

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
	岡田 直貴（オカダ ナオキ）	大阪大学薬学研究科	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	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	藤澤隆夫 What's new in food allergy 2017 APAPARI Workshop in Hanoi, 平成 29 年 4 月 29 日、ハノイ市（ベトナム）		

研究結果要約

食物アレルギーに対する治療として、現在は経口免疫療法が試みられているが、安全性の問題があるため標準治療とはされていない。本研究では、安全かつ効果的な治療法として、新規デバイスを用いた経皮免疫療法の開発を目指した。用いた治療デバイスは、効率的に経皮抗原送達が可能で親水性ゲルパッチ（Hydrogel patch: HG）で、これに卵白主要抗原であるオボムコイド（OM）を装填し、経皮免疫治療デバイス、OM-HGとした。対象は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）で、OM-HGまたはプラセボHG治療群に無作為割付して、1日12時間のHG貼付を24週間継続した（ランダム化比較試験）。主要評価項目は治療前後の経口負荷試験閾値の変化とした。その後、閾値が全卵2gを越えた例は経口摂取を開始、その他はOM-HGでさらに24週間の治療を行い、閾値を評価した（長期試験）。33名の一次登録があり、組み入れ基準を満たした22名にOM-HG（11名）、プラセボHG（11名）の治療を行い、24週で、それぞれ5名、2名が経口摂取開始、残りの6名（1名脱落）、8名が長期試験を完了した。閾値上昇量はOM-HG群がプラセボHG群より有意に高かった。アドヒアランスは良好で、OM-HG群全例に軽度の局所反応を認めたが、重症の全身反応は認めなかった。OM特異的IgEは両群とも変化なかったが、OM特異的IgG4抗体はOM-HG群で有意に上昇した。以上より、OM-HGを用いた経皮免疫療法は重症の鶏卵アレルギーに対する安全かつ有効な治療となり得る。

研究目的

小児期発症の食物アレルギーの多くは成長とともに自然寛解するが、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。診療ガイドラインが整備され、患者のQOLは改善しつつあるものの、症状の予防あるいは根治に導く治療法が未だ存在しないことが問題である。現在、試みられている経口免疫療法も一定の効果は認められているが、治療に反応しがたい難治例が残るとともに、少なからぬ副反応のリスクがあることから、一般的治療とはなりがたい¹⁾。そこで本研究では、難治性食物アレルギーの新規治療として、より安全で有効性の高い経皮免疫療法の開発をめざし、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して臨床研究を行うこととした。

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²⁻⁴⁾。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した。また、食物アレルギーの動物モデルを作成

して、経皮免疫療法のメカニズムに関する免疫学的解析も行うこととした。

研究計画及び研究手法

A. オボムコイド装填ハイドロゲルパッチ (OM-HG)

1) 製法

オボムコイドを濃度 14.28mg/ml となるように滅菌水で溶解し、0.2 μ m フィルターで濾過。無菌条件（クリーンベンチ）でオボムコイド水溶液を 70 μ l 滴下した。(1mg パッチ) 0.1mg パッチの場合は、オボムコイド水溶液を滅菌水で 10 倍希釈し、同様に 70 μ l 滴下した。液滴が親水性ゲルに吸収されるまで、クリーンベンチ内で約 4 時間静置、吸収後のハイドロゲルパッチを離型紙で覆ったのち、包装した。

2) 溶出試験

オボムコイド保持ハイドロゲルパッチの親水性ゲル/支持体部分を切り出し、PBS 1ml 中に入れ、室温下で振とうさせながら 1 時間溶出、溶出液を PBS で 20 倍希釈し、Lowry 法で蛋白定量を行った。(1mg パッチ) 0.1mg パッチの場合は、溶出液を PBS で 2 倍希釈し、同様に Lowry 法で蛋白定量を行った。

B. 重症鶏卵アレルギー患者に対する親水性ゲルパッチを用いた経皮免疫療法：二重盲検プラセボ対照比較試験及び長期オープン試験

1) 対象：経口負荷試験閾値の低い鶏卵アレルギー児（4～15歳）

（組み入れ基準）

・二重盲検プラセボ対照負荷試験 (DBPCPC)

で摂取可能閾値が加熱全卵 2 g未満

・文書による同意が得られた者

(除外基準)

・合併するアトピー性皮膚炎及び喘息のコントロール不良

2) 方法 :

1. 二重盲検プラセボ対照ランダム化比較試験

組み入れ基準を満たした患者を無作為に OM-HG、プラセボ HG に割付け、毎日、入浴後から翌朝まで(12 時間)貼付、24 週間継続する治療スケジュールとした。治療による経皮感作を防ぐため、貼付予定部位にアトピー性皮膚炎に対するプロアクティブ療法(= 8 カ所に分けた貼付部位(胸部と背部)に、貼付 2 日前と 1 日前(2 日/8 日間)にステロイド外用薬を塗布する方法)を行い、湿疹をコントロールした。貼付スケジュールは、OM 0.1mg 装填 -HG (またはプラセボ HG) を医師観察下で 1 時間貼付、副反応がないことを確認後、自宅で 2 週間継続、その後、OM 1mg 装填 HG (またはプラセボ HG) を医師観察下で 1 時間貼付、副反応がないことを確認後、24 週まで自宅で貼付継続した。治療期間中は患者が日誌で貼付部位の皮膚状態、その他の症状を記録するとともに、医師が 2 週、4 週、以後 4 週毎に貼付部位の状態を観察、その他、副反応について評価した。治療 24 週で、DBPCFC を行い、摂取可能閾値を決定した。12 週と 24 週に、血清総 IgE、卵白、オボムコイド特異的 IgE、IgG4 抗体、プリックテスト、好塩基球活性化試験 (CD203c) を行った。

主要評価項目 : 治療前後における負荷試験

閾値の変化 及び安全性 (有害事象)

副次評価項目 : 治療前後における特異的 IgE、IgG4 抗体、プリックテスト膨疹径、CD203c 発現の変化

2. 長期オープン試験

上記ランダム化試験治療時の DBPCFC で摂取可能閾値が全卵 2g 以上となった患者は加熱鶏卵の経口摂取を開始した。閾値が全卵 2g 未満の患者には全例 OM-HG による経皮免疫療法をさらに 24 週間行った。ランダム化試験と同一のスケジュールで、0.1mg OM-HG 貼付 2 週後、1mg OM-HG を 24 週まで継続貼付した。治療 24 週で、DBPCFC を行い、摂取可能閾値を決定した。12 週と 24 週に、血清総 IgE、卵白、オボムコイド特異的 IgE、IgG4 抗体、プリックテスト、好塩基球活性化試験 (CD203c) を行った。

主要評価項目 : 治療前後における負荷試験閾値の変化 及び安全性 (有害事象)

副次評価項目 : 治療前後における特異的 IgE、IgG4 抗体、プリックテスト膨疹径、CD203c 発現の変化

C. 食物アレルギー動物モデルの作成

1) Alum を併用した OVA アレルギーモデルマウス

100 μ g オボアルブミン (ovalbumin; OVA) と 2 mg アルミニウム塩 (Alum) を無菌条件下で混合し、BALB/c マウスの腹腔内に投与した。これらの操作を 2 週間隔で 2 回実施し、50 mg OVA 溶液を 2 日間隔で計 5 回経口投与した。下痢症状ならびに直腸温を観察するとともに、経時的に血清中 OVA 特異的 IgG 抗

体価・IgE抗体価をELISAにてモニタリングした。

2) OVA 特異的 IgE トランスジェニック (Tg) マウスを利用した OVA アレルギーモデルマウス
OVA-IgE Tg マウスから骨髄細胞および B 細胞を単離し、予めシクロフォスファミドを 2 mg/kg で投与した BALB/c マウスに各細胞を 5 x 10⁶ cells/head で静脈内投与した。細胞移入 7 日後に血清中 OVA 特異的 IgE 抗体価を測定し、移入した細胞が生着していることを確認した。10 µg OVA 溶液を静脈内投与した際の下痢症状ならびに直腸温を観察するとともに、経時的に血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価・IgE 抗体価を ELISA にてモニタリングした。

3) DSS 誘発腸炎を利用した食物アレルギーモデルマウス

2) のモデルマウスに対して、0.5% デキストラン硫酸ナトリウム (Sodium Dextran Sulfate; DDS) を溶解した飲用水を 7 日間自由摂取させた。その後、50 mg OVA 溶液を経口投与して、下痢症状ならびに直腸温を観察するとともに、経時的に血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価・IgE 抗体価を ELISA にてモニタリングした。

D. HG を用いた経皮免疫療法治療モデル

作成したそれぞれのモデルに対して、OM-HG を除毛背部皮膚に 24 時間貼付を 3 日間行い、経時的に血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価・IgE 抗体価を ELISA により測定した。また一定治療期間後に OVA 曝露 (10 µg OVA 静脈内投与あるいは 50 mg OVA 経口投与) によるアナフィラキシー誘発試験を

行った。

蛍光色素 AF647 あるいはエンドソーム内酸性条件下で蛍光を発する CypHer により標識した OVA を HG に無菌条件下で装填した。マウス除毛背部皮膚に貼付後、経時的に所属リンパ節を回収し、Staining buffer (0.5% FBS、0.05% NaN₃ を含む PBS) を用いて細胞懸濁液を調製した。Flow cytometer にて生細胞のみを解析し、CD11c⁺ 細胞を 6 つのサブセット形質細胞様樹状細胞、CD8⁺ 陽性樹状細胞、CD207⁻ 陰性真皮樹状細胞、CD207⁺ 陽性真皮樹状細胞、ランゲルハンス細胞、その他の CD11c⁺ 陽性細胞 (単球やマクロファージ) に分画した後、各種サブセットにおける AF647-OVA⁺ cells あるいは CypHer-OVA⁺ cells の細胞数を算出した。

結果と考察

A. オボムコイド装填ハイドロゲルパッチ (OM-HG)

臨床試験に用いた OM-HG を無作為抜き取り検査を行い、OM1mg-HG の OM 溶出量は 1.1mg/枚、CV2.4%、OM0.1mg-HG は 0.09mg/枚、CV 2.2% であることを確認した。

B. 重症鶏卵アレルギー患者に対する親水性ゲルパッチを用いた経皮免疫療法：二重盲検プラセボ対照比較試験及び長期オープン試験

一次登録患者は 36 名で、DBPCFC を行い、22 名が組み入れ基準 (閾値 < 全卵 2g) を満たして、無作為割り付けされた (プラセボ HG 群 11 名 (男 10, 女 1)、年齢 5.6 ± 1.6 才、

OM-HG 群 11 名 (男 6, 女 5)、年齢 4.9 ± 0.5 才)。すべて 24 週の治療期間を完了して、DBPCFC を行ったところ、プラセボ HG 群で 2 名、OM-HG 群で 5 名が閾値が全卵 2g を越えて、鶏卵の経口摂取を開始した。その他の患者は OM-HG をさらに 24 週間継続して、それぞれ 8 名、6 名が試験を完了した。(図 1)

主要評価項目である 24 週後の摂取可能閾値の変化は、OM-HG 群の閾値増加量がプラセボ HG 群に比べて有意に高値であった(図 2、3)。摂取可能総量も OM-HG 群で有意に高値であった。

前後の DBPCFC で誘発された症状 (ASCA スコア⁵⁾)も OM-HG 群で軽減される傾向が認められた(図 4)。アドヒアランスは両群とも 99% 以上で、良好であった。副反応は OM-HG 群で全例に貼付局所の発赤が認められたが、重大な全身副反応は認められなかった。免疫学的な変化では卵白、オボムコイド、卵黄に対する特異的 IgE は治療前後で有意な変化は認められなかったが、卵白、オボムコイドに対する特異的 IgG4 抗体は OM-HG 群で治療後に有意な上昇が認められた(図 5)。皮膚プリックテスト、好塩基球活性化試験はいずれの群でも有意な変化が認められなかった。

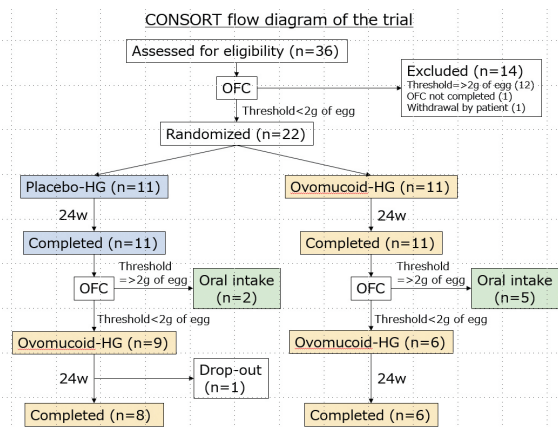


図 1 試験参加者のフロー

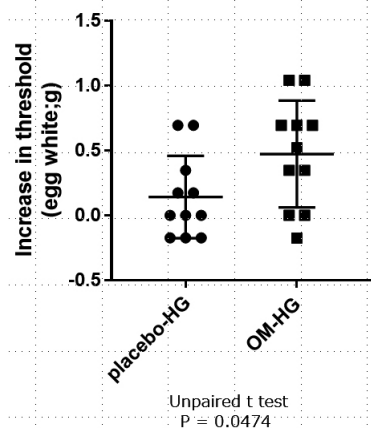


図 2 摂取可能閾値の変化

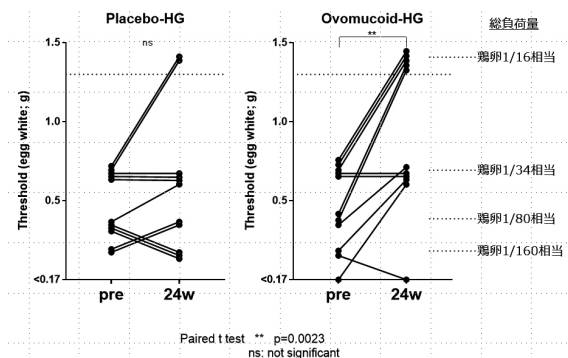


図 3 摂取可能閾値の変化 (治療前後)

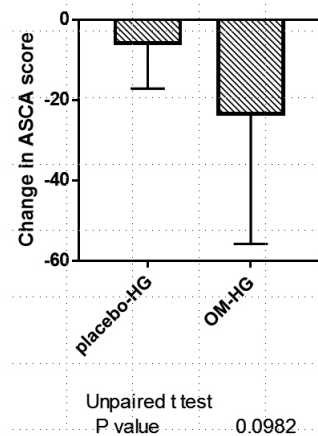


図 4 負荷試験による誘発症状の変化 (ASCA スコア)

長期試験では、プラセボ対照試験の24週で摂取可能閾値が全卵2gを越えなかった8名（プラセボHG群）、5名（OM-HG群）がOM-HGの貼付をさらに24週間継続した。摂取可能閾値の変化を図6に示す。OM-HGにより閾値が上昇する例がそれぞれ認められたが、症例数が少ないため、統計学的には有意な変化ではなかった。至適治療期間が24週か48週かを結論づけることはできなかったため、今後、症例数を増やして検討すべきである。

以上より閾値の低い鶏卵アレルギー患者に対するOM-HGを用いた経皮免疫療法パイロット試験で、少数例ながら、摂取可能閾値が有意に上昇すること、特異的IgG4抗体が上昇することが確認されたことより、今後、多施設でより多数例の臨床試験を行うことが妥当と考えられた。

C. 食物アレルギー動物モデルの作成

Alumを併用したOVAアレルギーモデルマウスでは、一過性に血清中OVA特異的IgG抗体価およびIgE抗体価の上昇が確認されたが、感作処理から1ヶ月後には血清中OVA特異的IgE抗体価の低下が認められ、OVAに対する

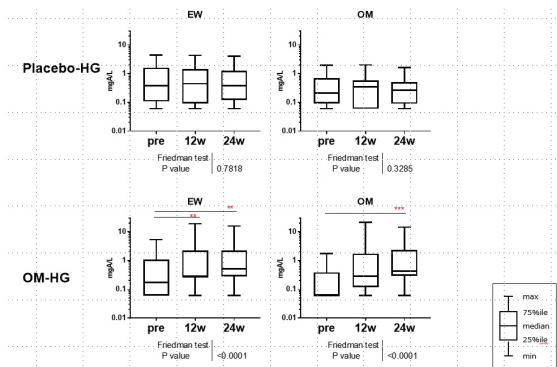


図5 特異的IgG4抗体の変化

アレルギーが自然寛解したことより、モデルとして不適と考えられた。OVA特異的IgE Tgマウスを利用したOVAアレルギーモデルマウスでは特異的IgE抗体は高値で維持されたが、静注による抗原チャレンジではアナフィラキシーが誘発されるものの、経口チャレンジでは誘発されなかったため、食物アレルギーモデルとして不適と考えられた。DSS誘発腸炎を利用した食物アレルギーモデルマウスでは特異的IgE抗体価の持続的上昇と経口チャレンジでの直腸温低下と運動量低下、軟便が認められ、モデルとして利用可能と考えられた。

D. 経皮免疫療法の治療モデルと免疫学的解析

AF647標識OVA装填HGを貼付したマウスの所属リンパ節においては、6時間後から12時間後にかけてAF647標識OVAを捕捉した皮膚常在性樹状細胞（ランゲルハンス細胞およびCD207陰性真皮樹状細胞）の割合が増加した。皮下投与ではこの現象はみられず、HGによる抗原投与で所属リンパ節で抗原が処理されることを確認できた。OVA-HGによる治療効果は現在、検討中である。

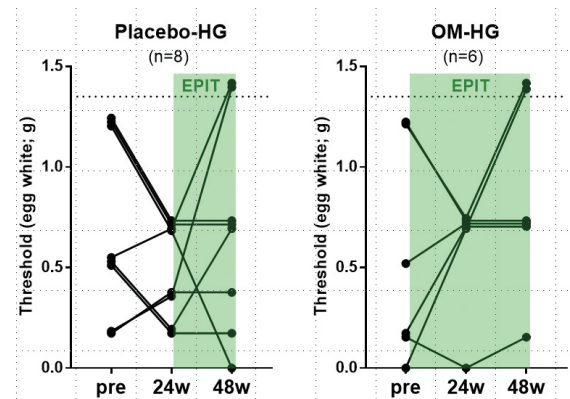


図6 長期試験における摂取可能域値の変化

今後の研究活動について

本研究は重症鶏卵アレルギーに対する新規免疫デバイスを用いた初めての臨床試験である。パイロット試験として、プラセボ対照で摂取閾値上昇の効果、およびこれに伴ってブロッキング抗体とされる特異的 IgG4 抗体の上昇効果を確認できたことより、さらに大規模な臨床試験を行うことの妥当性が確認されたと言える。今後は結果を十分に吟味した上で、プロトコルを改良して、多施設でより多数例の臨床研究を行うことをめざすが、臨床研究法に則った特定臨床研究としての実施が必要である。大規模臨床試験を行うためには、デバイス HG の大量生産体制の確立も必須となるが、多額の費用を要するため、十分な研究費を獲得する努力をしたい。

一方、困難とされている食物アレルギーの動物モデルについて、本研究では軽症の DSS 誘発腸炎を利用して、ヒトに近いモデルを確立することができた。今後は非臨床試験をさらに進めて、GLP 試験を実施して、医師主導治験を目指していきたい。

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)
- 5) Sugiura S, Matsui T, Furuta T, Sasaki K, Kando N, Ito K. Development of a prediction model for severe wheat allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2017. (経口負荷試験の誘発症状評価)