

研究課題名	重症食物アレルギーに対する経皮免疫療法の実用化に向けた非臨床・臨床 POC データセットの取得		
フリガナ	オカダ ナオキ		
代表者名	岡田 直貴		
所属機関 (機関名) (役職名)	大阪大学大学院薬学研究科 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	藤澤隆夫 (フジサワタカオ)	国立病院機構三重病院・院長	経皮免疫療法の治療効果判定 マーカーの探索
	神山文男 (カミヤマフミオ)	コスメディ製薬株式会社・代表取締役社長	経皮免疫デバイスの製造・供給
本助成金による発表論文, 学会発表	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ito S., <i>et al.</i>: Pharm. Res. 37(3): 35 (2020) 2. Kuwabara Y., <i>et al.</i>: JSA/WAO Joint Congress 2020 [Online Meeting, September 17-20, 2020] 3. Kuwabara Y., <i>et al.</i>: EAACI Annual Congress 2020 [Online Meeting, June 6-10, 2020] 4. 山下 凌ら: 日本薬学会第 140 年会 [誌上開催, 2020 年 3 月 26-28 日] 5. Yamashita R., <i>et al.</i>: 第 48 回日本免疫学会学術総会 [静岡県 (浜松市), 2019 年 12 月 11-13 日] 		

研究結果要約

アレルギー疾患における唯一の根治療法である免疫療法が食物アレルギーに対しても積極的に導入されるようになってきた。しかし、現行の免疫療法はアレルゲンを皮下注射法により頻回投与するものであり、注射針による疼痛があること、長期に定期的な通院が必要なこと、頻度は低いもののアナフィラキシーショックなどの重篤な副作用の危険性があることから患者側、医療側の双方にとって容易に施行できる治療法とは言いがたい。本研究では、皮膚を傷つけることなく微量のアレルゲンを皮膚内に浸透させることのできる親水性ゲルパッチ (HG) を活用し、小児食物アレルギーに対する新規経皮免疫療法 (EPIT) の開発に取り組んだ。マウスモデル実験において、アレルゲン装填 HG を用いた EPIT が特異的 IgG 抗体 (アレルゲン中和抗体) の産生を誘導し、従来の皮下注射免疫と比較して特異的 IgE 抗体 (アレルギー誘発抗体) の産生を低減できることを示した。これらの前臨床結果に基づいて、重症牛乳アレルギー患児を対象とした探索的臨床研究を実施したところ、牛乳アレルゲン装填 HG を適用した被験者 8 例のうち 4 例で症状誘発閾値が顕著に上昇し、経口免疫療法への移行を可能とした。また、奏効した患児においては血中特異的 IgE 抗体価の減少傾向と血中特異的 IgG4 抗体価の上昇傾向も認められ、HG を応用した EPIT が食物アレルギーに対する簡便な根治療法の確立に貢献できる治療戦略であることを実証した。

研究目的

食物アレルギーの診断および管理法の進歩により患者の生活の質 (quality of life; QOL) は改善しつつあるが未だ十分ではなく、なによりも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。そこで本研究では、ニーズの高い牛乳・鶏卵アレルギーに対する安全で有効性の高い経皮アレルギー特異的免疫療法 (epicutaneous immunotherapy; EPIT) の確立を最終目標とする。

将来的な医師主導治験への道筋をつけるために、本研究では EPIT の安全性・有効性に関する非臨床・臨床 POC データセットの収集を推進した。また、ここ数年来、免疫学ではアジュバントに関する数多くの分子レベルの知見が蓄積され、その免疫反応における重要性がクローズアップされてきている。アレルギー疾患に対する免疫療法においてもアレルギーにアジュバント効果をもつ物質を加えることで、より免疫療法の効果を上げ、同時にアレルギー量を減らすことで副作用の危険性を回避できる可能性がある。そこで、EPIT に適用可能な経皮アジュバント候補物質の探索を行った。さらに、免疫療法はアレルギー治療のなかで唯一根治が期待できる治療法であるにもかかわらず、その奏効機序はいまだ十分に理解されていない。その結果、免疫療法を行う際に、アレルギー量や継続期間の妥当性などを評価するようなバイオマーカーがなく、十分な科学的根

拠に基づいて治療を行っているとは言いがたい面がある。そこで、EPIT の有効性評価および奏効機序解析に有用なアレルギー特異的免疫療法モデルの作出に取り組んだ。

食物アレルギーに対する EPIT は、従来の皮下注射法 (subcutaneous immunotherapy; SCIT)、舌下法 (sublingual immunotherapy; SLIT)、経口免疫療法 (oral immunotherapy; OIT)、などと比較して簡便で全身性の症状誘発リスクが低い方法として期待されており、特に、OIT や SLIT が実施できない重篤な食物アレルギー患者などに選択されるべき治療法と考えられる。本研究は、食物アレルギーに対する新たな治療・予防・診断法の創出に繋がるトランスレーショナルリサーチとして、その成果が日本発・世界初の EPIT 用貼付剤の上市・臨床応用へと昇華されることを目指している。

研究計画及び研究手法

A. アレルギー装填親水性ゲルパッチ (hydrophilic gel patch; HG) の作製および長期安定性試験

1) HG の作製

アクリレート/ビニルピロリドン共重合体、ヒアルロン酸ナトリウム、乳酸オクチルドデシル、グリセリンを 100 : 45 : 30 : 0.2 の重量配合比率で酢酸エチル/アセトンに溶解し、ポリエチレンテレフタレート離型フィルムに厚さ 200 μm で塗工した。塗工シートを室温 30 分間、80°C、15 分間静置して有機溶媒を蒸発除去することで HG を得た。

2) アレルゲン装填 HG の作製

無菌条件（クリーンベンチ内）で低エンドトキシシン（ <1 EU/mg）ovalbumin (OVA)、 ovomucoid (OVM)、Milk protein concentrate (MPC)、あるいは AF647 標識 OVA を滅菌蒸留水に溶解し、HG（直径 1 cm の円形）の粘着面に $70 \mu\text{L}$ ずつ滴下した。液滴が HG に吸収されるまでクリーンベンチ内に静置し、OVA-HG、OVM-HG、MPC-HG、あるいは AF647/OVA-HG とした。臨床研究用のアレルゲン装填 HG は粘着面をタンパク質低吸着性離型フィルムで覆ったのち、アルミラミネートパックに入れて密封した（Fig. 1）。

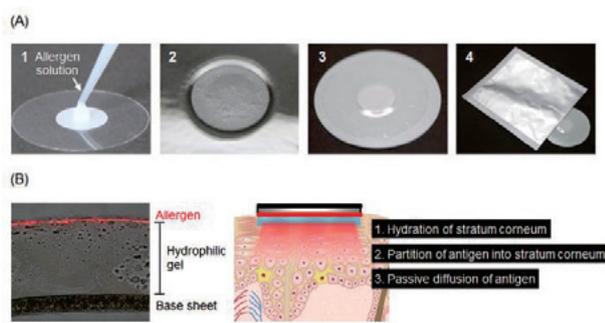


Fig. 1. Preparation of allergen-loaded HG and epicutaneous allergen delivery manner. (A) Allergen solution was added as a drop to a 1-cm diameter HG (1) and allowed to dry for a few hours (2). The HG was covered with low protein adsorptive film (3), sealed with aluminum laminate (4), and stored at 4°C . (B) The HG formulation immersed in the allergen solution formed a concentrated allergen layer on its surface and accelerated the epicutaneous penetration of allergen proteins by maintaining a high concentration of allergens on the skin surface.

3) 臨床研究用 OVM-HG および MPC-HG の長期安定性試験

臨床研究用 OVM-HG および MPC-HG を 4°C で保存し、経時的に HG からの OVM または MPC 溶出量を測定した。また、1 年間保存した臨床研究用 MPC-HG からの溶出液を DBA/2 マウスの背部に $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ で皮下投与し、用時調製 MPC 溶液を同様に投与した場合と血清中 MPC 特異的抗体価を比較することで保存後の MPC の免疫原性を確認した。

B. OVA-HG の安全性試験

Hartley モルモットの左右の耳に交互に OVA-HG ($1 \text{ mg OVA}/\text{patch}$) を 2 週間連日貼付し（貼付 12 時間/日）、皮膚局所反応を観察した。また経時的に血清中 OVA 特異的 IgG, IgE 抗体価を測定した。さらにこれらのモルモットに OVA 溶液を $2 \text{ mg}/\text{kg}$ で静脈内投与し、直腸温測定によりアナフィラキシー反応を評価した。なお対照群のモルモットには、背部皮膚に OVA 溶液を $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{head}$ で皮下注射した。

C. HG を用いた EPIT の免疫応答特性

1) OVM-HG を用いた経皮免疫応答解析

BALB/c マウスの除毛背部皮膚に OVM-HG ($1 \text{ mg}/\text{patch}$) を 24 時間貼付した。対照群には OVM 溶液 ($100 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) を皮下注射した。これらの免疫操作を 1 週間隔で 4 回実施し、経時的に血清中 OVM 特異的 IgG, IgE 抗体価を測定した。最終免疫 1 週間後に所属リンパ節 (dLN) を摘出し、調製した細胞懸濁液を OVM ($1 \text{ mg}/\text{mL}$) で再刺激した。48 時間培養後の上清中 IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17、IFN- γ および TNF- α を BioPlex マウスサイトカインアッセイを用いて定量した。

2) HG 貼付に伴う抗原提示細胞 (APC) の動態解析

BALB/c マウスの除毛背部皮膚に OVA-HG ($200 \mu\text{g}/\text{patch}$) あるいは HG を貼付した。対照群には PBS を皮下注射した。24 時間後にこれらのマウスから dLN 細胞を調製し、各種蛍光標識抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー解析

した。APC は、ランゲルハンス細胞 (LC; CD11c⁺, B220⁻, CD8 α ⁻, CD205⁺, CD207⁺, CD326⁺)、CD207⁺真皮樹状細胞 (dDC; CD11c⁺, B220⁻, CD8 α ⁻, CD205⁺, CD207⁺, CD326⁻)、CD207⁻dDC (CD11c⁺, B220⁻, CD8 α ⁻, CD205⁺, CD207⁻)、CD8 α ⁺ DC (CD11c⁺, B220⁻, CD8 α ⁺)、形質細胞様 DC (pDC; CD11c⁺, B220⁺)、単球およびマクロファージを含むその他の CD11c⁺細胞 (CD11c⁺, B220⁻, CD8 α ⁻, CD205⁻, CD207⁻, CD326⁻) に分画した。

3) HG により皮膚内送達された OVA のプロセッシング経路解析

BALB/c マウスの除毛背部皮膚に AF647/OVA-HG (200 μ g/patch) を貼付した。対照群には AF647/OVA 溶液 (10 μ g/100 μ L) を皮下注射した。経時的にこれらのマウスから dLN 細胞を調製し、各種蛍光標識抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー解析した。APC を上記 2) と同様に分画し、各種サブセットにおける AF647⁺ cells の細胞数を算出した。

4) OVA-HG 貼付に伴う OVA 特異的 T 細胞への抗原提示解析

OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスである OT-I マウスから CD8⁺ T 細胞 (OT-I 細胞) を、OT-II マウスから CD4⁺ T 細胞 (OT-II 細胞) をそれぞれ単離し、eFluor 670 にて蛍光標識した後、C57BL/6 マウスに移入した。これらマウスの除毛背部皮膚に OVA-HG (200 μ g or 1 mg/patch) を貼付した。対照群には OVA 溶液 (20 μ g/100 μ L) を皮下注射した。3, 4, 5 日後にこれらのマウスから dLN 細胞を調製し、フローサ

イトメトリー解析により移入した OT-I 細胞および OT-II 細胞の分裂増殖および活性化を解析した。

D. 重症牛乳アレルギー患児に対する MPC-HG を用いた経皮免疫療法

本臨床研究は、国立病院機構三重病院倫理審査委員会の審査・承認を受けて実施した。

1) 対象

経口負荷試験閾値が牛乳 1 mL 未満の重症牛乳アレルギー患児 8 名 (3 歳~8 歳の男女)

(組み入れ基準)

- ・経口負荷試験で確定診断され、寛解傾向のない牛乳アレルギー患者
- ・経口負荷試験による閾値 (総負荷量) が牛乳 3 mL 以下の患者
- ・法的保護者の文書による同意を得られ、かつ本人の意思確認ができた者

(除外基準)

- ・牛乳摂取状況が直近の 3 ヶ月間に大きく変化している者
- ・牛乳の経口免疫療法を中止してから 6 ヶ月以内の者
- ・何らかの免疫療法を行っている者
- ・心疾患、肝疾患、腎疾患などがあり、現在治療中の者
- ・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

2) 経皮免疫療法

組み入れ基準を満たした患者に、1 mg MPC-HG を夕刻の入浴後から翌朝起床後までの 12 時

間、健常皮膚に連日貼付した。貼付スケジュールは、1 mg MPC-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 8 週毎に貼付部位の状態を観察、二重盲検プラセボ対照負荷試験 (DBPCPC)、採血を行った。治療は閾値レベルの上昇が確認されたときに完了とし、重大な有害事象が発生した場合、牛乳またはカゼインに特異的な IgE の急激な上昇が認められた場合、あるいは 24~48 週間以上の治療後に閾値レベルの上昇が達成されなかった場合、は治療を中断した。閾値上昇に成功した被験者は、閾値に従って牛乳の経口摂取を開始した。

(主要評価項目)

- ・治療前後における経口負荷試験閾値の変化
- ・安全性および有害事象

(副次評価項目)

- ・治療前後における特異的 IgE, IgG, IgG4 抗体価

E. 重症鶏卵アレルギー患者に対する経皮免疫療法における治療反応性予測マーカーの探索

2017-18 年度に貴財団研究助成を受けて実施した重症鶏卵アレルギー患者に対する経皮免疫療法のランダム化プラセボ対照比較試験 (パイロット試験) では 22 名が登録され、11 名に OVM-HG、11 名にプラセボ (PL) HG が割り付けられ、24 週間の治療が行われた。その結果、24 週の時点で経口負荷試験閾値の変化量 (上昇) は

OVM-HG 群のほうが PL-HG 群より有意に大きかった。この試験において保存されていた治療前、治療後 12 週、24 週、36 週、48 週における血清検体を用いて、Th2 マーカーである TARC および高感度の特異的抗体測定法である DCP チップ法による OVM 特異的 IgE, IgG1, IgG4 抗体を測定した。

F. 経皮アジュバント候補物質のスクリーニング

1) 皮膚細胞における Toll-like receptor (TLR) の発現解析

マウス除毛背部皮膚と耳介皮膚から酵素処理によって表皮細胞懸濁液および真皮細胞懸濁液を調製した。各種蛍光標識抗体で染色した細胞をフローサイトメトリー解析した。

2) 経皮アジュバント活性の評価

C57BL/6 および BALB/c マウスの除毛背部皮膚に OVA (100 µg) と各種アジュバント候補物質 (Table 1) の混合溶液を装填した HG を 2 週間隔で 3 回貼付した。本実験で用いたアジュバント候補物質の用量は、感染症ワクチンやがんワクチンの基礎研究で用いられている投与量を参考に設定した。経時的に血清中 OVA 特異的 IgG, IgG1, IgG2a, IgG2c, IgE 抗体価を測定した。

Table 1. TLR ligands as adjuvant candidate applicable for EPIT using HG.

TLR ligand	Description	M.W.	Dose	Target TLR
Pam3CSK4	Synthetic mimic of bacterial lipopeptide	1500 Da	20 µg	TLR1/2
LTA-SA	Lipoteichoic acid from <i>Staphylococcus aureus</i>	4000 – 8000 Da	100 µg	TLR2
Poly I:C	Synthetic analogue of double stranded RNA	1500 – 8000 Da	50 µg	TLR3
Imiquimod	Small molecule agonist	240 Da	100 µg	TLR7
K3	Synthetic CpG-oligodeoxyribonucleotide	6300 Da	20 µg	TLR9

G. OVA アレルギーモデルマウスと HG を用いた経皮免疫療法治療モデル

OVA 特異的 IgE トランスジェニック (Tg) マウスの耳介皮膚に、片耳ずつ交互に 3 日間隔で 2 ヶ月間免疫治療した。EPIT 群では OVA 10 µg を装填した HG を 6 時間貼付し、SCIT 群では OVA 0.1 µg を皮下注射した。経時的に血清中 OVA 特異的 IgG および IgE 抗体価を ELISA にて測定するとともに、耳介皮膚の局所反応および厚さを評価した。背部皮膚を除毛した BALB/c に免疫治療後の血清を 10 倍希釈して皮内投与し、1% Evans Blue と 1 mg OVA の混合溶液を静脈内投与することで、受動的皮膚アナフィラキシー (PCA) 誘発試験を実施した。また、治療後 OVA-IgE Tg マウスに 100 µg OVA を静脈内投与することによるアナフィラキシー誘発試験を実施した。

H. 新規 HG の探索・開発

1) 基剤の選択

親水性アクリル粘着剤 2 種 (MAS683 と MASCOS10) を用いて、グリセリンおよび界面活性剤を添加して 2 種の新規 HG を作製した。MAS683 は親水性モノマーとしてビニルピロリドンを有する。一方 MASCOS10 は親水性モノマーとしてアクリル酸を有する。

2) 添加剤の選択

粘着物性を損なわない範囲でより水吸収性と水拡散性を向上させるため、各種親水性物質の添加を検討した。

3) 新規 HG の作製

MAS683、グリセリン、界面活性剤、低分子量ポリビニルピロリドン、を混合均一化し、乾燥後の厚さが 150 µm となるよう PET フィルム上に塗布して 80°C、30 分乾燥させた。

4) 高分子物質および低分子物質の新規 HG 表面での挙動評価

分子量 10,000 の FD10 (FITC 標識デキストラン) の水溶液を粘着層表面に滴下し、24 時間後、HG 断面の蛍光顕微鏡浸透性を評価した。また、分子量 829 の食用赤色素 14 号の水溶液を粘着層表面に滴下し、24 時間後、HG 断面の光学顕微鏡観察を行った。

5) 吸水率測定

現行 HG と新規 HG を湿度 100% の環境に 24 時間放置した後、重量変化を測定してパッチの吸水性を評価した。

結果と考察

A. アレルゲン装填 HG の作製および長期安定性試験

HG は、皮膚を傷つけることなく微量のアレルゲンを皮膚内に送達し、アレルゲン特異的な免疫応答を誘導できる画期的なパッチ製剤である¹⁾ (Fig. 1)。親水性アクリル系粘着剤をベースに、医薬品や化粧品などで使用されている安全性の高い基剤を混合して作製されており、厚さが約 200 µm と薄く柔軟であるため皮膚表面に密着・追従することができる。HG の皮膚粘着面にアレルゲン溶液を滴下すると、水は蒸発あるいはゲル内部に浸透し、高分子のアレルゲンが HG 表面に濃縮される。これを皮膚に貼付するだけで角質層が水

和・膨潤し、アレルゲンが角質層下へと徐々に送達される²⁾。

EPIT において継続的に使用するアレルゲン装填 HG には長期間保存した際の品質安定性が求められる。臨床研究用 OVM-HG (1 mg あるいは 0.1 mg OVM/patch) は、保存 1 ヶ月後までは安定に OVM を溶出できたが、さらに保存を続けると OVM 溶出率が徐々に低下するとともに離型フィルム側への OVM 吸着が認められた (Fig. 2)。したがって、現状の臨床研究用 OVM-HG は 1 ヶ月以上の保存が難しく、さらなる長期保存を可能とするには HG 構成基剤あるいは OVM 装填方法の最適化が必要と考えられた。

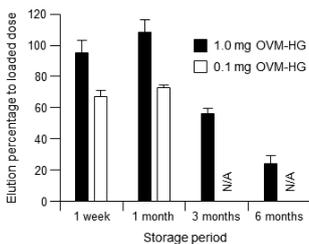


Fig. 2. Stability of OVM-HG over long-term storage. OVM-HG (1 mg or 0.1 mg OVM/patch) was stored at 4°C for the indicated period. A dissolution test and protein quantification was performed for OVM-HG. Dissolution rate was calculated for OVM-loaded in HG as 100%. Data are expressed as mean ± SEM of results from three OVM-HG.

臨床研究用 MPC-HG (1 mg MPC/patch) は、保存 1 年後まではほぼ 100% の MPC 溶出率を示した (Fig. 3A)。また 1 年保存した MPC-HG からの溶出液は、マウスにおいて用時調製した MPC 溶液と同等の MPC 特異的抗体価を誘導できた (Fig. 3B)。これらの結果から、臨床研究用 MPC-HG は少なくとも作製から 1 年後までは MPC の免疫原性を維持したまま安定に保存できる製剤であることが確認された。

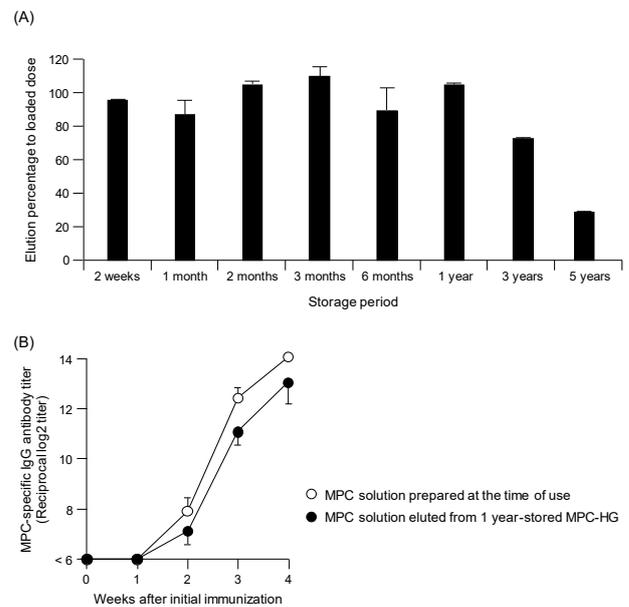


Fig. 3. Stability of MPC-containing HG over long-term storage. (A) A dissolution test and protein quantification was performed for MPC-HG. Dissolution rate was calculated for MPC-loaded in HG as 100%. Data are expressed as mean ± SEM of results from three MPC-HG. (B) Solution eluted from the MPC-HG stored for 1 year was used to subcutaneously immunize DBA/2 mice at 100 µg/100 µl. As a control, DBA/2 mice were similarly immunized with MPC solution prepared at the time of use. MPC-specific IgG titer in serum samples were measured by ELISA. Data are expressed as mean ± SEM of results from three mice.

B. OVA-HG の安全性試験

モルモットは皮膚炎を起こしやすくアレルギー誘発率が高い実験動物として知られている。

Placebo HG を連日貼付したモルモットにおいては、投与 14 日目まで貼付部位の耳介皮膚に目立った外観所見は認められなかった。一方、OVA-HG を貼付したモルモットは耳介皮膚を掻き篋り、貼付 5 日目から徐々に赤く腫上がり糜爛した。OVA-HG 貼付群の 14 日目における血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価は、連日 OVA を皮下投与した群と同等の誘導が認められたのに対し、OVA 特異的 IgE 抗体価は皮下投与群と比較して OVA-HG 貼付群では明らかな低値を示した。これらのモルモットに OVA 溶液を静脈内曝露したところ直腸温度が速やかに低下し、皮下投与群においては 4 匹中 2 匹が、OVA-HG 貼付群では 3 匹中 2 匹が死亡した。これらの結果から、ア

レルゲン装填 HG を同一部位に貼付し続ける、あるいは傷害された皮膚に貼付することで、アレルギーを皮下注射し続けた場合と同様にアレルギー感作に至ることが示された。したがって、アレルギー装填 HG を用いた EPIT のヒトへの適用においては、安全性に配慮した貼付部位の選択とスキンケアの併用が重要であると考えられた。

C. HG を用いた EPIT の免疫応答特性

OVM-HG を貼付したマウスの血清中 OVM 特異的 IgG 抗体価は、皮下注射群と同様に免疫回数増加に伴って上昇した。皮下注射群においては免疫 3 回後に OVM 特異的 IgE 抗体価が急激に上昇したのに対して、OVM-HG 群では緩やかな上昇を認めたのみであり、IgG 抗体価に対する IgE 抗体価の比は一定に保たれていた。また、これらのマウスから調製した dLN 細胞を OVM で再刺激したところ、皮下注射群では IL-2、IL-10、IL-13 といったサイトカイン産生が検出されたのに対して、OVM-HG 群においてはいずれも低値あるいは検出限界以下を示した。これらの結果をまとめると、バリア機能が保たれた皮膚への HG を用いたアレルギー投与は、皮下注射法と比較してアレルギー特異的 IgE 抗体や Th2 型サイトカインの産生を低く抑えることが可能であり、免疫療法における副反応誘発リスクを低減できると考えられた。

OVA-HG による経皮免疫は、dLN におけるリンパ節常在性 APC サブセット (CD8 α ⁺ DC, pDC, その他の CD11c⁺ cells) のポピュレーション比に

影響を与えなかったが、皮膚常在性 APC サブセット (LC、CD207⁺ dDC、CD207⁻ dDC) のポピュレーション比を有意に増大させた。これらの現象は、OVA を装填していない HG を貼付したマウスでも同様に認められた。一方、皮下注射免疫したマウスにおいてはいずれの APC サブセットもポピュレーション比に変動を認めなかった。したがって、HG を用いた EPIT は、SCIT と比較して皮膚常在性 APC サブセットの dLN への遊走を亢進することが明らかとなった。

AF647/OVA-HG を貼付したマウスの dLN においては、6 時間後から 12 時間後にかけて AF647/OVA を捕捉した皮膚常在性 APC サブセットである LC、CD207⁺ dDC、および CD207⁻ dDC の増加が認められた。また、リンパ節常在性 APC サブセットにおいても AF647/OVA 捕捉細胞数の増加が検出された。一方、AF647/OVA を皮内注射したマウスでは、dLN における AF647/OVA 捕捉 APC サブセットは 2 時間後には増加しており、その後減少するプロファイルを示した。皮下注射投与群では dLN におけるいずれの APC サブセットにおいても AF647/OVA 捕捉細胞数の顕著な増加は認められなかった。これらの結果から、EPIT に伴う免疫反応においては、dLN においてアレルギーを捕捉した APC が惹起する免疫イベントの寄与が SCIT による免疫反応よりも大きいことが示唆された。さらに HG によって皮膚内送達されたアレルギーのプロセッシング経路は、① 皮膚組織においてアレルギーを捕捉した皮膚常在性 APC サブセットが dLN へと遊走し、その後リンパ節常在性 APC サブセッ

トにアレルゲンを受け渡している可能性、あるいは② 輸入リンパ管を通過して皮膚から dLN に流れ込んできたアレルゲンを各種 APC サブセットが捕捉している可能性、が考えられた。これら二つの可能性のうち寄与の大きな経路を同定するため、各 APC サブセットを枯渇できる遺伝子改変マウスを用いた検討を計画している。

OT-I 細胞を移入したマウスに OVA-HG を貼付したところ、OT-I 細胞の OVA 特異的分裂増殖は OVA 皮下注射群と同様にほとんど認められなかった。一方、OVA-HG を貼付した OT-II 細胞移入マウスでは、OVA を皮下注射した群と比較して移入 OT-II 細胞の分裂増殖が亢進しており、EPIT が SCIT よりも抗原特異的 CD4⁺ T 細胞への抗原提示と活性化を促進することが示唆された。

D. 重症牛乳アレルギー患児に対する MPC-HG を用いた経皮免疫療法

本邦において牛乳アレルギーは、鶏卵に次いで罹患者数が 2 番目に多く、乳幼児期に最も発症率が高い。牛乳アレルギーは、牛乳タンパク質に含まれるカゼインが主要アレルゲンであり、これは加熱処理をしてもアレルゲン免疫原性は変化しない。チーズやヨーグルトの発酵食品であってもカゼインの免疫原性は変化しないため、牛乳アレルギー患児は多くの乳製品を摂取することができない。牛乳アレルギーは、乳幼児期 (0 歳) に発症率が高く、その後加齢に伴い自然寛解するケースが多いものの、牛乳アレルギー患児のカルシウム摂取量は健常児の半分以下であり、最も体が

発達する乳幼児期においてカルシウム不足は、骨や歯の成長に影響が大きい³⁾。牛乳アレルギー患児を持つ親は、代替食により不足栄養素を補っているものの、時間的・身体的・費用的な問題もあり親の QOL 低下を招きかねない。

本研究では、ヒトにおける EPIT の安全性・有用性を評価するため、重症牛乳アレルギー患児を対象とした探索的臨床研究を実施した。試験開始時における患児の臨床的特徴を Table 2 に示した。MPC-HG 貼付に伴い、蕁麻疹や発赤など局所の皮膚症状は認められたものの、アナフィラキシーショックなど重篤な副反応は全例において認めなかった。さらに EPIT 実施により、8 例中 4 例においてアレルギー症状誘発閾値が上昇し、牛乳 3 mL 以上を経口摂取することが可能となった (Fig. 4)。これは、タンパク量で牛乳 3 mL に相当するバターを摂取できることを示し、バターの含まれる多くの食品を経口摂取できるようになったことから大幅な QOL 改善につながったと考えられ、EPIT の有効性が示された。これらの患児においては、OIT に移行し継続的に治療を続けたところ、100 mL 近くの牛乳を飲むことが可能となった。さらに milk、 α -lactalbumin (ALA)、 β -lactoglobulin (BLG)、casein 特異的 IgE 抗体価は、EPIT 実施後緩やかに低下傾向を示し、一方、ALA、BLG、casein 特異的 IgG 抗体価およびブロック抗体として機能する IgG4 抗体価の上昇傾向が認められた。したがって EPIT は OIT が困難な重症アレルギー患児への導入部分としても非常に効果的であり、OIT への移行を可能にする手段であると考えられる。

Table 2. Demographic and clinical characteristic at the start of the studies.

Participants (n = 8)	
Gender (male:female)	5:3
Age (years); median (range)	6 (3-8)
Atopic dermatitis; number (%)	8 (100)
Asthma; number (%)	2 (25)
MILK-specific IgE (UA/mL) ; median (range)	116.5 (3.88-206)
ALA-specific IgE (UA/mL) ; median (range)	10.5 (0.1-77.3)
BLG-specific IgE (UA/mL) ; median (range)	9.3 (0.1-45.2)
Casein-specific IgE (UA/mL) ; median (range)	124.5 (4.81-227)
Threshold dose at DBPCFC (mL); median (range)	0.5 (0.5-1)

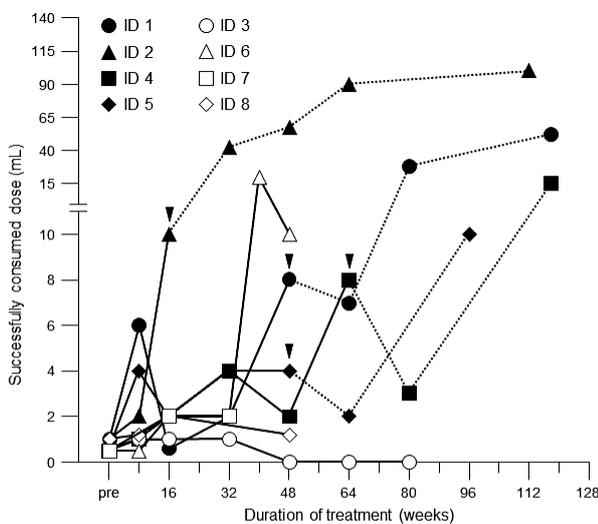


Fig. 4. Effect of EPIT using the MPC-HG on the dose of milk successfully consumed by patients with severe milk allergy. The OFC test was carried out in children suffering milk allergy after they had initiated EPIT. Black symbols (●, ▲, ■, and ◆) indicate patients that were able to drink milk without experiencing allergy symptoms and were able to switch to OIT; white symbols (○, △, □, and ◇) indicate patients for whom EPIT terminated; and ▼ shows the time point at which patients switched to OIT, and the subsequent change in the cumulative amount is indicated by a dotted line.

残念ながら 32 週目において特異的 IgE 抗体価に著しい上昇が認められた 2 例 (ID 3, ID 7)、MPC-HG 貼付部位の蕁麻疹が頻回となった 1 例 (ID 6)、閾値の改善効果が得られなかった 1 例 (ID 8) において本試験を中止した。milk および casein 特異的 IgE 抗体価が急上昇した症例においては、試験中止後特異的 IgE 抗体価の速やかな減少を示した。以上のことから、EPIT の実施により局所の皮膚反応やアレルギー特異的抗体価の上昇などの副反応が生じることも明らかとなり、HG の使用を中止することでその症状は速や

かに正常状態に戻ることが示された。

これらの探索的臨床研究のデータは、HG を応用した EPIT が簡便な食物アレルギー根治療法として非常に有望であることを示唆するとともに、試験中止につながった副反応を軽減するアプローチを導入することができれば、本療法の恩恵にあずかる食物アレルギー患児を大幅に拡大できる可能性を示唆した。

E. 重症鶏卵アレルギー患者に対する経皮免疫療法における治療反応性予測マーカーの探索

24 週の治療後に負荷試験閾値が卵白 2 g 以上となった 7 例と 2 g を越えなかった 15 例で比較すると、12 週と 24 週の血清 TARC 値は閾値上昇群で有意に高値であった。TARC の変動と閾値の間では有意な関連はみられなかった。本試験では試験期間中、アトピー性皮膚炎コントロールのためステロイド外用剤のプロアクティブ療法を行い、皮疹がほとんどない状態を維持できていたことより、血清 TARC 高値はアトピー性皮膚炎の状態を示さず、免疫療法による個体の免疫応答を反映している可能性が考えられた。

次に、高感度の DCP チップ法で特異的抗体を測定したところ、特異的 IgE は有意な変動を示さなかったが、特異的 IgG および IgG4 はそれぞれ 12 週、24 週に有意に上昇した。しかし、治療後の負荷試験の閾値上昇の程度と IgG1、IgG4 抗体の変化には明らかな関連は認められず、治療反応性のマーカーとしては、さらなる検討が必要と考えられた。

F. 経皮アジュバント候補物質のスクリーニング

アレルギー免疫療法は、治療が長期間に及ぶとともに時にアナフィラキシーショックなど重篤な副反応を誘発するなど、患者負担の大きな治療法であり、アレルギー用量・投与回数・投与期間の低減と安定した免疫応答の保証が望まれている。これらの問題を解決する方策として、免疫応答を増強・修飾できるアジュバントの併用が挙げられる。アジュバントを適用した HG 製剤の開発には、経皮投与によってアジュバント活性を発揮できる候補物質を新たに探索・同定し、得られた候補物質の安全性・有効性評価と活性機序の解明を図る必要がある。本研究では経皮アジュバント候補物質として、自然免疫と獲得免疫のクロストークに重要な TLR を標的とするリガンド分子に着目した^{4,5)}。

まず、マウス皮膚細胞における TLR の発現を解析したところ、APC として機能する LC および dDC には TLR1 から TLR9 まで全ての TLR 発現が確認された (Fig. 5)。ケラチノサイトにおいては TLR3、7、8、9 の僅かな発現が認められた。皮膚は病原体の侵入を防ぐ物理的バリアを構築しているだけでなく、病原体を排除する免疫学的バリアも備えており、皮膚に存在するこれらの細胞が TLR を介して病原体の侵入を迅速に察知し、自然免疫の誘導を促していると考えられる。したがって、今回発現が認められた TLR に対するリガンドを HG 製剤に適用することで、経皮アジュバント効果が発揮されるものと予想された。

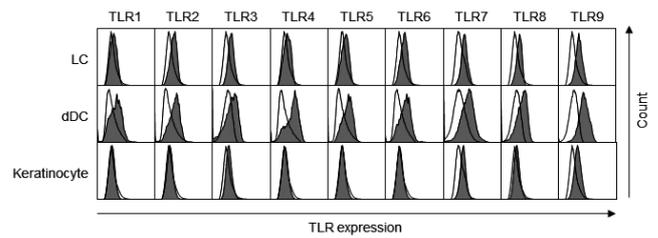


Fig. 5. Expression analysis of TLRs in skin cells. Epidermal cells and dermal cells were analyzed for the expression of TLRs by FCM. Open histogram represents isotype control group, and filled histogram represents staining group.

C57BL/6 マウスおよび BALB/c マウスに各種アジュバント候補物質を併用した OVA-HG を用いて経皮投与すると、OVA 特異的 IgG 抗体価はすべてのアジュバント併用群において OVA 単独群よりも高値を示し、またマウス系統間での差異は認められなかった。これら OVA 特異的 IgG 抗体のサブクラス解析を行ったところ、OVA 単独群は IgG1 抗体 (Th2 型 IgG サブクラス) のみが検出されたのに対して、Poly I:C 併用群と Imiquimod 併用群では BALB/c マウスにおいて Th1 型 IgG サブクラスの IgG2a が検出され、K3 併用群では両マウス系統において Th1 型 IgG サブクラス (IgG2c および IgG2a) の抗体価上昇が認められた。さらに OVA 特異的 IgE 抗体価は、Pam3CSK4 併用群、LTA-SA 併用群、Imiquimod 併用群において OVA 単独群よりも高値を示し、Poly I:C 併用群および K3 併用群では OVA 単独群と同レベルであった。以上の結果をまとめると、Poly I:C (TLR3 ligand) および K3 (TLR9 ligand) は、HG を応用した EPIT におけるアレルギー用量・投与回数・投与期間の低減が見込めるのみならず、アレルギー患者の Th2 型に傾いた免疫応答を Th1 型に偏向できる可能性をも有するアジュバントとして有望であると考えられた。

G. OVA アレルギーモデルマウスと HG を用いた経皮免疫療法治療モデル

OVA-IgE Tg マウスに EPIT および SCIT を実施したところ、SCIT 群の OVA-IgE Tg マウスでは血清中 OVA 特異的 IgG 抗体価が 3 週間で上昇し始めたのに対し、EPIT 群では 4 週間後から抗体価の上昇が認められた。一方、OVA 特異的 IgE 抗体価は両群ともに治療による影響を受けなかった。また、Th2 サイトカインである血中 IL-4 濃度は SCIT 群・EPIT 群ともに無治療群と比較して低下が認められた。SCIT 群では、頻回の OVA 注射投与により耳介皮膚の炎症や肥厚が観察されたのに対し、EPIT 群では皮膚刺激性・傷害性は認められなかった。以上の結果から、HG はアレルギー特異的 IgE 抗体価が高値に維持された状態でも貼付部位皮膚に重篤な局所反応を誘発することなく、SCIT と同様にアレルギー特異的 IgG 抗体の産生を誘導することが示された。免疫治療後の血清を回収して PCA 試験を実施したところ、血清 10 倍希釈での Evans Blue 漏出面積は SCIT 群で増加し、EPIT 群では減少が認められた。免疫治療を実施した OVA-IgE Tg マウスに 100 µg OVA を静脈内投与すると、無治療群および EPIT 群と比較して SCIT 群では直腸温のより大きな低下が認められた。これら OVA-IgE Tg マウスを活用した免疫治療モデルの結果から、HG を用いた EPIT は従来の SCIT と比較して安全性に優れた新規アレルギー特異的免疫療法として有望であることが示された。今後、本モデルの最適化検討を進めるとともに、HG を用いた EPIT の奏効機序の解析へと展開する予定である。

H. 新規 HG の探索・開発

現行の HG は親水性アクリル樹脂を主剤とし、グリセリンその他の低分子化合物を含むものである。アレルゲンの表面濃縮に優れ、食物アレルギーに対する経皮免疫療法用デバイスとして多くの薬理試験および臨床研究の用途に供されてきたが、本経皮免疫療法の臨床試験第 I 相への進展をスムーズにサポートするためには以下の課題に対する解決が望まれる。

- (1) 現行の HG ではアレルゲン水溶液を塗布して乾燥させるまでの時間が長く、自動化および大量生産のためには改良が必要である。
 - (2) 現行の HG の支持体、離型フィルムを含めた全体仕様は、クリーンブースでの手作業を意識したものであり、大量生産のためにはよりふさわしい仕様とすることが必要である。
 - (3) 組成物として医薬品経皮投与実績を有する添加剤のみからなる新しい親水性ゲルとすることにより、近い将来予想される正式の臨床試験第 I 相への進展をよりスムーズにする。
- そこで今回、これらの条件を具備した臨床試験用 HG の大量安定供給を見据えた新たな HG の開発に取り組んだ。

親水性アクリル粘着剤 2 種 (MAS683 と MASCOS10) のいずれを用いた新規 HG も粘着物性は良好であった。HG を水中に浸漬して吸水率を測定したところ MAS683 のほうが優れていたため、以降の検討で MAS683 を基剤として使用することとした。また添加剤としては、グリセリンおよび界面活性剤以外に低分子量ポリビニルピロリドンを含む組成がバランスの取れ

た粘着剤となることを見出し、新規 HG 組成物とした。

新規 HG は、高分子物質である FD10 を粘着層の表面に濃縮することができ、低分子物質である色素は粘着層の表面から全体に浸透させることができた。また、現行 HG とほぼ同等の吸水性能を有しており、物性的にも近似していた。今後、薬理的評価を含めてさらに性能評価を行い、臨床試験用の最終製剤へと完成させる予定である。

今後の研究活動について

(1) 食物アレルギーモデルマウスにおける HG を用いた EPIT の有効性評価

食物アレルギーモデルマウスの作成条件の最適化を継続するとともに、本モデルにおけるアレルギー装填 HG を用いた EPIT による有効性を血中 sIgG/sIgE タイター比測定、経口負荷試験におけるアナフィラキシー誘発閾値評価（体温変化、糞便観察）、経口負荷後の各種免疫学的パラメーター解析（血中ヒスタミン値変化、血中 TARC 値変化、肥満細胞・好塩基球の頻度・活性化状態、制御性 T 細胞の頻度、など）に基づいて検証する。また、EPIT の有効性に対するアレルギー用量ならびに貼付スケジュールについても検討する。ヒト食物アレルギーに近いモデルを確立することで前臨床研究をさらに推進し、早期の GLP 試験への展開を目指す。

(2) HG を用いた EPIT の奏効機序解明

食物アレルギーモデルマウスにアレルギー装填 HG を貼付した際の貼付部位皮膚につい

て、遺伝子発現変動を RNA-seq 解析により、アレルギーの動態・局在・捕捉細胞を Flow cytometry 解析あるいは蛍光イメージングにより精査する。また、dLN 中における免疫イベントを健常マウスにアレルギー装填 HG を貼付した場合と比較検討する。これらの結果から EPIT による減感作・脱感作に寄与すると考えられる免疫細胞あるいは免疫機能分子について、各種遺伝子改変マウスを用いた手法を組み合わせることでより詳細な機能解明を進める。

(3) HG を用いた EPIT の大規模臨床研究

本研究では重症牛乳患児に対するパイロット試験において、摂取閾値上昇の効果およびブロッ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。また、重症鶏卵アレルギーに対するパイロット試験においても同様の有効性が認められている。これらの結果は、HG を応用した EPIT の大規模臨床試験を実施する妥当性を示しており、今後は臨床研究法に則った特定臨床研究として多施設でより多数例の実施が望まれる。大規模臨床研究を行うためには、アレルギー装填 HG の大量生産体制の確立や総合賠償責任保険・普通傷害保険などに多額の費用を要するため、十分な研究費を獲得する必要がある。

参考文献

- 1) Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, Matsuo K, Matsuo K, Quan Y-S, Kamiyama F, Fujita T, Yamamoto A, Nakagawa S, Okada N. A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial

- infection. *J. Control. Release* 2008 Oct; 131(2): 113-20.
- 2) Matsuo K, Ishii Y, Kawai Y, Saiba Y, Quan Y-S, Kamiyama F, Hirobe S, Okada N, Nakagawa S. Analysis of transcutaneous antigenic protein delivery by a hydrogel patch formulation. *J. Pharm. Sci.* 2013 Jun; 102(6): 1936-47.
- 3) Dupont C, Chouraqui JP, Linglart A, Bocquet A, Darmaun D, Feillet F, Frelut ML, Girardet JP, Hankard R, Rozé JC, Simeoni U, Briand A. Nutritional management of cow's milk allergy in children: An update. *Arch. Pediatr.* 2018 Apr; 25(3): 236-43.
- 4) Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. *Nat. Rev. Immunol.* 2007 Mar; 7(3): 179-90.
- 5) Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2004 Oct; 5(10): 987-9.