

T 細胞応答性を用いた, スギ特異的減感作療法の効果判定

東京慈恵会医科大学耳鼻咽喉科学教室

今井 透 野原 修 片山 昇 遠藤朝彦

国立予防衛生研究所

井上 栄 阪口雅弘

林原生物化学研究所

谷口美文

聖マリアンナ医科大学第一内科

中川武正

東京慈恵会医科大学 DNA 研究所

斉藤三郎

スギ花粉特異的減感作療法の効果判定は花粉飛散数および花粉吸入量の変動やヒノキ花粉の重複感作の問題があり困難である。そこでこの治療を施行中の患者47名から末梢血単核球を採取し、このスギ花粉粗抗原に対する応答性を治療期間、自覚症状、血清 Cry j 特異 IgE 値およびスギ花粉特異 IgG4値と比較した。その結果、治療期間の長い患者ほど、また自覚症状の軽度な患者ほどスギ花粉粗抗原に対する T 細胞増殖能が低かった。血清の特異抗体は T 細胞応答性、治療期間、自覚症状と相関関係を認めなかった。これらの結果は特異的減感作療法の治療効果の客観的な指標として、T 細胞応答性の試験が有用である可能性を示唆する。

Key words: Cry j — *Cryptomeria japonica* — IgE — immunotherapy — T cell

はじめに

スギ花粉症に対する特異的減感作療法に、ある程度の臨床効果が認められているが^{1)~4)}、飛散花粉量の年度別変動の大きいこと、生活節制による吸入花粉量の減量、抗アレルギー剤による初期治療の普及⁵⁾、および一部共通抗原性を持つと言われてるヒノキ花粉などの重複感作⁶⁾の影響などの問題が多く、この効果判定は困難を極めると考えられる。そこで客観的に評価するために、ほぼ同一の地域に住む減感作療法を受けていない対象患者と症状を比較する方法、などが今までに行われてきている²⁾。

抗原特異的減感作療法の効果判定には、症状を観察すること以外に、この治療の標的細胞の機能を直接観察する方法がある。この治療法の作用機序は十分に

解明されているとはいえないが、その標的細胞として T リンパ球が推定されている⁷⁾。そこで今回、スギ花粉に対して特異的減感作療法を施行中の患者のリンパ球の機能を調べるために、患者の末梢リンパ球を採取し、そのスギ花粉粗抗原に対する応答性を測定した。さらに、この応答性を臨床症状や治療期間、血清特異 IgE 値や特異 IgG4値と比較検討した。

対 象

平成 5 年 8 月末と 9 月初旬に、慈恵医大付属病院でスギ特異的減感作療法を受けているスギ花粉症患者約 200 名より、無作為に選んだ採血への協力者 47 名を検査の対象とした。対象患者は男 15 名、女 32 名で、年齢は男 38.0 ± 11.4 歳、女 30.1 ± 10.1 歳で、減感作治療期間は 2 カ月から 137 カ月までにわたり平均 23 ± 27 カ月である。スギ花粉単独の減感作療法を受けているものは 17 名で、重複抗原による併用減感作療法を受けている患者は 30 名である。内訳は室内塵 25 名、カモガヤ花粉

Received: June 17, 1996

Accepted: September 20, 1996

Abbreviations: CJ *Cryptomeria japonica*;**ELISA** enzyme-linked immunosorbent assay;**FU** fluorescence unit; **SI** stimulation Index

3名, ブタクサ花粉3名, カンジダ1名, パスパート1名である。維持療法に達している患者のスギ花粉エキス(トリイ)の注射量は100倍0.25mlである。

方 法

1) 飛散花粉数の測定

昭和62年から平成5年まで, 東京都港区または品川区でスギとヒノキ花粉の飛散数を Durham 法で2月より4月まで測定した。1日ごとの測定時間は午前0時から24時間である。

2) 自覚症状の評価

採血と同時に全員の患者から4項目のアンケート調査した。まず平成5年度に春期における全般的な自覚症状を「非常に良い」「良い」「やや良い」「あまり良くない」「悪い」の5段階で評価した。また減感作療法, 薬物療法および生活指導に対する患者による評価を「非常に効果があった」「効果があった」「やや効果があった」「あまり効果がなかった」「行っていない」の5段階で分類した。

3) 末梢リンパ球のスギ花粉粗抗原に対する増殖能の測定

スギ花粉症患者より末梢血22mlをヘパリン存在下に採取し, その中の単核球を Lymphoprep (Nycomed) を用いた遠沈法で分離し, 5% human serum 添加 RPMI-1640 培養液で 2.5×10^5 /ml の濃度に調整した。この細胞を96穴プレートを用い, $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のスギ花粉粗抗原 (CJ) (PBS pH 8.0で抽出) と共に48時間 triplicate で培養した。その後 ^3H -thymidine で12時間ラベルし, アイソトープの取込み量を scintillation counter で測定し, 抗原非刺激群と

の比を stimulation index (SI) として表示した。

4) 血清 IgE と IgG4 の測定

患者血清中の抗 Cry j 1 および抗 Cry j 2 IgE は蛍光 ELISA 法で測定し, IgE 抗体価は蛍光単位 (FU) で表した⁸⁾。抗スギ花粉 IgG4 抗体は呈色 ELISA 法で測定し, IgG4 抗体価は高値のスタンダード血清に対する比で表した⁹⁾。

5) 統計学的処理

群間の比較には F 検定を行った後, t 検定を行った。検定に当たっては, Excel for Macintosh ver. 5.0J を用いて解析した。

結 果

1) 飛散花粉数の測定

昭和59年から平成3年までスギとヒノキの飛散花粉数は年度差が著しく認められ, 7年間の平均飛散数はそれぞれ $1681 \text{ 個}/\text{cm}^2$ と $505 \text{ 個}/\text{cm}^2$ であった。平成5年度のスギ花粉とヒノキ花粉の飛散数は, それぞれ $2413 \text{ 個}/\text{cm}^2$ と $711 \text{ 個}/\text{cm}^2$ と例年に比して多く, 前年度までの7年間の平均と比較しそれぞれ1.44倍と1.41倍と高値を示した (Fig. 1)。

2) 減感作療法の治療期間と, 自覚症状および減感作療法の印象との関係

まずアンケートによる自覚症状の「非常によい」または「良い」と答えた患者は全体の47名では27.7%であったが, 10カ月以下 (17名) で0%, 11~20カ月 (13名) で23.1%, 21~30カ月 (8名) で50%, 31~40カ月 (4名) で75%, 及び41カ月以上 (5名) で60%と治療期間に比例して自覚症状の改善を認めた (Fig. 2)。減感作療法の効果に対する患者評価も「非常によ

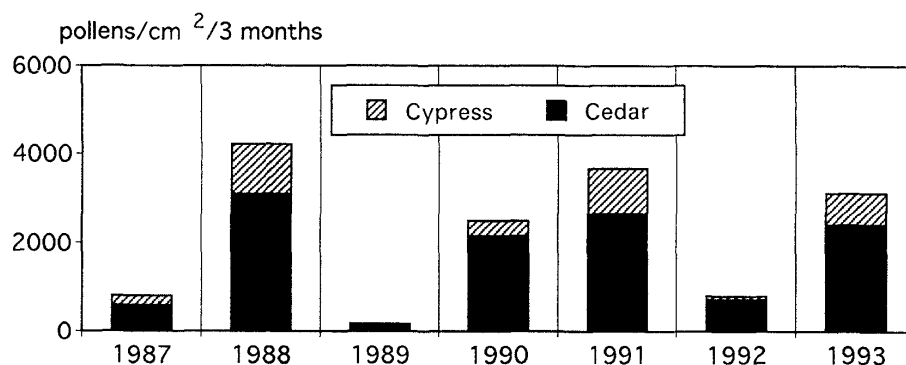


Fig. 1. Numbers of cedar and cypress pollens which dispersed during February to April in Tokyo from 1987 to 1993.

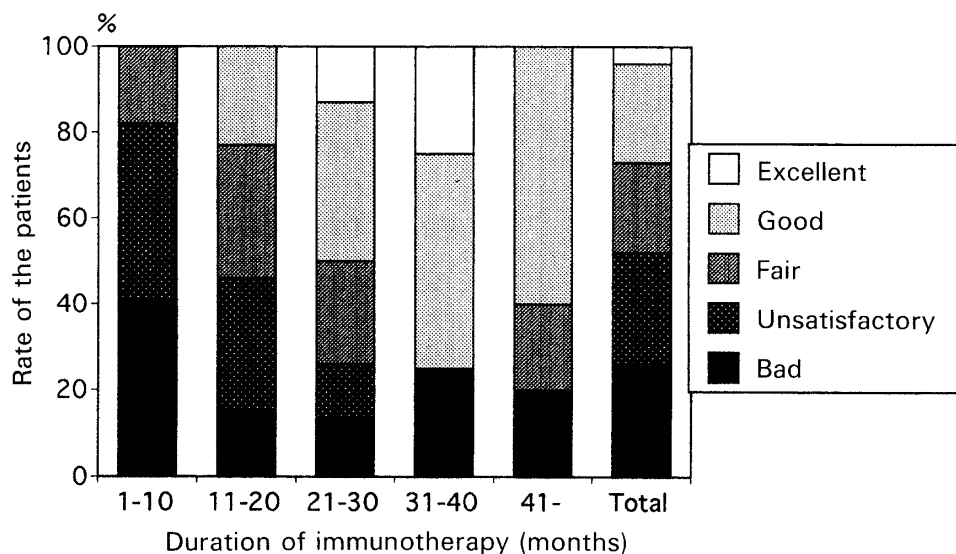


Fig. 2. Improvement of the symptoms in the patients under Japanese cedar pollen specific immunotherapy.

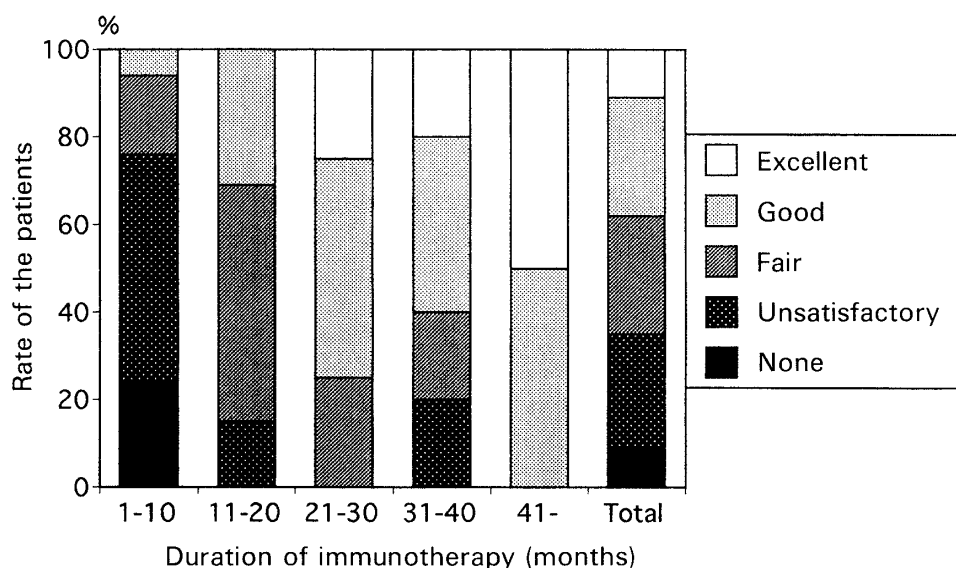


Fig. 3. Patients' assessment of immunotherapy under several periods of Japanese cedar pollen specific immunotherapy.

い」または「良い」と答えた患者が、全体の47名で38.3%であったが、10カ月以下で5.9%、11～20カ月で30.8%、21～30カ月で75%、31～40カ月で60%、41カ月以上で100%と自覚症状と同様の治療期間と比例して改善する傾向を認めた (Fig. 3)。

3) CJ に対するリンパ球増殖能と、減感作療法の治療期間との関係

47名のリンパ球に対するCJのSIは1.0から17.0まで平均5.60であったが、10カ月以内で6.74、11～20カ月で5.75と高かった。これに対して、21～30カ月で

4.54、31～40カ月で4.90、41カ月以上で3.70とCJに対するSIは平均より低かった。統計的には、10カ月以内の群と41カ月以上の群で有意の差を示した (Fig. 4)。

4) CJ に対するリンパ球増殖能と、自覚症状および減感作療法の印象との関係

アンケートによる症状の自己評価と、CJのSIを比較した。「良い」または「非常に良い」と答えた患者(n=12)のSIの平均は2.78と低値を示したのに対し、「やや良い」と答えた患者(n=12)は6.00、「あまり良くない」と答えた患者(n=12)は6.34、「悪い」と答え

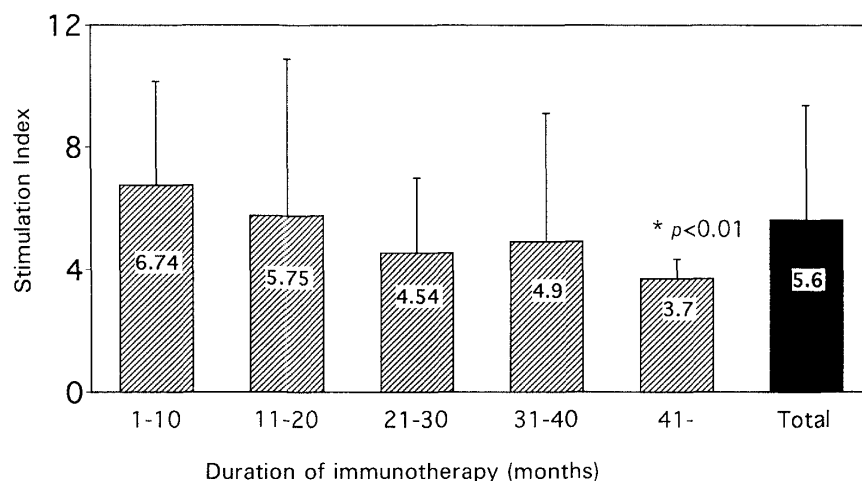


Fig. 4. Effect of immunotherapy on lymphocytes proliferation with crude pollen extracts of *Cryptomeria japonica* from 47 patients suffering from Japanese cedar pollinosis. Datas are mean ± SD.

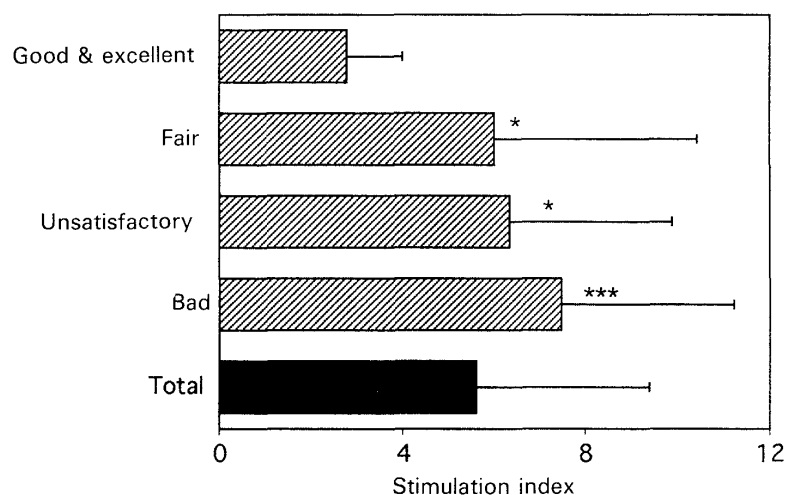


Fig. 5. Low stimulation index of lymphocytes with crude pollen extract of *Cryptomeria japonica* in the patients with clinical good outcome. Datas are means ± SD. (*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.005$)

た患者 (n=11) は7.48と高値を示した。「良い」または「非常によい」と答えた群で、他の3群と比較し有意の差を認めた (Fig. 5)。

5) IgE 抗体の値とリンパ球増殖能

47名の血清において抗 Cry j 1 IgE 抗体値と抗 Cry j 2 IgE 抗体値は弱い相関関係を示した ($r=0.35$) (Fig. 6)。多くは抗 Cry j 1 IgE の方が高値であったが、少数例では抗 Cry j 2 IgE が多い例も認められた。血清抗 Cry j 1 IgE 抗体値、抗 Cry j 2 IgE 抗体値、および両者の合計値と CJ に対するリンパ球の SI との相関はそれぞれ0.25, 0.14, および0.03と低かった (Fig. 7)。血清抗 Cry j 1および抗 Cry j 2 IgE 抗体値と治療

期間との間にははっきりとした関連は認めなかった (Fig. 8a, 8b)。

6) 抗スギ IgG4抗体の測定

47名全例に抗スギ IgG4抗体が測定可能だった。抗スギ IgG4抗体は症状、抗 Cry j IgE, CJ に対するリンパ球の SI などとの間にははっきりとした相関関係は示さなかった (データ非表示)。ただし治療期間が21~30カ月のものに高い傾向を認めた (Fig. 9)。

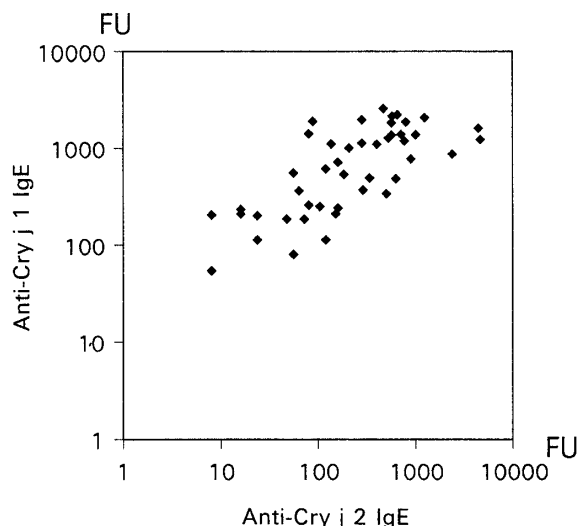


Fig. 6. Anti-Cry j 1 and Cry j 2 IgE antibody titers in the serum of the 47 patients with Japanese cedar pollinosis. There was a significant association between anti-Cry j 1 and 2 IgE ($r=0.35$, $p<0.05$).

考 察

スギ花粉症に対する減感作療法は、臨床報告例があまり多くなくその実行の有効性や有用性が十分には確立されていない。我々は、自然寛解の可能性の少ない¹⁰⁾スギ花粉症に対し、長期的に効果の得られる減感作療法を積極的に進めているが、治療効果の得られにくい患者や、長期間の治療を継続できない患者も少なくない。また治療効果の判定が極めて難しく、自信を持っ

て有効性を訴えることが時に困難である。さらに Fig. 1 に示すようにスギ花粉およびヒノキ花粉の飛散数の年度差は著しく大きく、異なった年の症状や治療成績を単純に比較するのは困難と思われた。そこで減感作療法の主要な標的細胞と考えられ得る T リンパ球に注目し、この T リンパ球のスギ花粉アレルゲンに対する応答性が、治療効果の判定の客観的な指標として有用か否かを検討した。

Fig. 2 に示すように、自覚症状および減感作療法の有効性に対する患者の印象は治療期間の長いものほど良く、短いものほど悪い結果が得られた。この治療効果の長い理由としては、減感作療法の有効なことと共に、生活指導が効果を挙げていることは否定できない。即ち、減感作療法治療中に、抗原からの回避や日常生活の節制などの重要性を指導され、また花粉飛散初期から抗アレルギー薬の服用を開始しているからである。さらに治療効果が良いが故に長期間持続した治療を受けていることの可能性もあり、47名の患者数では、症状だけで減感作療法の有効性を判定することは問題があろう。

通院中のスギ花粉症患者の住居地は様々であるため個人的な花粉の被曝量が異なり、また5月まで飛散するヒノキ花粉の重複感作は一樣ではないために、末梢血のリンパ球の刺激試験はスギ花粉飛散終了日より約4カ月後に行った。この年はスギ花粉飛散数が多かったため、患者末梢リンパ球のスギ花粉粗抗原に対する反応性は花粉飛散中より低下しているものの（未発表

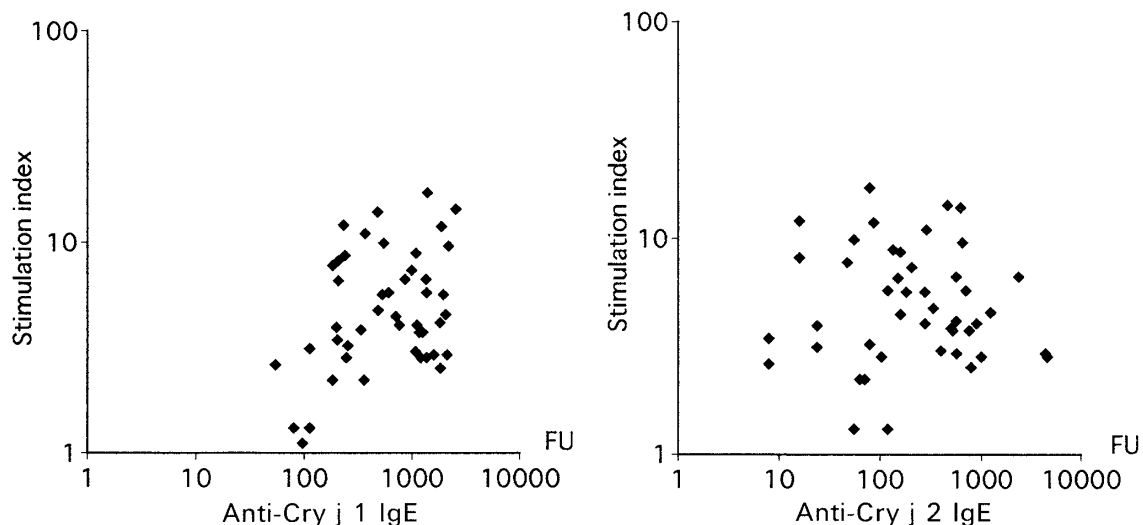


Fig. 7. The relation between the stimulation index of lymphocytes stimulated with crude pollen extract of *Cryptomeria japonica* and serum IgE levels specific for Cry j 1 and Cry j 2 from 47 patients suffering from Japanese cedar pollinosis.

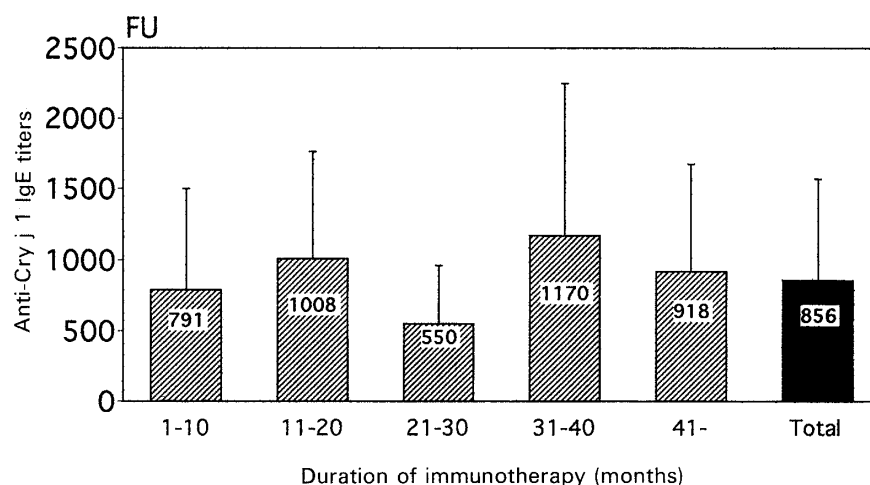


Fig. 8a. Effect of immunotherapy on serum anti-Cry j 1 IgE titers from 47 patients suffering from Japanese cedar pollinosis. Datas are mean $\pm$ SD.

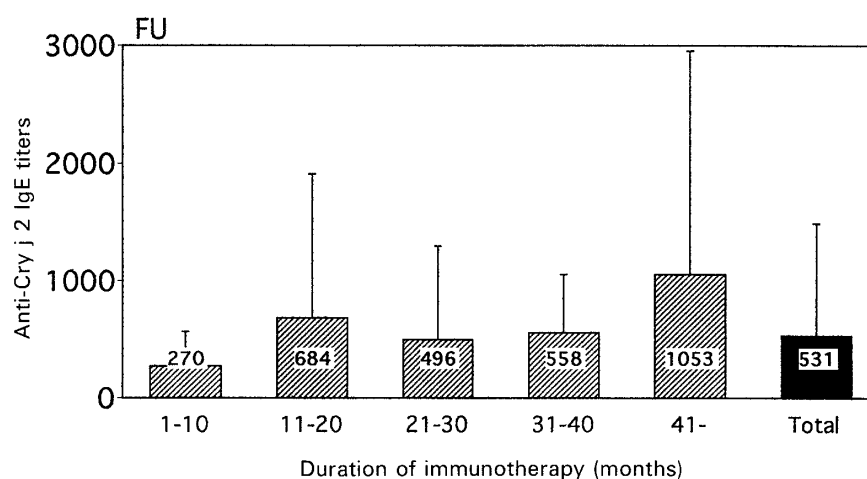


Fig. 8b. Effect of immunotherapy on serum anti-Cry j 2 IgE titers from 47 patients suffering from Japanese cedar pollinosis. Datas are mean $\pm$ SD.

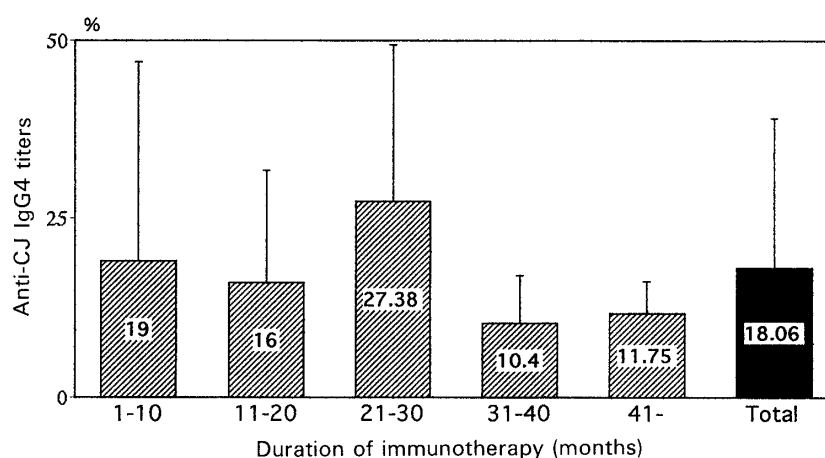


Fig. 9. Effect of immunotherapy on serum anti-*Crypomeria japonica* IgG4 titers from 47 patients suffering from Japanese cedar pollinosis. Datas are mean $\pm$ SD.

データ), CJ に対する SI が平均5.6倍と高い反応性を示し, さらに治療期間や症状の程度で群間の比較が可能だった. まず治療期間が21カ月以上で CJ の SI が平均より少なくなり (Fig. 4), このことは臨床的な効果が得られる時期にも一致し, 2~3 年は減感作療法を行うことの必要性を裏付けた²⁾. さらに CJ の SI は症状が弱くなるにしたがって有意に低下し, これらのことは, リンパ球の増殖試験が花粉症に対する治療効果の客観的な指標となりうることを示している (Fig. 5). 次に, 症状と治療期間のいずれがリンパ球増殖試験との関連が深いかを検討してみたところ, 症状の「良い」患者16名は CJ の SI が平均2.8と非常に低い値を示していることに對し, 31カ月以上減感作療法を受けている患者 9 名は CJ の SI が平均4.2とやや高値を示した. 従って, 症状の長い症例の群の方が長期間減感作治療例の群よりリンパ球増殖能が低かった. これは減感作療法の有効率に個人差が大きく, 長期間治療しても効果の得られにくい症例が含まれることなどが原因であろう. このような減感作療法の低応答性患者の解析は重要で, 減感作治療早期に治療方針の変更を行う必要があり, これには T 細胞の応答性の遺伝的な解析が今後役立つ可能性があると考えられる¹¹⁾.

減感作療法により末梢 T 細胞増殖反応が低下するメカニズムとして, 合成ペプチドを用いた場合は T 細胞アナジが考えられているが¹²⁾, 一般に用いられる減感作療法では, 発症させる粗製アレルゲンを皮膚内に投与しているので, この説が当てはまるか否かは疑問が残る. むしろ生体内へのアレルゲン進入経路の特殊性や投与量の多いことが, IgE 抗体産生を促す応答とは異なった T 細胞応答をもたらす可能性が考えられる¹³⁾.

末梢血 T 細胞の増殖反応が低下することとが, 直接臨床症状を改善させているか否かは, 末梢血 T 細胞の局所での役割が十分解明されないと困難と考えられる. ただしアレルギー性鼻炎の発症において, 局所で T 細胞がサイトカイン産生や接着因子発現に重要な役割を担っていること¹⁴⁾¹⁵⁾, また減感作療法により鼻粘膜上皮層のリンパ球が減少すること¹⁶⁾から, T 細胞の働きを制御することが臨床症状を改善することを可能にさせると考えられる. 末梢血の T 細胞は, 鼻粘膜局所の T 細胞に比較し容易に採取でき, その増殖反応も再現性が高く, 臨床症状を観察する指標として用いることができるのではないかと考えられる.

現在治療用エキスの Cry j 1/2の含有量が各ロット

により異なっているが, 今後 Cry j 1と Cry j 2がほぼ同量に調整されたスギ花粉エキ스가一般診療に使用される予定になっており¹⁷⁾, 減感作療法のより一層高い治療効果が期待される. ただし, 患者の感作状態は今回示したように個人差が大きいので, できれば患者それぞれ専用に調整した治療用エキスの使用が望ましいと考えられる. 今回はリンパ球の応答性を観察するために Cry j 1/2の混在したスギ花粉粗抗原 (CJ) を用いたが, 適切な治療エキスを検討することや, スギ花粉と共通抗原性を持つヒノキ花粉などの重複感作の解決のために, Cry j 1/2それぞれの応答性を測定することは今後必要と思われる.

47名の血清の IgE 抗体価は, これまでの報告⁸⁾と異なり抗 Cry j 1の方が抗 Cry j 2より高値のものが多い傾向にあった. このことは, 現在用いられている治療用スギ花粉エキスの Cry j 1含有量が少ないこと¹⁷⁾に起因し, 十分な Cry j 1に対する IgE 抗体産生抑制が掛からなかった可能性がある. 治療期間や症状とこれらの IgE の間に相関関係は認められなかったが, これは以前からの報告で言われているように¹⁹⁾症状の強さは特異的 IgE だけではなく, 肥満細胞の IgE レセプターを占拠する他の IgE 抗体や, T 細胞, 好酸球などの因子が関与するためであろう. 抗スギ IgG4抗体価は抗 Cry j 1/2 IgE 抗体量や, CJ の SI, 治療期間および症状との間でもはっきりとした関係は認められなかった (Fig. 9). ただし未治療群, 治療群とも個体差が多いので, 減感作療法の効果判定に役立てるためには, 治療前後または花粉飛散期の前後で IgG4抗体価の変動率を見る必要があると思われる⁹⁾.

CJ に対する T 細胞の応答性と, B 細胞の抗体産生機能を示す血清抗 Cry j IgE 値との間に相関関係は認められなかった (Fig. 7). このことは, 抗原刺激が無くなった後に起こる, T 細胞と B 細胞の反応性の低下が平行しないことや, 総 IgE 抗体産生を規定する別の因子が働いていることが推定される¹³⁾. 今回の検討では, 症状と T 細胞の応答性に相関が認められたが B 細胞系の抗体とは相関がみられず, さらに T 細胞系と B 細胞系の機能に相関関係が認められなかった. したがって, スギ花粉症に対する減感作療法の臨床効果を客観的に評価するためには T 細胞レベルでの検討が望ましいと考えられる.

文 献

- 1) 大塚博邦, 関はるみ, 大西正樹, 谷本秀司, 目沢朗憲, 他: スギ花粉症における減感作療法の遠隔成績—アンケートによる調査. 日鼻会誌 29, 241-246, 1990.
- 2) 鶴飼幸太郎, 雨皿 亮, 増田佐和子, 中本節夫, 大川親久, 他: 鼻アレルギー減感作療法の治療成績とその客観的評価 第2編 スギ花粉症. アレルギー 43, 101-105, 1994.
- 3) 藤田洋祐, 山越隆行, 谷川博一, 長谷川真也, 片桐仁一, 他: 減感作療法—最近の動向. JOHNS. 10, 351-355, 1994.
- 4) 矢島 洋: スギ花粉症減感作療法の効果. アレルギーの臨床 8, 107-110, 1988.
- 5) 今井 透, 遠藤朝彦: 花粉症に対して抗アレルギー性炎症薬を併用した例. 治療学 29, 98-100, 1995.
- 6) 野原 修, 今井 透, 実吉健索, 森山 寛, 斉藤三郎, 他: スギ花粉症患者血清を用いたスギ・ヒノキ花粉の共通抗原性に関する検討. アレルギー 45, 271, 1996.
- 7) Secrist, H., Chelen, C.J., Wen, Y., Marshall, J.D. and Umetsu, D.T.: Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4⁺ T cells from allergic individuals. JEM 178, 2123-2130, 1993.
- 8) Hashimoto, M., Nigi, H., Sakaguchi, M., Inoue, S., Imaoka, K., et al.: Sensitivity to two major allergens (Cry j I and Cry j II) in patients with Japanese cedar (Cryptomeria japonica) pollinosis. Clin. Exp. Allergy 25, 848-852, 1995.
- 9) 永倉仁史, 遠藤朝彦, 若盛和雄, 中川武正: スギ花粉症に対する特異的減感作療法の評価—特異 IgG 4 抗体の臨床的意義について. アレルギーの臨床 11, 995-998, 1991.
- 10) 芦田恒雄, 榎本雅夫, 衛藤幸男, 吉川恒男, 井出武: スギ花粉症に自然治癒はあり得るか. 日花粉会誌 41, 153-155, 1995.
- 11) 斉藤三郎: 花粉症患者の動向と予防, 治療. 発症要因(抗原)と治療. アレルギー 45, 187, 1996.
- 12) Briner, T.J., Mei-Chang, K., Keating, K.M., Rogers, B.L. and Greestein, J.L.: Peripheral T-cell tolerance induced in native and primed mice by subcutaneous injection of peptides from the major cat allergen Fel d I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7608-7612, 1993.
- 13) 渡辺直熙: アトピー性疾患における IgE の機能と産生の調節. IgE と寄生虫感染防御. アレルギー 45, 157, 1996.
- 14) Durham, S.R., Ying, S. Varney, V.A., Jacobson, M.R., Sudderick, R.M. et al.: Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation; relationship to tissue eosinophilia. J. Immunol. 148, 2390-2394, 1994.
- 15) Saito, H., Asakura, K. and Katuura, A.: Study on the profiles of infiltrating T lymphocytes and ICAM-1 expression in allergic nasal mucosa. Acta Otolaryngol. (Stockh) 114, 315-323, 1994.
- 16) 奥田 稔: 特異的減感作(免疫)療法は基本的治療法である. “鼻アレルギー”, 金原出版, 東京, pp. 233-255, 1988.
- 17) 日本アレルギー学会アレルギー検討委員会: わが国におけるアレルギー標準化の基本方針とスギ花粉アレルギーエキスの標準化. アレルギー 45, 416-421, 1996.
- 18) 澤谷真奈美, 小野昭子, 河野恵三, 河島トモ子, 谷口美文, 他: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay による Cry j I, Cry j II 定量法の開発. アレルギー 43, 467-473, 1994.
- 19) 井上 栄, 阪口雅弘, 今岡浩一, 鈴木修二, 宮澤博: スギ花粉症の血清抗体調査. “花粉アレルギーと大気汚染”, (兜真徳, 鈴木継美 編), pp.65-69, 篠原出版, 東京, 1996.

EVALUATION OF EFFICACY FOR JAPANESE CEDAR POLLEN-SPECIFIC
IMMUNOTHERAPY BY LYMPHOCYTE PROLIFERATION TEST

Toru Imai¹⁾, Osamu Nohara¹⁾, Noboru Katayama¹⁾, Tomohiko Endo¹⁾,
Sakae Inoue²⁾, Masahiro Sakaguchi²⁾, Yoshifumi Taniguchi³⁾,
Takemasa Nakagawa⁴⁾ and Saburo Saito⁵⁾

¹⁾*Department of Otorhinolaryngology, The Jikei University School of Medicine,*

²⁾*National Institute of Health, ³⁾Hayashibara Biochemical Labs, Inc.,*

⁴⁾*Department of Internal Medicine, St. Marianna University, ⁵⁾DNA Institute,*
The Jikei University School of Medicine

Peripheral mononuclear cells from 47 patients suffering from Japanese cedar pollinosis were stimulated with crude pollen extract of *Cryptomeria Japonica* (CJ) to evaluate the effect of CJ-specific immunotherapy. The stimulation index (SI) with crude pollen extract of CJ in the patients with excellent and good clinical outcome was significantly lower than those with poor outcome. The SI increased with the increasing symptoms in a dose dependent manner. In the patients under immunotherapy for long period, the good clinical outcome and low SI were gained. These results suggest that peripheral lymphocyte proliferation test should be a good objective indicator for allergen-specific immunotherapy.
