

II. 急速経口免疫療法と葛根湯の併用による食物アレルギー疾患に対する根本的治療法の創出

ー東西医薬学の融合によるトランスレーショナルリサーチー

和漢医薬学総合研究所・消化管生理学分野	教授	門脇真
(同)	助教	山本武
医学部 小児科学講座	教授	足立雄一
(同)	助教	伊藤靖典
附属病院 小児科	医員	加藤泰輔

【研究背景、目的、概要】

わが国における食物アレルギー有症率は、乳児が約 10%、3 歳児が約 5%、保育所児が 5.1%、学童以降が 1.3~4.5%とされている。全年齢を通しては、推定 1~2%程度の有症率であると考えられており、近年さらに増加傾向にあると報告されている（日本医療研究開発機構（AMED）研究班 食物アレルギーの診療の手引き 2017）。現在食物アレルギーの治療法は、食物アレルゲン（原因抗原）を除去する除去食療法及び発症した症状を抑制する薬剤による対症療法に限られており、原因食物に対する耐性を獲得するような根本的な治療法は確立されていない。また除去食療法では、原因抗原となる食品には卵や牛乳、小麦等といった高栄養の食品が多いことから、特に小児で栄養面での偏りによる成長・発達への影響や、加工食品や外食など原材料の把握が難しい場合における誤食による死亡事故の発生等の多くの問題が報告されている。従って、耐性獲得（根本的治癒）に至る治療法や治療薬の開発が強く望まれている。

現在、一部の専門医施設では、食物アレルギー患者に対し免疫寛容を誘導し耐性獲得（根本的治癒）の可能性のある新規治療法として、原因抗原の経口摂取による経口免疫療法（OIT）が行なわれており、患者の一部での耐性獲得（根本的治癒）が報告されている。OIT の定義は、「自然経過では早期に耐性獲得が期待できない症例に対して、事前の食物経口負荷試験で症状誘発閾値を確認した後に原因食物を医師の指導のもとで経口摂取させ、閾値上昇または脱感作状態とした上で、究極的には耐性獲得を目指す治療法」とされている（日本小児アレルギー学会「食物アレルギー診療ガイドライン 2016」）。

本研究グループの研究者が所属する本学附属病院小児科でも、食物アレルギー児に対して、倫理委員会の承認を得て、2010 年より OIT を実施している（臨認 22-138 「重症食物アレルギー児に対する

原因食物を用いた急速経口免疫療法の有用性に関する研究)。

しかし、OIT の治療上の問題点は、

- ・ 一部の症例には治療効果はあるがエビデンスレベルは低い。
- ・ 経過中の症状誘発は必発である。
- ・ 予期せずアナフィラキシーを引き起こすことがある。
- ・ OIT 終了後に、治療対象食物の摂取により再び症状が誘発される場合がある。

などが挙げられている (日本小児アレルギー学会「食物アレルギー診療ガイドライン 2016」)。

また、OIT の治療機序に関しては不明な点が多く、これまでに動物モデルで OIT の治療効果を示す報告も殆どない。従って、OIT は未だ研究段階の治療法であり、日本小児アレルギー学会の「食物アレルギー診療ガイドライン 2016」及び日本医療研究開発機構 (AMED) 研究班「食物アレルギーの診療の手引き 2017」では、OIT を食物アレルギーの一般診療として推奨していないため、OIT は現時点では一般診療として厚生労働省に認可されていない。しかし、OIT は、現状では食物アレルギーに対する唯一の耐性獲得 (根本的治癒) に至る可能性がある治療法として期待され、多くの様々な臨床研究が試みられている。けれども、未だ十分な安全かつ治療効果が期待できる OIT の開発は報告されていない。

制御性 T 細胞の誘導が、OIT の主な治療機序の 1 つとして考えられている。従って、現在の OIT に改良を加えて、充分かつ安全に制御性 T 細胞を誘導することが可能になれば、OIT に伴う有効性や安全性の面での多くの問題の解決に繋がり、OIT を研究段階の治療法から一般的治療法へ発展させることが出来ると考えられる。しかし、現在まで制御性 T 細胞を確実に誘導することが出来る薬剤は報告されていない。これまでに本研究グループは、漢方薬・葛根湯が、主に腸管において制御性 T 細胞を誘導することにより、食物アレルギー病態モデルで症状の発症を抑制することを報告している (Int Arch Allergy Immunol. 169:146-156. 2016)。従って、OIT に葛根湯の投与を併用することにより、食物アレルギーに対する安全性及び有効性が高い根本的治療法の開発が可能となると考えられる。

本研究では、基礎研究から臨床研究へのトランスレーショナルリサーチにより、東西医薬学を融合した安全かつ効果的な食物アレルギー疾患の根本的治療法の確立を目指す。すなわち本研究では、OIT の主な治療機序であると推定されている制御性 T 細胞の誘導作用等により食物アレルギー病態モデルで有効性を示した葛根湯を、免疫寛容を誘導し耐性獲得 (根本的治癒) に至る可能性がある OIT に併用することにより、安全性及び有効性の高い OIT を確立すると共にその治療機序の詳細を明らかにすることを目的とする。そのために、基礎研究として抗原摂取によりアレルギー症状を呈する食物アレルギー病態モデルマウスに対して実験的 OIT を行い、葛根湯を併用することによる治療効果の亢進と

その治療機序を検討する。さらに、臨床研究として食物アレルギー患者に対して OIT や抗原摂取療法を施行し、葛根湯併用の有無による治療効果及び安全性を比較試験にて評価する。

「OIT と制御性 T 細胞誘導剤の併用療法」、「OIT と免疫寛容を誘導する漢方薬の併用療法」というアレルギー疾患に対する治療コンセプトは今まで報告されていない。従って、本研究はアレルギー治療における対症療法から根本的治療法へのパラダイムシフトを実現するための有用な治療法を示す独創的な研究となり、食物アレルギーの安全かつ効果的な根本的治療法の確立に繋がると考えられる。

和漢医薬学総合研究所消化管生理学分野の研究グループ（門脇真、山本武）は、研究課題「病態モデルを用いた OIT と葛根湯の併用療法の科学的根拠の解明」を遂行した。食物の原因抗原摂取により消化器症状を呈する食物アレルギー病態モデルマウスに対して、実験的 OIT を行う OIT モデルを確立し、OIT と葛根湯の併用療法が腸管に制御性 T 細胞をより多く誘導し、OIT の治療効果を亢進させることを明らかにした（PLoS One. 12, e0170577, 2017）。さらに、この制御性 T 細胞の誘導には、腸管のレチノイン酸代謝の制御によるレチノイン酸の増加が関与すること、この作用には葛根湯の構成生薬の葛根の主要成分であるプエラリンが関与することも明らかにした（Biochem Biophys Res Commun. 516, 626-631, 2019）。また、OIT と葛根湯の併用療法が、腸管の粘膜型マスト細胞の脱顆粒や活性化を有意に抑制することも明らかにした。

さらに、OIT の問題点の 1 つである脱感作状態の維持の改善を目的として検討を行い、OIT と葛根湯の併用療法により誘導された脱感作状態が、OIT のみの治療と比較して長期間にわたって維持され、葛根湯の併用は OIT の治療効率を上げるだけでなく、脱感作維持、さらには耐性獲得を誘導する可能性があることを示唆した。さらに、OIT 後に OIT よりも少量の食物抗原と葛根湯を投与することによって高い効率で脱感作状態を維持できることも明らかにした。

以上の本研究により、葛根湯を OIT に併用することより、食物アレルギーに対する治療効率や脱感作維持、耐性獲得などの有用性を上げる可能性を示した。

医学部小児科学講座の研究グループ（足立雄一、伊藤靖典、加藤泰輔）は、和漢医薬学総合研究所消化管生理学分野の研究グループの基礎研究結果を基に、「食物アレルギー児に対する急速経口免疫療法における葛根湯併用のランダム化比較試験による効果の検討（臨 28-100）」を開始した。しかしながら、2017 年 11 月の神奈川こども医療センターでの OIT 中の児のアナフィラキシーショックによる低酸素脳症の発症という重篤な有害事象により、危険性や社会的世論の影響を配慮した計画の変更が必要となった。そこで、より安全性の高い臨床研究に変更し、負荷試験の閾値、誘発された症状の重症度から、摂取しても症状が誘発されない安全な量を設定し、摂取させることとした。そして、臨床試

験対象者を、葛根湯の無作為化を行い、6ヶ月間安全な量での摂取を継続しながら、葛根湯を併用するグループと併用しないグループの2群間で、6ヶ月後の食物負荷試験での摂取できる閾値の変化を主要評価項目とする臨床試験に変更し、富山大学倫理委員会にて承認を受け、臨床試験を開始した（臨29-77食物アレルギー児の食事指導における葛根湯併用の耐性獲得誘導効果の検討—ランダム化比較試験—）。

2020年2月時点で、目標症例の60名（葛根湯30名、対照30名程度）に対して症例数は22名であり、6ヶ月の臨床研究が終了したのは葛根湯内服群12名、非内服群10名であり、脱落者はなく、自宅での誘発症状Grade3（重度）の有害事象は認めなかった。また、臨床的な有害事象や、総蛋白や肝機能などの一般生化学検査の明らかな異常は一人も見られなかった。現時点では葛根湯内服の明らかな優位性は見いだせていないが、内服に伴う有害事象は認められず、食物経口負荷試験による閾値評価では、平均閾値タンパク量が有意に上昇した。今後も引き続き症例エントリーを増やして研究を継続する予定である。

以上、世界に先駆けて作製したOITモデルを用いた基礎研究とそのトランスレーショナルリサーチである臨床研究を行い、経験的な治療法の探索ではなく、科学的根拠が明らかで、安全性と有効性を兼ね備えた新規根本的治療法を創出するための研究を行い、成果を示した。本研究成果は、西洋医薬学（OIT）と東洋医薬学（葛根湯）のそれぞれの利点を生かして問題点を補完的に解決することにより、食物アレルギー疾患を安全かつ効果的に根治に導くための可能性を示した。今後さらに、OITと免疫寛容を誘導する漢方薬の併用療法の治療機序を明らかにすることにより、他のアレルギー疾患や自己免疫疾患の治療に対しても、漢方薬のドラッグ・リポジショニングによる新たな治療戦略、創薬戦略を提示できると考える。

このような東西医薬学が融合した新規根本的治療法を開発し発信することは、薬の富山・和漢薬の富山としての特徴をさらに発展させることが出来ると思う。

Ⅱ-1 病態モデルを用いた経口免疫療法と葛根湯の併用療法の科学的根拠の解明

和漢医薬学総合研究所・消化管生理学分野 教授 門 脇 真
(同) 助教 山 本 武

【研究の背景と目的】

食物アレルギーは原因食物を摂取した後に免疫学的機序を介して蕁麻疹や下痢などの生体にとって不利益な症状が惹起される現象であり、現在、日本を含め先進国では小児を中心に増加傾向にある。しかし、未だ根本的な治療法が存在しておらず、原因食物を除去する除去食療法のような消極的な治療法が行われており、摂取食物の制限による栄養不足や誤食に対する不安などが患者の QOL の低下に繋がっている。また、不慮の原因食物摂取による重篤な症状の発症や死亡事故も報告されている。従って、食物アレルギーの根本的治癒に繋がる積極的な治療法の開発が望まれている。

経口免疫療法 (OIT) は原因食物を少量から投与し続けることによって、原因食物による症状発症の閾値の上昇や原因食物に対する脱感作状態を誘導し、最終的に耐性獲得 (寛解維持) に導く、食物アレルギーを根本的に治癒する治療法であると考えられている。実際に、OIT を実施した患者の一部に耐性が獲得されたことが報告されている。しかし、原因食物投与により治療を行うため、重篤な副作用を発症する可能性があることや必ずしも高くない治療成績、原因食物による耐性獲得効率の違い、治療機序が十分に解明されていないこと等により、未だ研究段階の治療法とされている。

我々は、これまでにヒトと同様に原因食物抗原摂取により消化器症状を発症する食物アレルギー病態モデルマウス (FA マウス) を用い漢方薬のスクリーニングを行い、葛根湯が食物アレルギーの発症を予防的に抑制することを明らかにしている[Int Arch Allergy Immunol.148:175-85.2009]。さらに、その作用機序のひとつが、腸管粘膜への制御性 T 細胞の誘導であることを明らかにしている[Int Arch Allergy Immunol.169:146-56. 2016]。そこで、この葛根湯の効果を応用して OIT による治療効果の向上や副作用の軽減などを目的とした新たな治療法として葛根湯と OIT の併用療法を考案した。この葛根湯と OIT の併用療法の効果を検討するために、原因食物の摂取によりアレルギー症状を発症する食物アレルギー病態モデルマウスに対して、臨床と同様に加熱した原因食物抗原を摂取させて OIT を行う実験的 OIT モデルを作製し、葛根湯と OIT の併用療法が食物アレルギーの脱感作誘導率を上げるか、また、食物アレルギーの耐性獲得に繋がるかどうか、さらに、これらの機序の検討を行った。

【方法】

動物実験

BALB/c マウスを使用し、国立大学法人富山大学動物実験取扱規則に基づき、動物実験委員会の承認のもと動物倫理に配慮して動物実験を行った。

食物アレルギー病態モデルの作製と経口免疫療法および葛根湯併用療法

5 週齢の BALB/c マウスを鶏卵白アルブミン (OVA) /水酸化アルミニウムで全身感作し、その 2 週間後から粗精製 OVA 粉末を 1 日おきに経口投与し消化器症状を発症する食物アレルギー (FA) マウスを作製した。この FA マウスに対して、実験的 OIT として加熱処理した OVA を 1 日 1 回、0.5 mg、1 mg、2 mg、4 mg、8 mg、12 mg、18 mg、20 mg (/日) と段階的に漸増させて投与した。OIT への葛根湯の併用は OVA 投与の 1 時間前に葛根湯 (500 mg/kg) を投与した。各治療後に食物抗原の経口負荷試験として粗精製 OVA を経口投与し、1 時間後にアレルギー症状の発症を糞便の状態で評価した。また、耐性獲得の検討として、各治療後に OVA 除去期間を設け、1 週間ごとに OVA 経口負荷試験による症状の評価を行った。さらに、耐性獲得を誘導するために治療後に葛根湯 (500 mg/kg) や少量の OVA を投与した。FA 病態モデルおよび治療モデルの詳細を図 1 に示す。

遺伝子発現解析

マウス近位結腸から RNA を抽出し、Genechip Mouse 1.0 ST array (Affymetrix) を使用して網羅的遺伝子発現解析を行った。GeneChip Analysis Suite Software (Affymetrix) により遺伝子発現量を数値化し、Gene Spring (Silicon Genetics) および IPA (Ingenuity Systems) を用いて群間での発現パターンの差を解析した。さらに、詳細な遺伝子発現の検討を、Thermal Cycler Dice Real Time System を使用し realtime PCR により行った。解析は GAPDH の発現量で補正し比で示した。

粘膜固有層細胞の単離および解析

摘出したマウス結腸から酵素処理により細胞を単離し、Percoll (Sigma) を用いた密度勾配法により細胞精製を行い、結腸の粘膜固有層細胞 (LP 細胞) を得た。PE 標識抗マウス ckit 抗体 (BioLegend)、FITC 標識抗マウス IgE 抗体 (BD Biosciences) および APC 標識抗マウス CD63 抗体 (BioLegend) を用いて染色し、フローサイトメーター FACS Canto II (BD Biosciences) を用いてマスト細胞の解析を行った。また、単離 LP 細胞を Staining Buffer Set (eBioscience) を用いて固定と透過処理を行い、PE 標識抗マウス CD4 抗体 (clone RM4-5; BD Biosciences) と APC 標識抗マウス/ラット Foxp3 抗体 (clone FJK-16s; eBioscience) により染色し、フローサイトメーター FACS Canto II を使用して、制御性 T 細胞の割合を測定した。

統計学的解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計学的有意差は Mann-Whitney 検定または Bonferroni/Dunn 型多重比較検定で行い、P 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

【結果と考察】

消化器症状を発症する FA マウスを作製し、食物抗原として OVA の投与によりアレルギー性消化器症状を発症するマウスに対して、OVA の漸増投与による実験的 OIT を行い、その治療効果を検討した (図 2)。未治療群 (FA 群) では、OVA 投与により 89.1 % のマウスが症状を発症したが、経口免疫療法処置群 (OIT 群) では 55.7 % のマウスが症状を発症し、FA 群と比較して有意に症状発症率が低下し、食物アレルギーに対する治療効果が認められた。OIT と葛根湯と併用処置群 (OIT+kakkont 群) では症状発症率は FA 群および OIT 群と比較して有意に低下し、OIT 群と比較して治療効果が高かった。一方、葛根湯のみの投与 (経口免疫療法処置なし) では、アレルギー性消化器症状を改善することが出来なかったことから、葛根湯が OIT による治療効果を増強したことが示唆された。

食物アレルギーの病態形成や発症には、腸管粘膜免疫系が関与することが明らかにされている [Science. 307:1920-5. 2005]。我々も FA マウスの発症には腸管粘膜免疫系が重要な役割を果たすことを明らかにしている [Int Arch Allergy Immunol.148:175-85.2009]。そこで、OIT や OIT と葛根湯の併用療法による治療機序を明らかにするために、各治療による腸管粘膜免疫系への効果を検討した。各群のマウス近位結腸から抽出した RNA を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、Th2 型免疫応答関連遺伝子群の発現量が FA 群では上昇し、OIT 群で低下し、OIT+kakkonto 群ではさらに低下することを明らかにした (図 3A)。そこで次に、Th2 型サイトカイン関連遺伝子発現を realtime PCR により詳細に定量した。Th2 型サイトカイン IL-4、IL-5 および IL-13 の mRNA 発現は、OIT 群で低下し OIT+kakkonto 群でさらに有意に低下した。また、Th2 細胞のマスター転写因子 GATA3 の mRNA 発現も同様に、OIT 群で低下し OIT+kakkonto 群でさらに有意に低下した (図 3B)。従って、OIT は FA マウスの腸管粘膜免疫系で過剰亢進した Th2 型免疫応答を抑制して治療効果を示し、さらに葛根湯との併用療法では、より強く Th2 型免疫応答を抑制して OIT を上回る治療効果を発揮したと考える。

経口免疫療法の主な治療機序として、免疫系を抑制的に制御する制御性 T 細胞の末梢血での増加が報告されている [J Allergy Clin Immunol. 124: 292-300. 2009]。我々も、これまでに葛根湯が腸管粘膜固有層に制御性 T 細胞を増加させ、食物アレルギーの発症を抑制することを報告している [Int Arch Allergy Immunol.169:146-56. 2016]。そこで、末梢血中、腸間膜リンパ節、および腸管粘膜層における

制御性 T 細胞の割合を測定し、OIT と葛根湯併用による治療効果の亢進への制御性 T 細胞の関与を検討した。末梢血中、腸間膜リンパ節では、制御性 T 細胞 (CD4⁺Foxp3⁺細胞) の割合は変化しなかったが、腸管粘膜固有層の細胞中の制御性 T 細胞が OIT+kakkonto 群で有意に増加していることを明らかにした (図 4)。従って、葛根湯の併用による腸管での制御性 T 細胞の増加が、腸管粘膜免疫系の Th2 型免疫応答を抑制し治療効果を増加させたことが示唆された。

これまでに、レチノイン酸が制御性 T 細胞の分化誘導を亢進することが報告されている[Annu Rev Immunol. 34: 369-94. 2016]。葛根湯の併用により制御性 T 細胞が増加した腸管での網羅的遺伝子発現解析により、レチノイン酸の産生や代謝に関連する遺伝子の発現が変化することを明らかにした (data not shown)。そこで、realtime PCR により、腸管での主要なレチノイン酸の産生や代謝の酵素である CYP26B1 (レチノイン酸分解酵素) と ALDH1A1 (レチノイン酸合成酵素) の遺伝子発現量の変化を測定し、CYP26B1 mRNA 発現量が OIT+kakkonto 群で有意に減少し、ALDH1A1 mRNA 発現量が増加傾向を示すことを明らかにした (図 5)。従って、OIT と葛根湯との併用療法により、腸管でのレチノイン酸量の増加により制御性 T 細胞が増加したことが示唆された。

マスト細胞の脱顆粒がアレルギー症状の発症の主な機序の一つであることが知られている。これまでに我々も、食物アレルギーの発症に腸管粘膜に分布する粘膜型マスト細胞が関与することを明らかにしている[PLoS One. 9: e85888. 2014]。そこで、OIT と葛根湯の併用療法による粘膜型マスト細胞の活性化への影響を検討した。各群の血液分析により、粘膜型マスト細胞に含有される mMCP-1 量が OIT+kakkonto 群で低いことを明らかにした (図 6A)。さらに、各群のマウス近位結腸から抽出した RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析により、マスト細胞脱顆粒関連遺伝子群の発現量を比較した。マスト細胞脱顆粒関連遺伝子群に含まれる多くの遺伝子の発現量が FA 群では上昇し、OIT 群で低下し、OIT+kakkonto 群ではさらに低下した (図 6B)。また、各治療後に LP 細胞の FcεRI⁺ckit⁺粘膜型マスト細胞における CD63 発現について解析した (図 6C、D)。LP 細胞の FcεRI⁺ckit⁺粘膜型マスト細胞における CD63 発現を示す平均蛍光強度は、OIT+kakkonto 群で FA 群に対して有意に低かった (図 6D)。また、CD63 発現を示す平均蛍光強度は、マウスの消化器症状と正に相関する傾向を示した。

従って、OIT への葛根湯の併用は、粘膜型マスト細胞の活性化の抑制を誘導し、副作用の軽減にも有効であることが示唆された。

さらに、OIT と葛根湯の併用による耐性獲得に対する効果を検討するために、OIT と葛根湯の併用療法後に OVA 未摂取期間を設け、その期間後に OVA 負荷試験を行い、耐性獲得を評価した (図 7)。OIT 群では OIT 直後では治療効果が見られ症状発症率が 66.7%に低下したが、治療後 3 週間目にはす

すべてのマウスが再び症状を発症した。OIT+kakkonto 群では、治療直後では症状発症率は 26.7%にまで FA 群および OIT 群と比較して有意に低下し、OIT 群と比較して高い治療効果（脱感作誘導率）を示した。さらに 3 週間後においても、OIT+kakkonto 群では治療効果が維持され（耐性獲得）、FA 群および OIT 群と比較して発症率は有意に低かった。従って、OIT への葛根湯の併用は、脱感作効誘導率を上げるだけでなく、脱感作維持、さらには耐性獲得の誘導効果もある可能性が示唆された。

OIT と葛根湯の併用療法は治療効果が長期間維持されることを明らかにしたが、その効率は充分ではなく、治療により脱感作が誘導されたマウスにおいて、3 週間後の OVA 負荷試験により再び症状を発症する個体が認められた。耐性を獲得するために OIT を長期間続けることは、副作用を誘発する可能性が高いと考えられる。そこで、治療効果維持の効率を上げる（耐性を獲得する）ことを目的として、OIT と葛根湯の併用療後に、種々の条件で OVA や葛根湯の投与を行い、治療効果維持への効果を検討した。葛根湯単独投与（500 mg/kg）では、何も投与しなかった群と比較して、葛根湯投与の効果は認められなかった（図 8A）。また、OIT 量よりも少量の OVA（5mg/マウス）の単独投与でも寛解を維持することが出来なかった（図 8B）。一方、葛根湯と少量 OVA（5mg/マウス）の併用投与により、治療効果が維持された（図 8A）。従って、少量の抗原とともに葛根湯を投与することが耐性獲得の誘導に繋がることを示唆された。

【総括】

葛根湯と経口免疫療法との併用療法は、腸管粘膜層に制御性 T 細胞を誘導することにより、食物アレルギー病態モデルの腸管粘膜免疫系での Th2 免疫系の過剰亢進の抑制やマスト細胞の脱顆粒や活性化の抑制を誘導して、食物アレルギー病態モデルで有効性を示したと考えられる。また、この併用療法は長期間治療効果を維持可能であることを明らかにした。さらに、長期間少量の食物抗原とともに葛根湯を投与することが寛解の維持につながると考えられる。

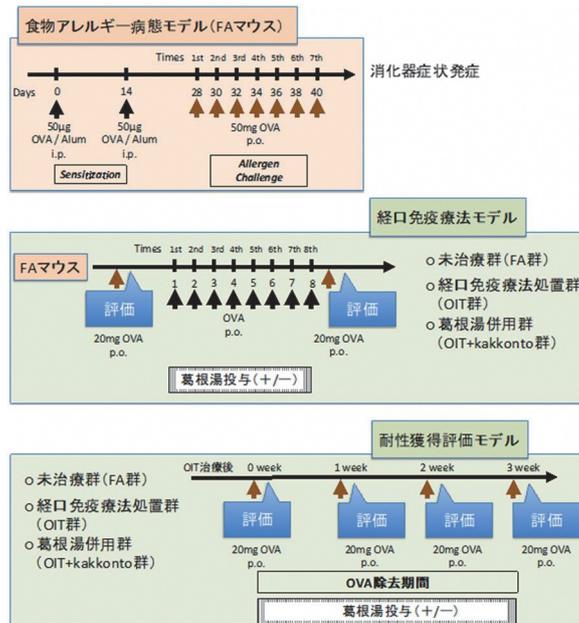


図 1. 病態モデルおよび治療モデルの作製

FA モデル、OIT モデルおよび耐性評価モデル作製のプロトコールを示す。

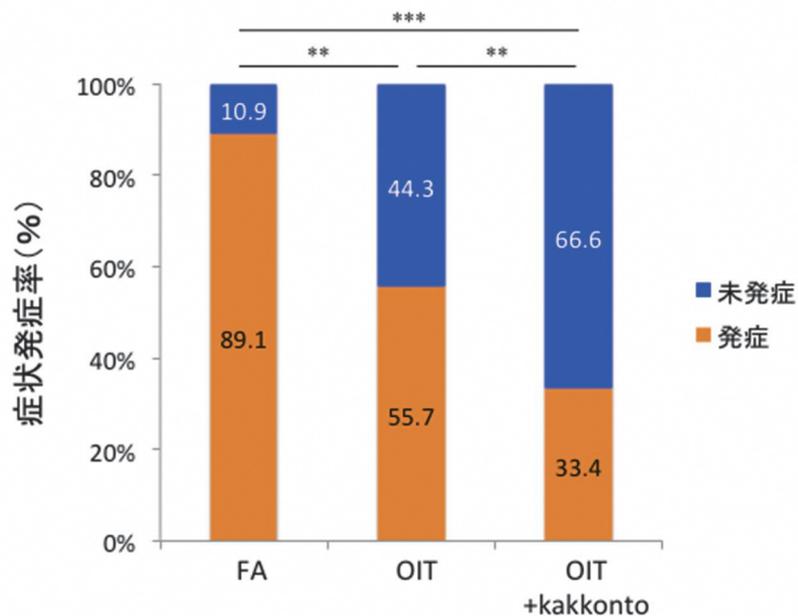


図 2. アレルギー症状発症率

未治療群 (FA 群)、経口免疫療法群 (OIT 群)、葛根湯併用療法群 (OIT+kakkonto 群) のアレルギー症状の発率を示す。n = 46-48、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

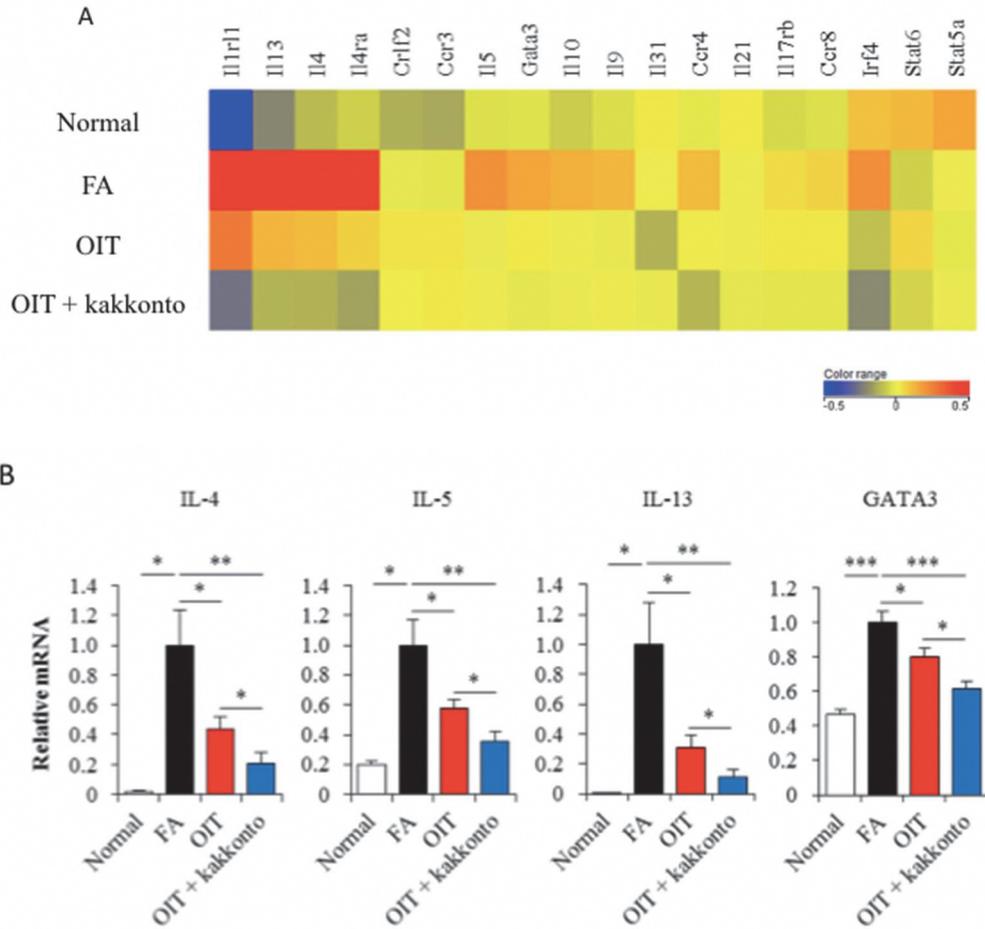


図 3. 腸管粘膜免疫系への効果

正常マウス群 (Normal 群)、未治療群 (FA 群)、経口免疫療法群 (OIT 群)、葛根湯併用療法群 (OIT+kakkonto 群) の食物アレルギーの発症およびその治療に伴う腸管粘膜免疫系の変化を示す。Genechip による網羅的遺伝子発現解析の結果を示す(A)。Realtime PCR による Th2 免疫応答関連遺伝子の発現解析の結果を示す(B)。n = 5-14、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

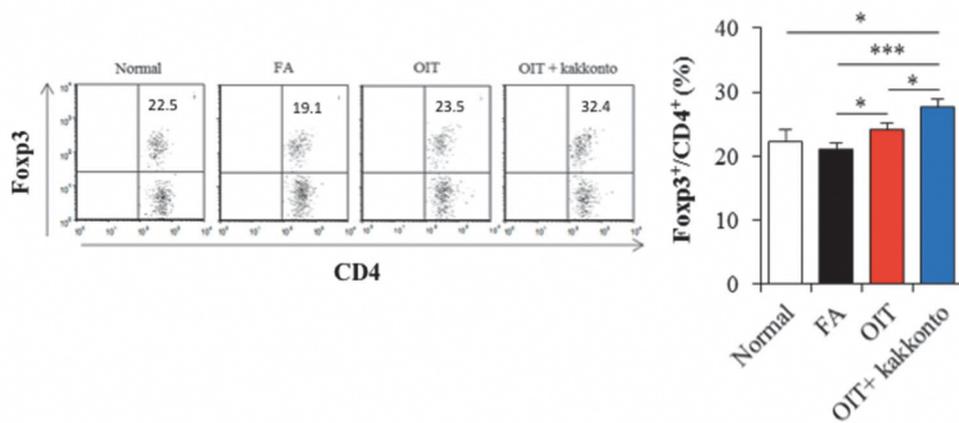


図 4. 腸管粘膜層細胞における制御性 T 細胞の割合

正常マウス群 (Normal 群)、未治療群 (FA 群)、経口免疫療法群 (OIT 群)、葛根湯併用療法群 (OIT+kakkonto 群) のフローサイトメトリーによる腸管粘膜層細胞の制御性 T 細胞 (CD4⁺Foxp3⁺細胞) の割合の解析結果を示す。n = 6-20、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$

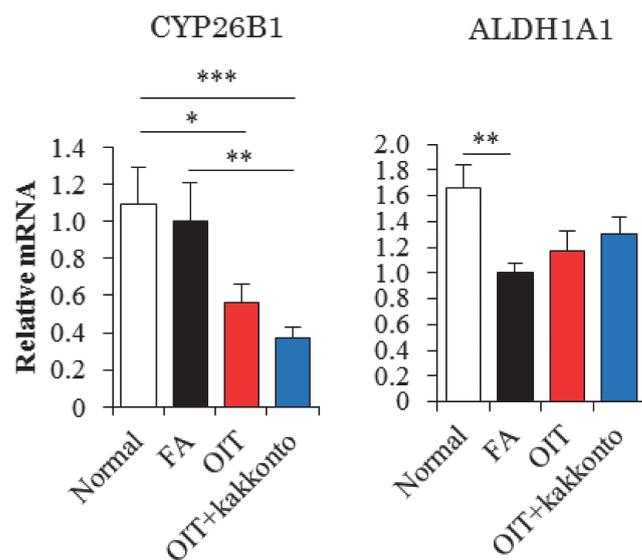


図 5. 腸管のレチノイン酸代謝関連遺伝子の発現変化

正常マウス群 (Normal 群)、未治療群 (FA 群)、経口免疫療法群 (OIT 群)、葛根湯併用療法群 (OIT+kakkonto 群) の Realtime PCR による CYP26B1 (レチノイン酸分解酵素) と ALDH1A1 (レチノイン酸合成酵素) の遺伝子発現の解析の結果を示す。n = 5-14、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

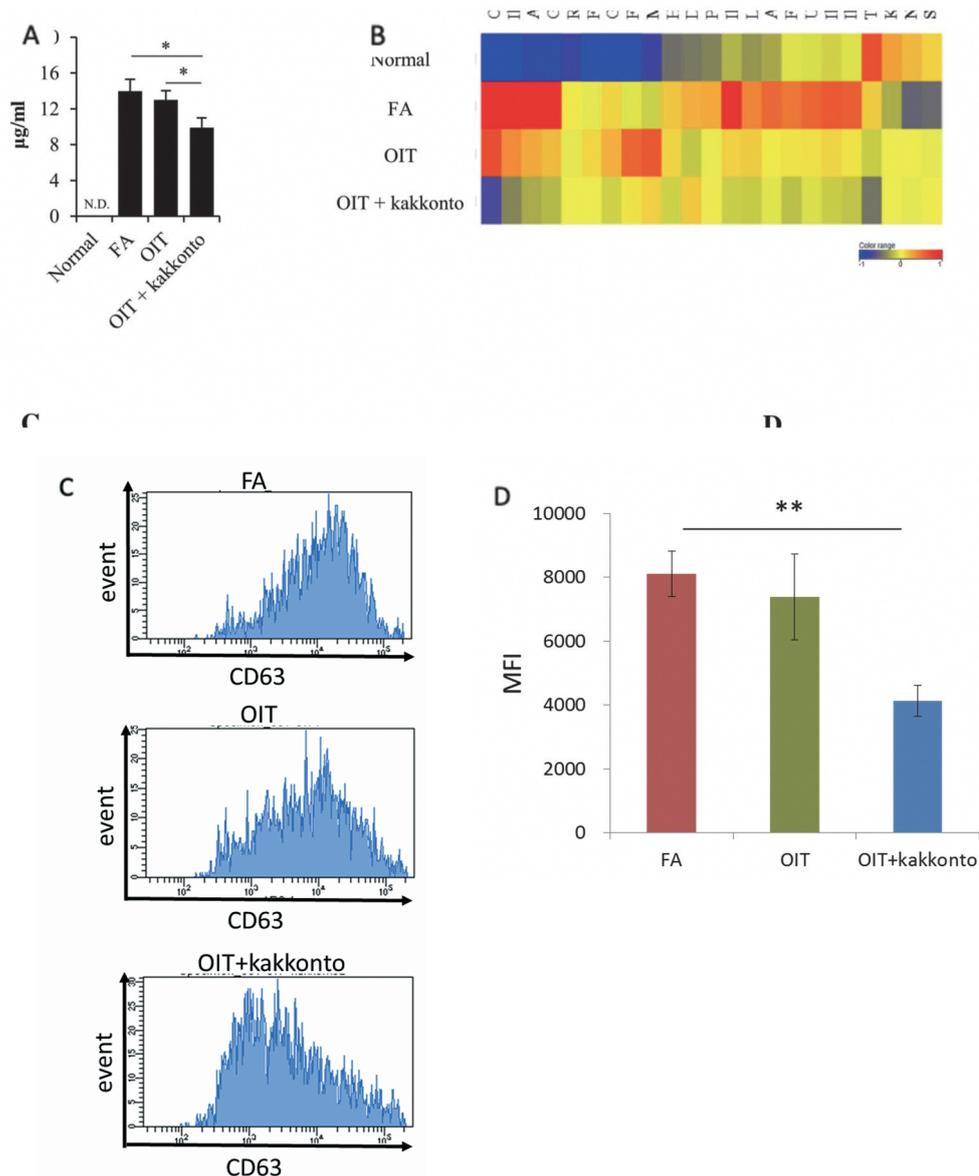


図 6. 各治療のマスト細胞に対する効果

正常マウス群 (Normal 群)、未治療群 (FA 群)、経口免疫療法群 (OIT 群)、葛根湯併用療法群 (OIT+kakkonto 群) の ELISA による血漿中 mMCP1 濃度の測定結果を示す (A)。n = 5-20、* $P < 0.05$ 。Genechip によるマスト細胞脱顆粒関連遺伝子の網羅的遺伝子発現解析の結果を示す (B)。LP 細胞中の $Fc\epsilon RI^+ ckit^+$ 粘膜型マスト細胞における CD63 発現を測定した。フローサイトメトリーによる CD63 発現解析の蛍光強度の典型例を示す (C)。 $Fc\epsilon RI^+ ckit^+$ 粘膜型マスト細胞における CD63 の発現を平均蛍光強度で示した (D)。LP 細胞の $Fc\epsilon RI^+ ckit^+$ 粘膜型マスト細胞における CD63 発現は、FA 群に対して OIT+kakkonto 群で有意に低かった。n = 14-19 ** $P < 0.01$

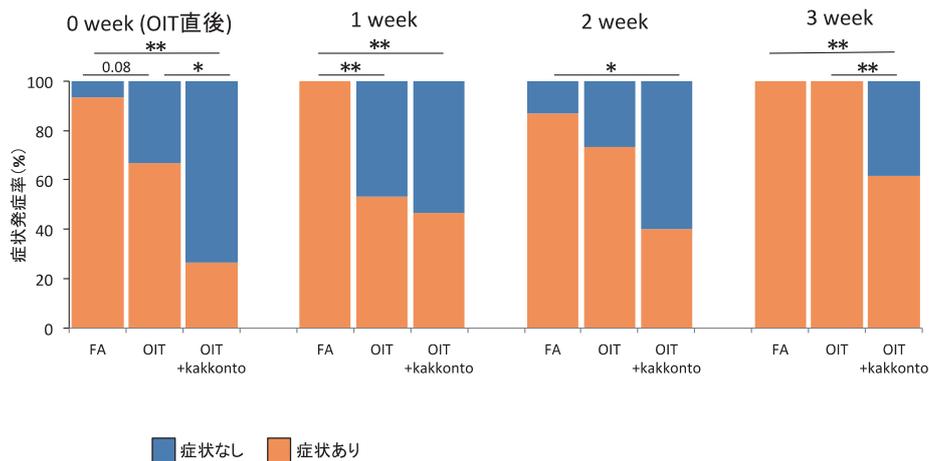


図 7. 各治療による脱感作維持効果

未治療群 (FA 群)、経口免疫療法群 (OIT 群)、葛根湯併用療法群 (OIT+kakkonto 群) の治療終了後、抗原除去を行った後のアレルギー症状の発率を示す。n = 13-15、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

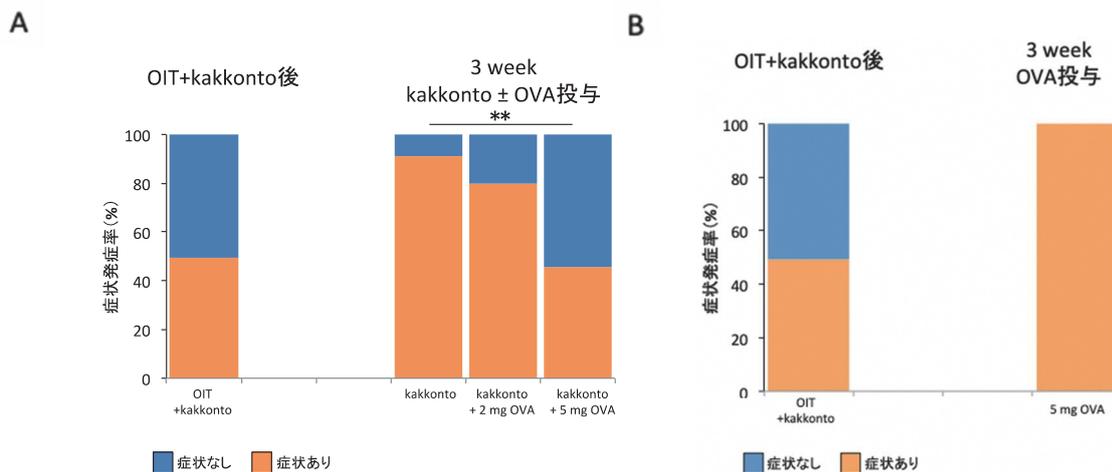


図 8 OIT と葛根湯の併用療法後の各種投与による脱感作維持効果

葛根湯併用療法群 (OIT+kakkonto 群) の治療終了後に、葛根湯の単独投与 (A)、葛根湯と少量 OVA (2 mg および 5 mg) の併用投与 (A)、OVA 単独投与 (B) によるアレルギー症状の発症率を示す。A: n = 10-22、** $P < 0.01$ 、B: n = 7-9

II-2 食物アレルギー児に対する急速経口免疫療法における 葛根湯併用のランダム化比較試験による効果の検討

医学部医学科・小児科学 教授 足立 雄一
(同) 助教 伊藤 靖典
附属病院 小児科 医員 加藤 泰輔

【研究の背景と目的】

近年、食物アレルギーに罹患する子どもたちの数が増加傾向にある。食物アレルギー診療ガイドライン 2016 では、食物アレルギーの管理・治療としては、必要最小限度の除去を行い、自然な耐性獲得（寛解）を待つのが主たる方針である。近年では、食物負荷試験が普及し、負荷試験の結果を踏まえた食事指導をおこなうことで、耐性獲得誘導を目指しているが、摂取可能（耐性獲得）となる児もいる中で、耐性獲得できない児も存在する。また、安全な量での摂取を指導しても時にアレルギー症状を生じることもあり、必要最低限の食事摂取の有効性・安全性については未解決な問題が多く存在している。

経口的免疫寛容を適正に誘導することができれば、将来の耐性獲得を期待できる。漢方薬は複数の治療標的に作用することによって、生体の三大調節機構（神経系、免疫系、内分泌系）の病的なバランスの偏りを改善することを目的にしている方剤が多く、アレルギー疾患のような多因子性疾患の治療に対する多成分系である漢方薬の基礎的及び臨床の有効性が示されている。葛根湯は、感冒症状で使用される代表的な漢方薬であるが、共同研究者の和漢医薬学総合研究所の山本、門脇らにより、マウス食物アレルギー病態モデルにおける葛根湯の食物アレルギーの発症抑制効果が報告され、食物アレルギー患者に対して、耐性獲得誘導を促す補助的治療手段となりえる可能性が示され、本研究ではヒトの食物アレルギー児に対して葛根湯を併用することで耐性獲得誘導への効果・安全性をランダム化比較試験にて評価することを目的とした。

【本研究の意義】

葛根湯の併用による重症食物アレルギー患者への食事指導を施行することの安全性、有効性が立証されれば、これまで食物アレルギーで自然耐性化の見込めないような患者に対しても、積極的な食事指導を検討することができ、患者の QOL の向上が期待できると考える。

【成果報告】

① 食物アレルギー児に対する経口免疫療法による重篤な後遺症を発症した事例を受けての世論・学会での注意喚起による研究への影響

まず、最初にこの研究を立案し、申請した後に、食物アレルギーの経口免疫療法において社会的な大きな問題が生じたため、研究計画の変更が必要になった。当初、重症な食物アレルギー児を対象に、入院での急速経口免疫療法を計画していた。当大学でも経口免疫療法を5年前より臨床承認を得た上で実施してきた。

具体的な方法としては、重症の食物アレルギー児に対して、入院した上で、誘発される原因食物を摂取させることで徐々に症状が出にくくなる状態（減感作状態）を誘導し、その後自宅でその量を維持し耐性獲得（根本的治癒）させるという治療であった。この場合、原因食品について誘発される量を超えて原因食品を摂取させる必要があるため、入院の上、医師が立ち会いのもと十分に安全性に配慮し施行してきた。本施設では生命の危機を有するような重篤な症状は認めなかったが、誘発症状は認めることが多くあった。当初はこの治療に葛根湯を併用することで、重篤な副反応の抑制効果を期待して評価する計画を立案していた。

しかしながら、2017年11月14日に神奈川こども医療センターにおいて、経口免疫療法中の児が自宅でアナフィラキシーショックを生じ、低酸素脳症という重篤な有害事象を生じたことがテレビやインターネット、新聞で報道された。その後、11月20日に日本小児アレルギー学会から全国において経口免疫療法に関連した重篤な副反応が少なからず存在することが報告された。

その為、当初立案していた入院しての急速経口免疫療法での臨床試験について、危険性や社会的世論の影響を配慮し立案の変更が必要となった。

② 安全性を踏まえた臨床研究の立案・大学での倫理承認

上記を踏まえて、より安全性の高い臨床研究に変更した。

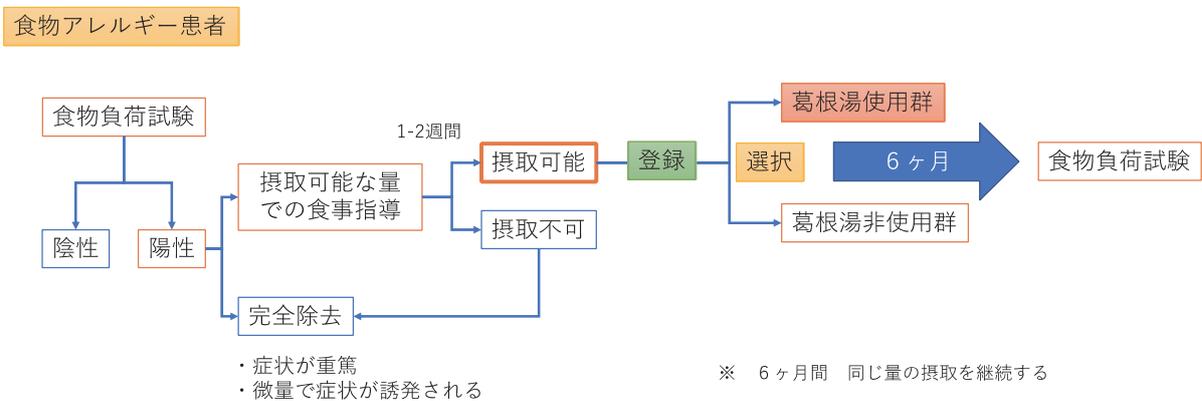
- ・食物アレルギー児に対して食物負荷試験を施行し、誘発症状が認められた量を「閾値」と判定する。
- ・負荷試験の閾値、誘発された症状の重症度から、摂取しても症状が誘発されない安全な量を設定し、摂取させることとした。これは、通常食物アレルギーの診療でおこなわれる「必要最小限の除去」である。

上記指導によって自宅で安全に摂取可能である児を臨床試験対象者とし、葛根湯の無作為化を行い、6ヶ月間安全な量での摂取を継続しながら、葛根湯を併用するグループと併用しないグループの2群間で、6ヶ月後の食物負荷試験での摂取できる閾値の変化を主要評価項目とする臨床試験に変更した。

③ 臨床試験の開始

2017年11月27日富山大学倫理委員会にて承認を受け、臨床試験を開始した（臨29-77 食物アレルギー児の食事指導における葛根湯併用の耐性獲得誘導効果の検討—ランダム化比較試験—）。UMIN（大学病院医療情報ネットワーク研究センター）にも臨床試験登録を完了した（UMIN000030175）。その後、葛根湯が飲めない児も多く、ランダム化ができない状況となり、臨床研究の遂行が困難となったため、2018年6月に研究計画を一部変更し、葛根湯を内服できる児とできない児に振り替わる非ランダム化比較試験に変更した。

研究の流れ



④ 2020年2月現在の進捗状況

登録症例数： 22名（うち、6ヶ月後評価終了 22名）

登録平均年齢は6.7歳（男児13名、女児9名）であり、原因食品は鶏卵11名、牛乳8名、コムギ3名であった。

登録症例背景

葛根湯内服群・非内服群において、年齢・男女比・合併症・総IgE・末梢血好酸球数に群間有意差は認められなかった。

	内服群 n=12	非内服群 n=10	p 値
登録時閾値(タンパク量 : mg)	20.5	66	p=0.97
中央値(min-max)	(3.3-1320)	(4.4-342)	
誘発症状 Grade	Grade1 : 5 Grade2 : 5	Grade1 : 5 Grade2 : 7	
摂取維持量(タンパク量 : mg)	18.7	19.3	p=0.95
中央値(min-max)	(1.1-308)	(2.2-190)	

登録総数 n=22		内服群 n=12	非内服群 n=10
年齢 (歳)	中央値 (min-max)	6(4-10)	7(5-9)
原因食品	鶏卵	6	5
	牛乳	5	3
	小麦	1	2
合併症	気管支喘息	2	2
	アトピー性皮膚炎	2	2
検査	総 IgE(平均±SD)IU/ml	1783±734	1608±1244
	好酸球数(平均±SD)/μl	689±451	561±302

※各群で有意差なし

登録前食物経口負荷試験結果

群間登録前の食物経口負荷試験において原因食品の誘発閾値タンパク量・誘発症状重症度、負荷試験に基づく摂取指導量においても群間有意差はみられなかった。

6ヶ月後評価終了児の経過

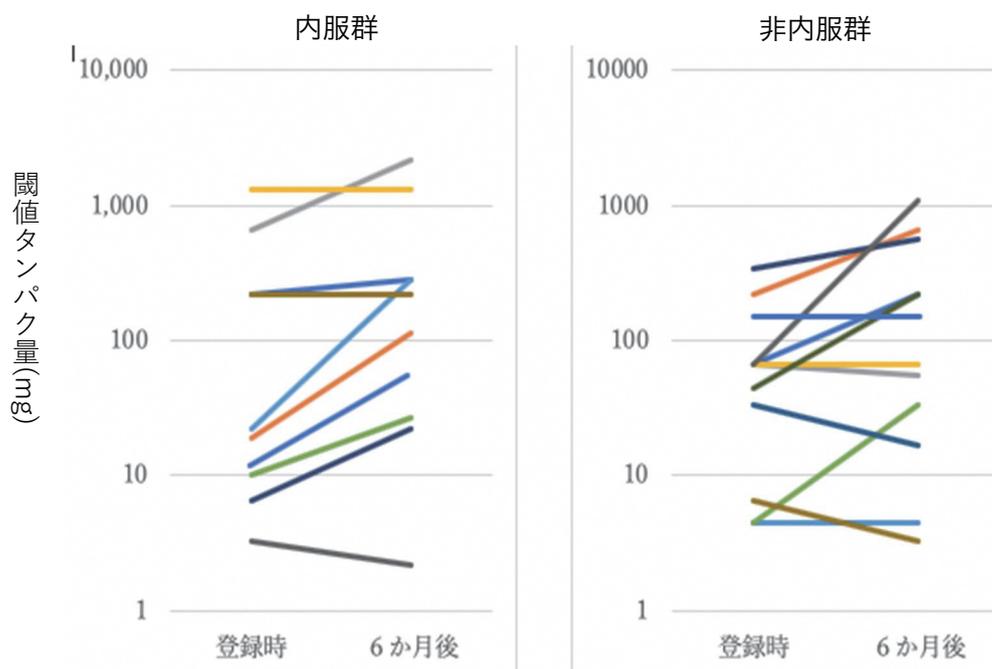
2020年2月1日時点で、6ヶ月の臨床研究が終了したのは葛根湯内服群12名、非内服群10名であり、脱落者はなく、自宅での誘発症状 Grade3（重度）の有害事象は認めなかった。また、臨床的な有害事象や、総蛋白や肝機能などの一般生化学検査の明らかな異常は一人も見られなかった。

1週間あたりの原因食品の平均摂取回数

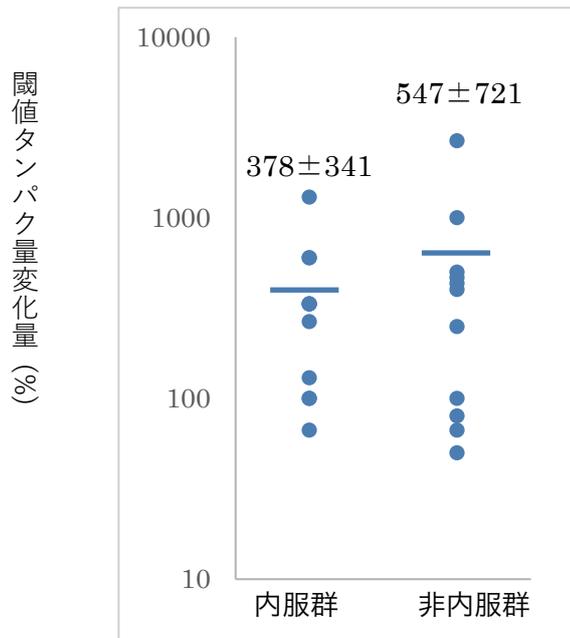
葛根湯内服群は中央値 6.25/週（2.25-7）、非内服群は 5/週（0.75-7）であり、群間有意差は認められなかった（ $p=0.12$ ）。

閾値の変化

食物経口負荷試験による閾値評価では、葛根湯内服群（ $n=10$ ）では平均閾値タンパク量が登録時 $249\pm 407\text{mg}$ が、 $497\pm 713\text{mg}$ に有意に上昇し（ $p<0.01$ 、wilcoxon 検定）、非内服群においても平均閾値タンパク量は $88\pm 96\text{mg}$ から、 $404\pm 525\text{mg}$ に有意に上昇していた（ $p=0.03$ ）。



閾値上昇したのは葛根湯内服群7名、非内服群7名、閾値が不変だったのは内服群2名、非内服群3名、閾値が低下したのは内服群1名、非内服群2名であり有意差は見られなかった（ χ^2 検定： $p=0.57$ ）。閾値変化量（6ヶ月後／登録時*100%）は、葛根湯内服群は 378 ± 341 （%）であり、非内服群は 547 ± 721 （%）であった。統計学的な群間有意差は見られなかった（ $p=0.51$ ）。

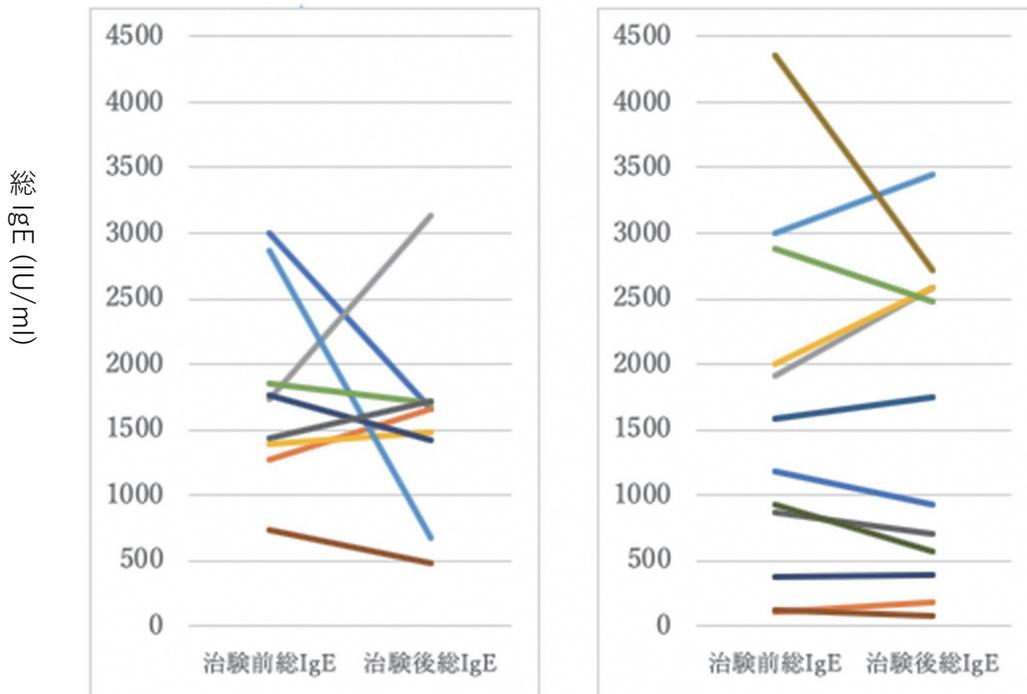


総 IgE、特異的 IgE 抗体の変化

総 IgE

内服群

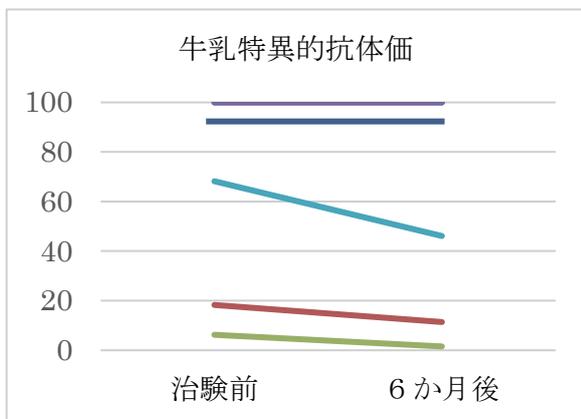
非内服群



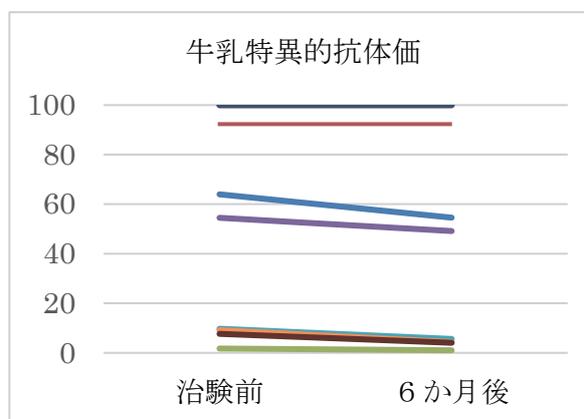
総 IgE については 葛根湯内服群は上昇 4 名、低下 5 名 (1 名は前の測定無し)、非内服群で上昇 6 名、低下 6 名であり有意差は見られなかった。

特異的 IgE 抗体（小麦は N が少ないため表にて症例提示する）（単位: IU/ml）

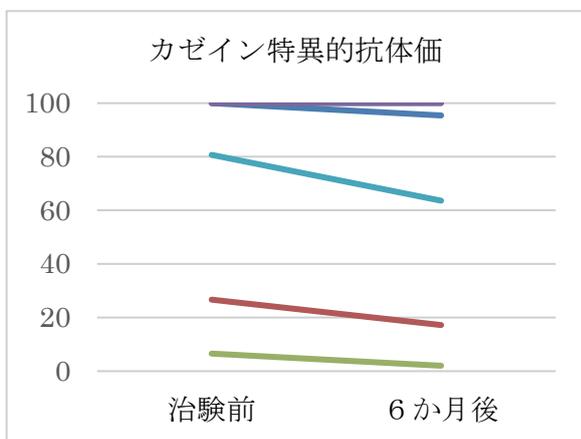
内服群（牛乳）



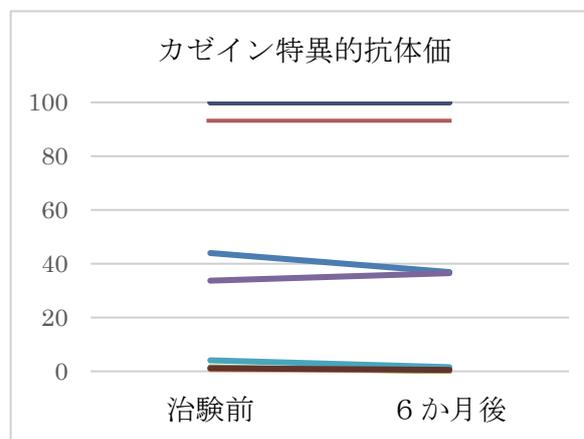
非内服群（牛乳）



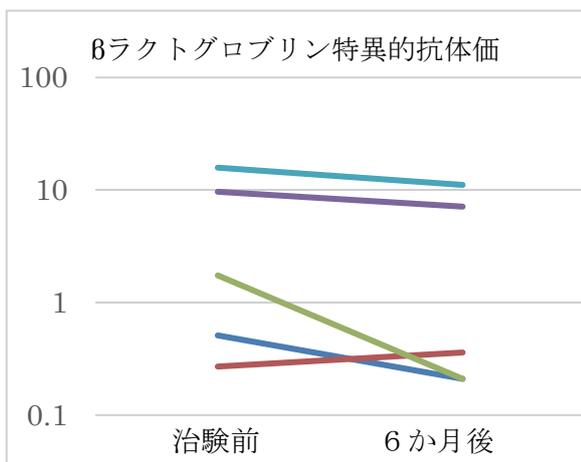
カゼイン特異的抗体価



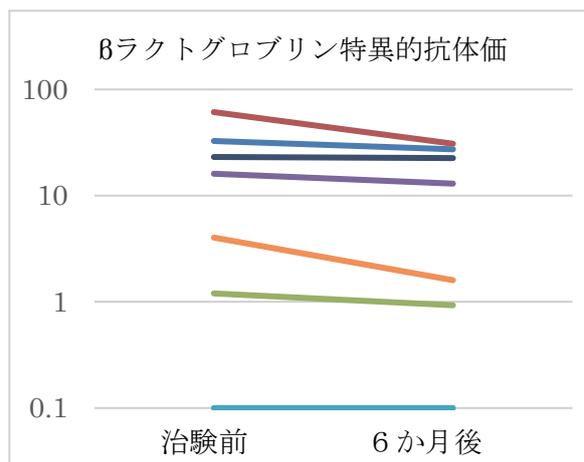
カゼイン特異的抗体価



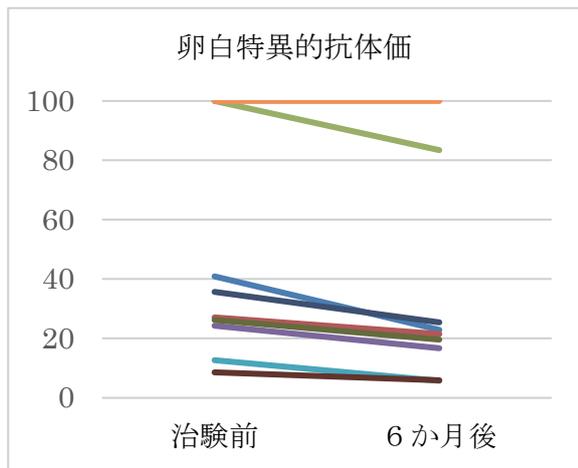
βラクトグロブリン特異的抗体価



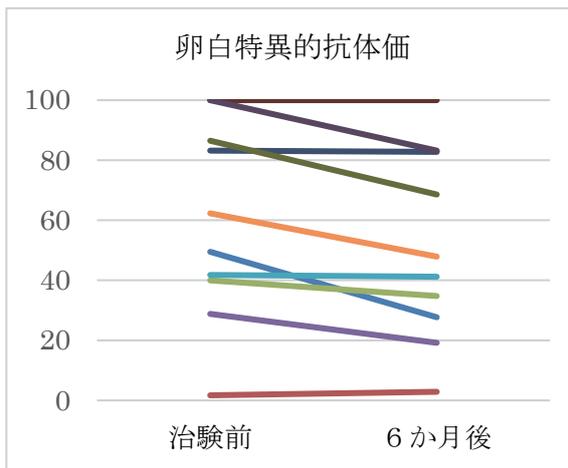
βラクトグロブリン特異的抗体価



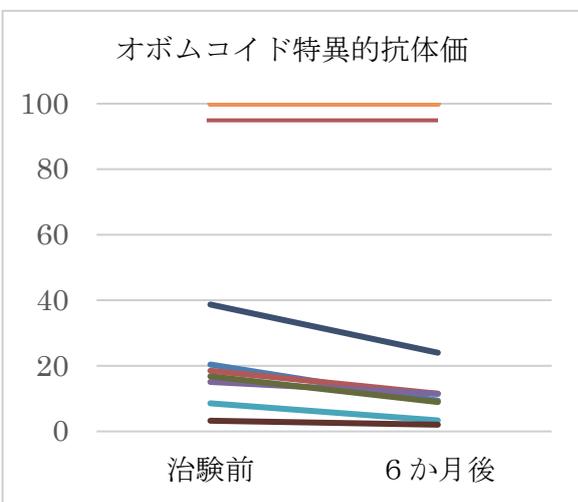
内服群 (鶏卵)



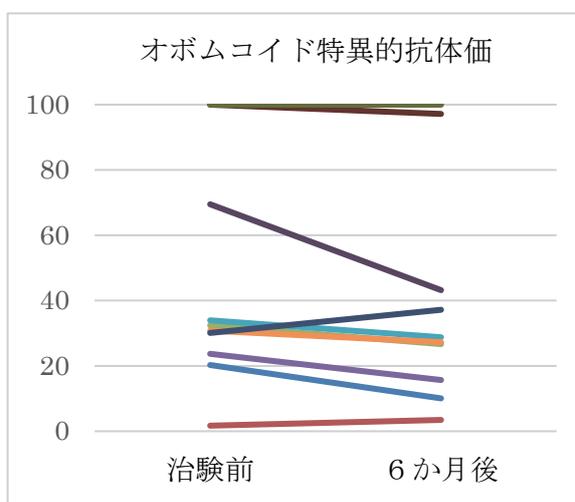
非内服群 (鶏卵)



オボムコイド特異的抗体価



オボムコイド特異的抗体価



内服群 (小麦)

小麦		前	6ヶ月後
P4	コムギ	30.8	28.1
	グルテン	45.9	25
	ω5G	3.68	1.63
P15	コムギ	100	100
	グルテン	100	100
	ω5G	8.18	2.82

非内服群 (小麦)

小麦		前	6ヶ月後
C14	コムギ	4.39	4.89
	グルテン	5.31	5.58
	ω5G	0.13	0.1

まだ症例が少なく統計解析ができないが、内服群では IgE 抗体が低下している症例が多かった。(ただし、s-IgE ≥ 100 の場合には評価困難)

【総括】

本研究は、2017 年に開始となったが、葛根湯の内服困難等研究プロトコールの見直しが必要なり、また、2018 年 4 月に施行された臨床研究法の特定期臨床研究に該当したため、富山大学附属病院において特定期臨床研究の手続きを行うなど、研究プロトコールの遅れが生じてしまった。

目標症例の 60 名（葛根湯 30 名、対照 30 名程度）に対して現在の症例数は 22 名であり、現時点では葛根湯内服の明らかな優位性は見いだせていないが、内服に伴う有害事象は認められていない。今後も引き続き症例エントリーを増やして研究を継続するか検討中である。