitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126 : 992~996, 2000.
- 26) Tsuda M, Ohashi Y, Washio Y, et al : Seasonal changes in phytohemagglutinin-induced cytokine synthesis by peripheral blood lymphocytes of patients with seasonal allergic rhinitis due to Japanese cedar pollens. *Acta Otolaryngol Suppl* (Stockh) 538 : 156~168, 1998.

(原稿受付 : 平成12年 9 月 11 日
原稿採択 : 平成12年 9 月 27 日 急載
別刷請求先 : 名迫佳郎
〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-5-7
大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室)