

研究課題名	重症鶏卵アレルギーに対する経皮免疫療法の有効性と安全性に関する研究		
フリガナ	フジサワ タカオ		
代表者名	藤澤 隆夫		
所属機関（機関名） （役職名）	国立病院機構三重病院 院長		
共同研究者	氏名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	中川晋作（ナカガワシンサク）	大阪大学薬学研究科・教授	動物モデルでの検討
	神山文男（カミヤマフミオ）	コスメディ製薬株式会社・代表取締役	経皮免疫デバイス製造
本助成金による発表論文，学会発表	無し（無作為二重盲検負荷試験に続き、長期試験に移行して、キーオープンは行われていないため、公表は行われない）		

### 研究結果要約

食物アレルギーに対する治療は未だ確立されておらず、最近試みられている経口免疫療法も効果が不十分であるだけでなく、アレルギー副反応が避けられないことより標準的治療とはなっていない。そこで、本研究では新規治療として、経皮免疫療法を開発し、実用化を目指すこととした。経口負荷試験閾値が低く、寛解傾向がない重症鶏卵アレルギー患者（4～15歳）を対象に卵白主要抗原であるオボムコイド（OVM）を装填した新規経皮免疫デバイス、親水性ゲルパッチ（Hydrogel patch:HG）を毎日12時間貼付し、24週間継続する経皮免疫療法の有効性と安全性をランダム化二重盲検プラセボ対照試験で検証するものである。試験に先立ち、まずOVM-HG作製方法の検討、安定性試験を行い、製造・供給体制を確立した。続いて、平成28年7月4日より試験開始、平成29年4月30日まで（10ヶ月間）に37名の一次登録があり、うち二重盲検プラセボ対照傾向食物負荷試験で組み入れ基準を満たした22名にOVM-HGまたはプラセボHGを1:1で割り付けた。これまでに20名が試験完了して長期試験に移行、2名は試験継続中である。長期試験終了後にキーオープンして、有効性の判定を行う予定のため有効性はまだ明らかでないが、安全性については軽度の局所反応以外は認めなかった。また、鶏卵アレルギーHGの免疫原性をマウスで検討し、アレルギー皮下投与に比べて、IgE抗体を産生させにくいこと、アジュバントであるK3（CPG-ODN）との併用で、さらにTh1反応を誘導しやすいことを明らかにした。

## 研究目的

近年、食物アレルギーは著しく増加、学校における誤食によるアナフィラキシー死亡事故など大きな社会的問題にもなっている。診断および管理は進歩して、食物アレルギー患者のQOLは改善しつつあるが、未だ十分ではなく、とくに、根治に至る治療法が存在しないことが問題である。通常、小児の食物アレルギーは多くが成長と共に寛解するが、最近では、寛解困難でアナフィラキシーのリスクを抱えたまま持続する例が増えている。これらの患者に対して、経口免疫療法が試みられるようになり、一定の効果は認められているものの治療に反応しがたい難治例が残ると共に、治療中に少なからぬアレルギー症状誘発があるという副反応のリスクから、一般的治療とはなりがたいのが現状である<sup>1)</sup>。そこで、本研究では、新規治療として、**より安全で有効性の高い経皮免疫療法の開発**をめざす。とくに、食物アレルギーの中で最も頻度の高い鶏卵アレルギーを対象とする。

皮膚はランゲルハンス細胞など免疫細胞が豊富で、適切に抗原投与を行えば、効率的に耐性誘導できる可能性をもつ臓器である。これまで、いくつかのパイロット研究が行われ、その臨床的有効性も示唆されているところであるが、エビデンスは未だ十分ではない。さらに、免疫誘導物質（本研究では、卵白抗原）を安定して皮内に到達させる Drug Delivery System(DDS)も重要である。大阪大学とコスメディ製薬はいくつかのDDSを開発して、化粧品では実用化、ワクチンでも有効性・安全性の実証をしている<sup>2-4)</sup>。本研究では、このデバイスを用いて、重症鶏卵アレルギーに対する経皮

免疫療法のパイロット研究を行い、今後の大規模臨床試験の基礎データを得ることを目的とする。また、奏効メカニズムについて、動物モデルを用いて、免疫学的解析を行う。

## 研究計画及び研究手法

### 1) 抗原を効果的に経皮送達できる親水性ゲルパッチデバイスの確立と臨床研究のためのパッチ製造

親水性ゲルパッチのコンセプトは以下の通りである。親水性の粘着性基剤からなる基剤部表面に抗原蛋白質を水溶液として均一に添加すると溶媒である水は蒸発あるいは内部拡散により表面からは消失する一方、親水性基剤表面には抗原蛋白質が高度に濃縮される。基剤は架橋された親水性ゲルであり高分子物質であるアレルギーなどの内部拡散は起こらない構造とする。これを皮膚に貼付すると、表面の蛋白質は濃縮されて皮膚に対して大きな濃度勾配を有するがゆえに抗原が皮膚内へ拡散し薬効を発揮する。親水性ゲルによる皮膚表面湿潤効果（いわゆるODT効果）もアレルギーなどの内部拡散を助長する。このコンセプトを実現するために、皮膚安全性試験（皮膚一次刺激性試験、皮膚感作性試験、細胞毒性試験）により皮膚安全性が既に確認された親水性アクリル粘着剤 HiPAS10（コスメディ製薬開発）を用いた。さらに、皮膚に一定の時間安定に貼付するためには保護粘着テープとして、可塑剤として乳酸オクチルドデシルを含有する架橋型アクリル粘着剤が支持体上に塗布されたテープを作成した。臨床研究に供したデバイスにおける保護粘着テープの粘着力は日本薬局方収載の粘着力試験

法（プローブタック法）で測定した。

## 2) 鶏卵アレルギー装填親水性ゲルパッチの作成と安定性試験

アレルギー装填親水性ゲルパッチ (hydrogel patch:HG) は、蒸留水 (distilled water; DW) にオボムコイド (ovomuroid; OVM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 或いはオボアルブミン (ovalbumin; OVA, J. K. International, Tokyo, Japan) 並びに各種アジュバントを無菌条件下で HG に滴下し、室温乾燥することで調製した。

OVM 装填 HG (1 mg あるいは 0.1 mg OVM) の貼付面をタンパク低吸着性の離型紙で覆い、遮光・防湿のためアルミラミネートパックに入れて密封した。4°Cで保管し、2週、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月後に HG からの OVM 溶出率を測定した。溶出試験は、離型紙を剥がした貼付面を下にして HG を PBS 500  $\mu$ L/well の入ったタンパク低吸着性 24 穴プレート (MD24 with LID Low cell binding; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) に浮かべ、1時間、34°C、200 rpm で振とうした後、溶液中の OVM を Coomassie Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。

## 3) 重症鶏卵アレルギー患者に対する経皮免疫療法の臨床試験

(試験組み入れ基準)

- 1) 同意取得時に 4 歳以上 15 歳以下の男女。
- 2) 鶏卵アレルギーを持つ者。
- 3) 鶏卵アレルギーの寛解傾向がない者。
- 4) 経口負荷試験による閾値が加熱全卵 2g 以下の者。

(除外基準)

- 1) 大豆と牛乳アレルギーの両方がある者。
- 2) 鶏卵の対象食品に対する摂取状況（食事内容）が直近の 3 ヶ月間に大きく変化している者。
- 3) 心疾患、肝疾患、腎疾患などの既往歴があり、現在治療中の者。
- 4) 気管支喘息、アトピー性皮膚炎があり、現在コントロール不良の者

(試験方法) 二重盲検プラセボ対照平行群間ランダム化比較試験

同意取得後、鶏卵の 2 重盲検食物負荷試験 (Double-blind placebo-controlled food challenge:DBPCFC) で低閾値（最終摂取量が加熱全卵 2g 以下で誘発症状）であることが確認された後に、1. プラセボ群、2. OM パッチ群に無作為化割付を行う。1日 12 時間を連日貼付し、24 週間継続する。まず、低濃度 OM パッチ (OM パッチ 0.1mg) にて治療開始後 2 週間後に外来受診、貼付による症状が安定していれば、高濃度のパッチ (OM パッチ 1) へ変更し、試験を継続する。最初の貼付の際、貼付後 1 時間、観察し、全身症状がないことを確認する。計 24 週間、貼付を継続後に、再度鶏卵の DBPCFC を行い、閾値の変化を検討する。また、経皮感作を防ぐため、貼付部位の湿疹はステロイド外用薬と保湿剤により完全にコントロールした。

(ランダム化割り付け)

研究参加者は、2 次登録後にデータセンターにて、以下を治療群と対照群におよそ 1 : 1 の比でランダムに割り付けた。

(主要評価項目)

1) 治療開始 24 週後の負荷試験閾値の変化(治療前閾値からの変化量)

2) 安全性 (局所反応および全身の即時型アレルギー反応、その他)  
(副次評価項目)

1) プリックテストの膨疹径 2) 卵白 / オボムコイド特異的 IgE 抗体、IgG4 抗体の変化、好塩基球活性化試験の変化

#### 4) 鶏卵アレルギー装填親水性ゲルパッチの免疫誘導効果とアジュバント探索 (動物モデル)

1) マウスの経皮免疫

アレルギー経皮免疫 (epicutaneous immunization; EPI) は、BALB/c マウスの除毛背部皮膚に、OVM (1 mg) 装填 HG を 24 時間貼付した。対照群には背部に OVM 溶液 (100  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ ) を皮下注射 (subcutaneous immunization; SCI) した。これらの免疫操作は 1 週間隔で 4 回行い、経時的にマウスの眼窩静脈叢から採血して血清を得た。アジュバント探索においては、マウス除毛背部皮膚に OVA(100  $\mu\text{g}$ ) と各種アジュバントの混合溶液を装填した HG 貼付を 2 週間隔で 3 回行い、経時的にこれらのマウスにおける眼窩静脈叢から血液を採取することで、血清を得た。使用したアジュバントは Pam3CSK4 20  $\mu\text{g}/$ パッチ、LTA-SA 100  $\mu\text{g}/$ パッチ、Poly I:C 50  $\mu\text{g}/$ パッチ、Imiquimod 100  $\mu\text{g}/$ パッチ、K3(CpG-ODN) 20  $\mu\text{g}/$ パッチである。

2) 免疫学的評価

血清中アレルギー特異的抗体価 (IgE, IgG) は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によって測定した。K3 を併用免疫したマウスの

所属リンパ節 (上腕リンパ節、腋下リンパ節、鼠蹊リンパ節) を回収し、staining buffer (0.5% FBS、0.05% NaN<sub>3</sub> を含む PBS) を用いて細胞懸濁液を作製した。Rat anti mouse CD16/CD32 blocks-Fc binding を添加し、氷上で 30 分間インキュベーションした後、APC labelled pro5 MHC pentamer H-2kb SIINFEKL (Proimmune, Ltd., Oxford, UK) 添加し、室温で 30 分間反応させた。FITC Rat anti-mouse CD8 (clone KT15, MBL)、PE-Cy5 Rat anti mouse CD19 (clone 6D5, Proimmune)、LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead cell Stain (Thermo Fisher Scientific) を添加し、氷上で 30 分間インキュベーションした。染色後、フローサイトメーター (Gallios; Beckman Coulter) とデータ解析ソフト (Flowjo; TOMY DIGITAL BIOLOGY) を用いて解析を行った。

#### **結果と考察**

##### 1) 抗原を効果的に経皮送達できる親水性ゲルパッチデバイスの確立と臨床研究のためのパッチ製造

臨床試験および動物実験に使用可能なパッチを以下の仕様で作成した。(Fig.1)

親水性ゲルシート：面積 1cm<sup>2</sup> の円形

親水性ゲル：可塑剤として乳酸オクチルドデシルとグリセリンを含有する架橋型アクリル粘着剤が支持体上に塗布されたシート 厚さ：160 ~ 190  $\mu\text{m}$

支持体：ポリエステルフィルム、厚み 26  $\mu\text{m}$ 、色調白色

保護粘着テープ：直径 30mm の円形、可塑剤として乳酸オクチルドデシルを含有する架橋型

アクリル粘着剤を支持体上に塗布、厚さ：50  
～ 60  $\mu\text{m}$   
プローブタック値：2.3 N

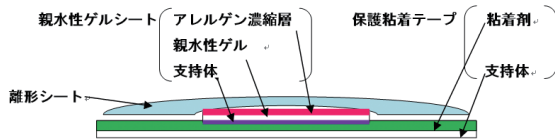


Fig.1 Hydrogel (HG) patch

2) 鶏卵アレルギー装填親水性ゲルパッチの作成と安定性試験

アレルギー装填 HG の製剤安定性・長期保存性を保証するため、アレルギー装填 HG を冷蔵保管し定期的にアレルギー溶出量を測定した。OVM (1 mg 及び 0.1 mg) 装填 HG においては、保管一か月まで安定的に保存できることが示されたが、保管一か月以降 OVM (1 mg) 装填 HG において、OVM 溶出率が徐々に低下するとともに、離型紙側への OVM 吸着が認められた。つまり OVM 装填 HG においては一か月以上の長期保管が難しいことが明らかとなった (Fig. 2)。

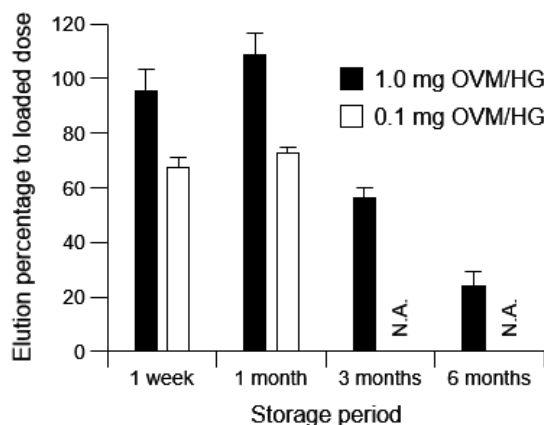


Fig. 2 Long-term storage stability of OVM patch  
OVM (1 mg or 0.1 mg)-containing HG was stored at 4°C for 2 weeks, 1 month, 2 months, 3 months, 6 months. The patch was performed to a dissolution test and quantitative protein assay using by Bradford methods. The dissolution rate was calculated assuming that the HG-loading amount was 100%. Data is expressed as mean  $\pm$  S.E. of results from three mice.

おそらく HG 表面に HG 構成成分であるグリセリンが溶出し、これが OVM とともに離型紙側へと吸着していることが原因と考えられる。今後、グリセリンの代替となる湿潤剤を構成基剤とした HG を使用するなど、HG の構成成分を最適化する予定である。

3) 重症鶏卵アレルギー患者に対する経皮免疫療法の臨床試験 (試験登録患者)

平成 28 年 7 月 4 日より試験を開始、平成 29 年 4 月 30 日までの 10 ヶ月間に、組み入れ基準 1),2),3) を満たした患者 37 名 (男児 26 名、女児 11 名、平均年齢 6.8 歳) が一次登録された。そのうち、DBPCFC にて組み入れ基準 3) を満たした患者は 22 名 (男児 16 名、女児 6 名、平均年齢 6.4 歳) で、試験治療またはプラセボがランダムに割り付けられた。組み入れられなかった患者は 15 名 (男児 10 名、女児 5 名、平均年齢 7.6 歳) で、内訳は DBPCFC 陰性 11 名、DBPCFC 完遂できず 1 名、試験継続希望せず 3 名であった。

(試験経過)

割り付けられた 22 名は順調に試験を継続して、平成 29 年 9 月 30 日時点で 24 週間の治療を終了し、2 回目の DBPCFC を完了した者は 20 名で、平成 29 年度の研究計画による長期試験参加に同意され、長期試験 (実薬貼付または経口摂取) に移行した。残り 2 名は試験継続中である。

長期試験を行うため、キーオープンは行っていないので、主要評価項目、副次評価項目のデータは未だ得られていないが、24 週を終了し

た20名のうち、5名は負荷試験における閾値が加熱全卵2gを超えて経口摂取に移行した(経口摂取群)。15名は全員が実薬で、低濃度OMパッチ(OMパッチ0.1mg)を2週間貼付後、高濃度のパッチ(OMパッチ1)を継続した(ランダム化比較試験でプラセボパッチであった例は24週貼付群、OMパッチであった例は48週貼付群となり、これら2群を比較する)。平成28年9月30日までに5名が48週の貼付を終了し、うち3名が加熱全卵2gの閾値を超えた。(安全性)

貼付局所の発赤が認められた例があったが、局所以外の反応や重篤な有害事象は認められなかった。

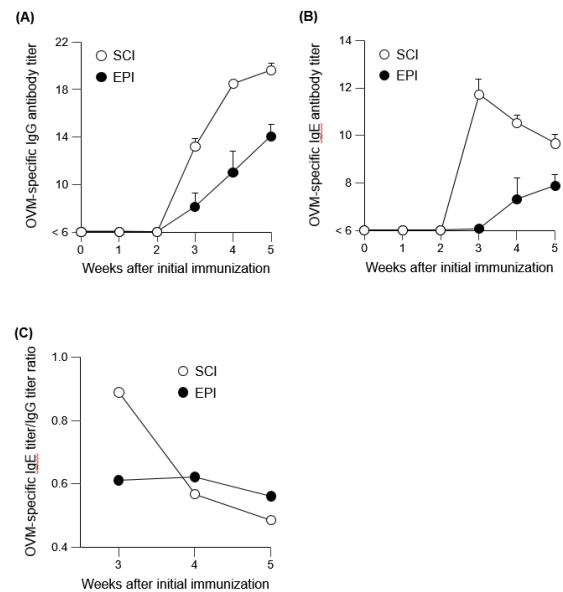
長期試験は平成30年3月末日で全例で完了予定であり、その後、キーオープンと解析を行い、次年度にプラセボ対照試験ならびに長期試験の結果を報告予定とする。

#### 4) アレルゲン装填HGの貼付に伴う免疫誘導効果

##### 1) 抗体産生

OVM装填HGは、patch法によりEPIするだけでSCI群と同様に免疫回数に依存した血清中OVM特異的IgGが観察された(Fig. 3A)。またSCI群において、免疫三回後にOVM特異的IgE抗体価が急激に上昇した一方、EPI群においては特異的IgG抗体価の上昇に伴い緩やかな特異的IgE抗体価の上昇が観察された(Fig. 3B)。そこで、OVM特異的IgEとIgG抗体価を比率で表したところ、SCI群は一過性にIgE抗体の比率が上昇しているのに対し、EPI群においては常に一定の比を示しているこ

とから、OVM特異的IgE抗体産生が誘導されにくい可能性が示唆された(Fig. 3C)。したがって、HG製剤は装填アレルゲン特異的な免疫応答を誘導するとともに、SCIと比較してEPIは特異的IgE抗体産生の急激な誘導が起りにくいことが明らかとなった。



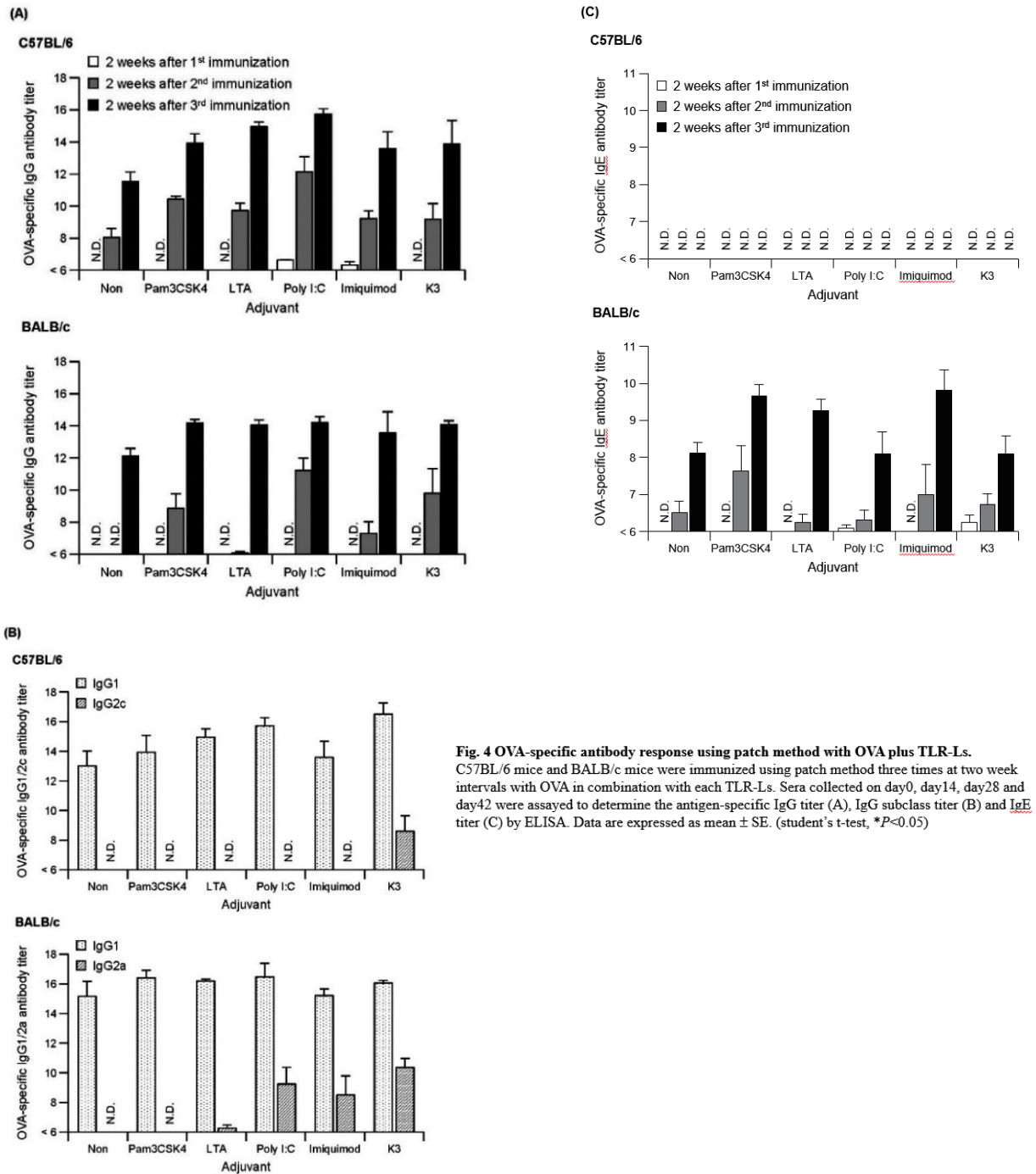
**Fig. 3 Ability of allergen-specific immune response using allergen-containing HG.**

OVM (1 mg)-containing HG was applied on BALB/c mice back skin (●). OVM (0.1 mg) was immunized subcutaneously in BALB/c mice (○). Sera collected were assayed to determine OVM-specific IgG (A) and IgE (B) titer by ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. The ratio of IgE/IgG titer was shown (C).

##### 2) アジュバントの探索

HGにおいて適用可能なアジュバントをマウス2系統にてスクリーニングした。OVAとアジュバントを装填したHGを用いて経皮免疫をしたところ、OVA特異的IgG抗体産生はすべてのアジュバント併用群においてOVA単独群よりも高い抗体価を示した(Fig. 4A)。

IgGサブクラス解析において、OVA単独群はIgG1抗体のみが検出されるのに対し、K3においては両系統ともIgG2cあるいはIgG2aの高い抗体価を示したことからTh1型免疫応答を誘導していると考えられる(Fig. 4B)。他のアジュ



**Fig. 4 OVA-specific antibody response using patch method with OVA plus TLR-Ls.** C57BL/6 mice and BALB/c mice were immunized using patch method three times at two week intervals with OVA in combination with each TLR-Ls. Sera collected on day0, day14, day28 and day42 were assayed to determine the antigen-specific IgG titer (A), IgG subclass titer (B) and IgE titer (C) by ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. (student's t-test, \* $P$ <0.05)

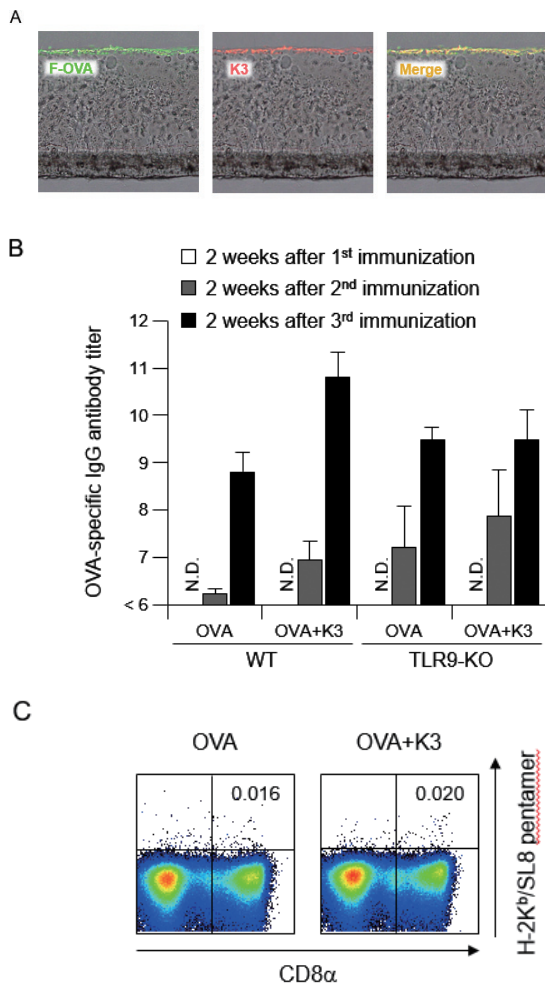
バント併用群である Poly I:C や Imiquimod においても IgG 2a の抗体産生が認められたが優位な差は認められなかった。さらに IgG 抗体価と同様に IgE 抗体価の測定を行ったところ、Poly I:C および K3 において OVA 特異的 IgE 抗体産生は OVA 単独群と変わらなかった (Fig. 4C)。

以上の結果より、K3 および Poly I:C が HG に適用可能なアジュバントとして有望であり、免疫増強効果や Th1 偏向性のみならず、OVA 特異的な IgE 依存性アレルギー反応は誘発されにくいと考えられることから、HG を用いたアレルギー免疫療法において、適当なアジュバントに

なる可能性が見いだされた。

### 3) K3 アジュバントの免疫活性

K3 における HG 上での存在状態を凍結切片にて確認した。蛍光顕微鏡で観察したところ、K3 は、抗原同様に HG 表面に高度に濃縮された状態を保っていることが明らかとなった (Fig. 5A)。



**Fig.5 Characteristics of K3 as an epicutaneous adjuvant**(A) Section of the patch containing 100  $\mu$ g F-OVA plus Texas red-K3 20  $\mu$ g. Each picture shows overlay of light microscopic analysis and fluorescent microscopic analysis.

(B) C57BL/6 mice and TLR9KO mice were epicutaneously immunized with OVA and OVA plus K3 using patch method. Sera collected after immunization were assayed to determine the antigen-specific IgG titer by ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SE.

(C) C57BL/6 mice were epicutaneously immunized with OVA and OVA plus K3 HG. After epicutaneous immunization three times at two week intervals, the presence of OVA specific CD8<sup>+</sup>T cells in regional lymph nodes of mice was analyzed by pentamer assay.

さらに K3 の活性機序を精査するため、OVA および K3 装填 HG を用いて WT (C57BL/6) あるいは TLR9KO マウスの背部皮膚に経皮免疫した。WT においては K3 を併用することで、OVA 単独群よりも優れた免疫応答が誘導された一方、TLR9KO では K3 併用の有無で OVA 特異的抗体価に変化は認められなかった (Fig. 5B)。

以上の結果より、K3 は TLR9 を介したアジュバント活性を行っていることが明らかとなった。また IgG サブクラス解析により K3 併用群が Th1 型優位の免疫応答であることから、OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞をフローサイトメーターにて解析し、細胞性免疫の誘導有無を評価した (Fig. 5C)。しかしながら K3 併用群において、OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞は検出できなかったことから、他の機序も検討する予定である。

### 今後の研究活動について

本研究では重症鶏卵アレルギー患者への経皮免疫療法を確立するために、1) 経皮免疫デバイスの作製 2) 探索的ランダム化比較臨床試験 3) 新デバイスによる経皮免疫の動物モデルでの評価を行い、鶏卵主要抗原オボムコイドを装着した親水性ゲルパッチを実用化し、臨床試験を開始、またマウスでの免疫原性を詳細に明らかにした。現在、臨床試験は継続中であり、さらに長期試験も実施中である。

引き続き研究の予定は以下の通りである。

#### 1) 親水性ゲルパッチの大量生産体制の確立

現在は手作業での作製であるが、今後のさらなる実用化のため、製造の自動化を行う。(平



成 29 年 7 月に製造体制を完成した。)

2) 長期臨床試験の完遂

平成 29 年 4 月末日にランダム化比較臨床試験組み入れを終了して、長期の治療の有効性を評価するため、実薬を用いたオープンラベルの長期試験を行っているところである。

3) 食物アレルギーモデル動物の治療実験

食物アレルギーの動物モデルを作製して、経皮免疫療法の有効性と免疫学的奏効メカニズムを探索する。

4) 医師主導治験の準備

実用化を目指して、医師主導治験体制整備を行う。上記 3) を含み、治療薬の GLP 基準非臨床試験を行い、PMDA の対面相談までの準備を行う。

**参考文献**

1) Ebisawa M, Ito K, Fujisawa T, Committee for Japanese Pediatric Guideline for Food Allergy TJSOPA, Clinical Immunology TJSOA. Japanese guidelines for food allergy 2017. Allergol Int 2017; 66: 248-264. (わが国の食

物アレルギー診療ガイドライン)

2) Matsuo K, Ishii Y, Quan YS, Kamiyama F, Asada H, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Compositional optimization and safety assessment of a hydrogel patch as a transcutaneous immunization device. Biol Pharm Bull 2011; 34: 1835-1840. (ハイドロゲルパッチの基礎的検討)

3) Matsuo K, Ishii Y, Quan YS, Kamiyama F, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Characterization of transcutaneous protein delivery by a hydrogel patch in animal, human, and tissue-engineered skin models. Biol Pharm Bull 2011; 34: 586-589. (ハイドロゲルパッチの基礎的検討)

4) Matsuo K, Ishii Y, Kawai Y, Saiba Y, Quan YS, Kamiyama F, Hirobe S, Okada N, Nakagawa S. Analysis of transcutaneous antigenic protein delivery by a hydrogel patch formulation. J Pharm Sci 2013; 102: 1936-1947. (ハイドロゲルパッチの基礎的検討)