

気管支喘息患者における 減感作療法の作用機序に関する研究

— 抗原特異的 IgG サブクラス抗体と
ロイコトリエン産生能に及ぼす影響について —

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

片 木 幸 恵

(平成6年2月22日受稿)

Key words : bronchial asthma, immunotherapy, .
IgG subclass antibodies, leukotrienes

緒 言

減感作療法は1911年に Noon¹⁾と Freeman²⁾によって最初に報告されて以来, 気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患の特異的治療法として広く臨床応用されている。その臨床的評価については, いまだ一定の見解は得られていないものの, 二重盲検試験において70~80%の有効率が報告³⁾⁻⁵⁾されており, また当教室の成績でも約90%の症例に有効性が認められるなど, 臨床的には有用な治療と考えられる。

一方, 減感作療法の作用機序として, 血清 IgE 抗体価の低下, 遮断抗体の増加などの免疫学的変化や, 標的臓器の反応性の低下などが報告されているものの, その臨床効果を裏付けるにはなお不明な点が多い。近年の研究では遮断抗体は IgG 抗体のうち IgG₄であろう⁶⁾と推測されているが, 減感作療法有効例でも IgG₄抗体の増加していない症例が存在し, 遮断抗体のみでは説明できないことが判明している。そこで本研究では IgG 抗体の4つのサブクラスのうち, 量的に最も多い IgG₁抗体と IgG₄抗体に注目し, これらを ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay) で測定し減感作療法との関連について検討した。さらに, 化学伝達物質のうちその強力な気管支収縮作用により近年注目されているロイコトリエン B₄, C₄ (LTB₄, LTC₄) を

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定し, かかる化学伝達物質の産生に及ぼす減感作療法の影響を検討した。

対 象 と 方 法

1. 対 象

対象には, 岡山大学第二内科外来に通院中の気管支喘息患者でハウスダスト (鳥居薬品社) による減感作療法を1年以上続けている症例のうち prospective に検討できた18例を選んだ。臨床効果の判定は喘息日記をもとに行い, 治療1年後の喘息点数が治療前に比べ20%以上改善した症例を有効群, それ以下の症例を不変群とした。なお18例中に減感作療法により明らかに症状の増悪したと思われる症例は認められなかった。喘息点数は日本アレルギー学会気管支喘息重症度委員会の定める方法で算定した。

2. 方 法

1) IgG サブクラス抗体の測定

まず抗原液は, コナヒョウヒダニ (Dermatophagoides farinae, Df; 鳥居薬品社) 粗抗原を IgG₄抗体測定用として100 µg/ml, 総 IgG 及び IgG₁抗体測定用として10 µg/mlとなるように, 0.5 M リン酸緩衝液 (PBS, pH7.4) で調整し, その100 µl を ELISA プレート (Data Packaging Corporation) に添加し吸着固相とした。

検体として対象患者末梢血より血清1 ml を分

離し測定時まで -40°C で保存した。この血清をPBSでIgG₄抗体測定には4倍、総IgG及びIgG₁抗体の測定には500倍に希釈し、その100 μl をプレートに添加した。

一次抗体としてはマウス抗ヒトIgG抗体(Immunotech: 8a4)、マウス抗ヒトIgG₁抗体(Yamasa: AGB 52-3)、マウス抗ヒトIgG₄抗体(Yamasa: DG-01)を、二次抗体としてビオチン化抗マウスIgG抗体(Immunotech: 4M2-274.20)を用いて反応させた後、さらに0.1Mクエン酸 \cdot 0.2Mリン酸ナトリウム溶液を50 μl 添加し室温で10分間静置した。次いで教室の小栗栖ら⁷⁾の方法に従い、ビオチン化ペルオキシダーゼ \cdot アビジン複合体(Vector社: Vectastain)にo-phenylenediamine \cdot H₂O₂を加えた発色基質液を100 μl 添加して発色させた後、4N-H₂SO₄で反応を停止させた。IgGサブクラス抗体価はMICROPLATE READER (BIO-RAD社)で490nmにおける吸光度を測定し、back groundとしてPBSの吸光度を差し引いた値で表した。

2) ロイコトリエン産生能の測定

ヘパリン加末梢血25mlにデキストランを加え、静置して得られたbuffycoatをヒストパークの上に重層した後、 4°C 、3000rpmで30分間遠心分

離した。その沈渣に蒸留水を加えてhypotonic hemolysisをおこさせた後、1.8% NaClを蒸留水と等量加えて攪拌し、 4°C 、1400rpmで10分間遠沈した。さらにその沈渣にTris ACMを加え多核白血球数が $10^7/\text{ml}$ となる様に調整した。この白血球浮遊液1mlを 37°C で10分間 preincubation 後、Df粗抗原を200mgまたはCaI (Sigma社)を5ng添加し、さらに15分間 incubation した。その後4倍量のエタノールで

表1 減感作療法施行症例の臨床像と臨床効果との関連

	有効群	不変群
症例数	12	6
年齢	33.5 \pm 15.9(歳)	38.3 \pm 16.0(歳)
性別	男:6 女:6	男:3 女:3
IgE (RIST)	805.00 \pm 904.62(IU/ml)	472.37 \pm 381.13(IU/ml)
ダニ特異的IgE (DP-RAST score)	3.45 \pm 0.66	3.43 \pm 0.73
初期濃度	$\times 10^{5.6}$	$\times 10^{6.2}$
初期量	0.00164(mg)	0.0015(mg)
維持濃度	$\times 10^{2.6}$	$\times 10^{2.4}$
維持量	0.723(mg)	0.52(mg)
累積量	4.7 \pm 4.7(mg)	5.7 \pm 10.7(mg)

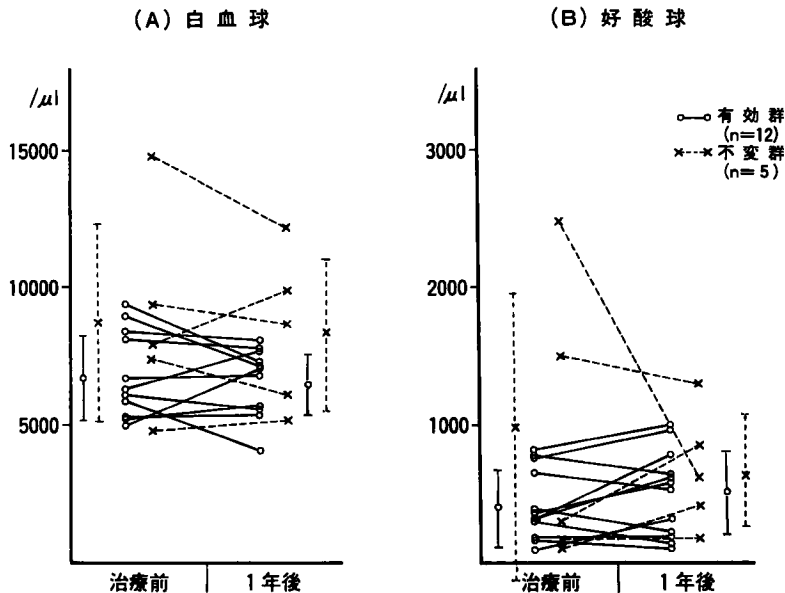


図1 末梢血白血球数及び好酸球数の変化と臨床効果との関連

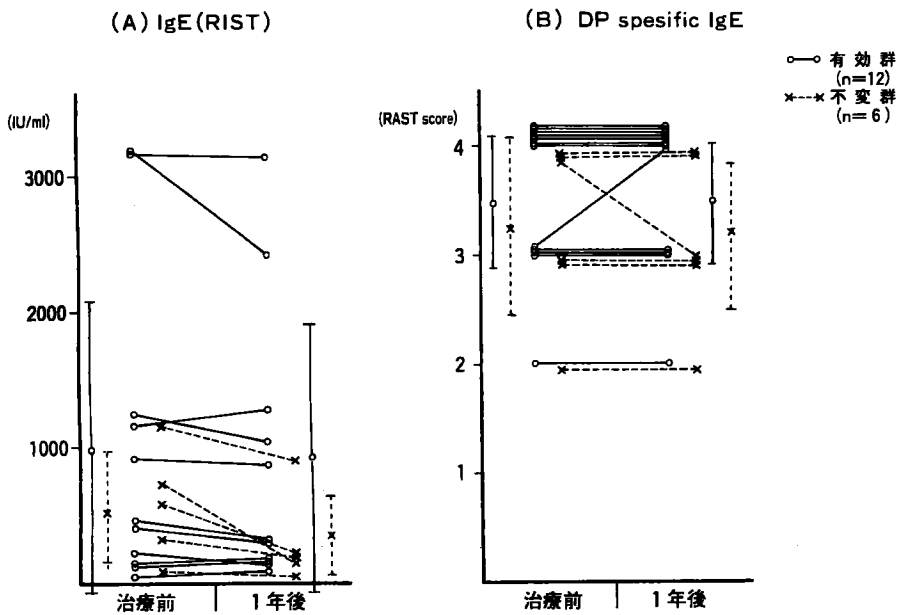


図2 末梢血 IgE 及びダニ特異的 IgE 抗体の変化と臨床効果との関連

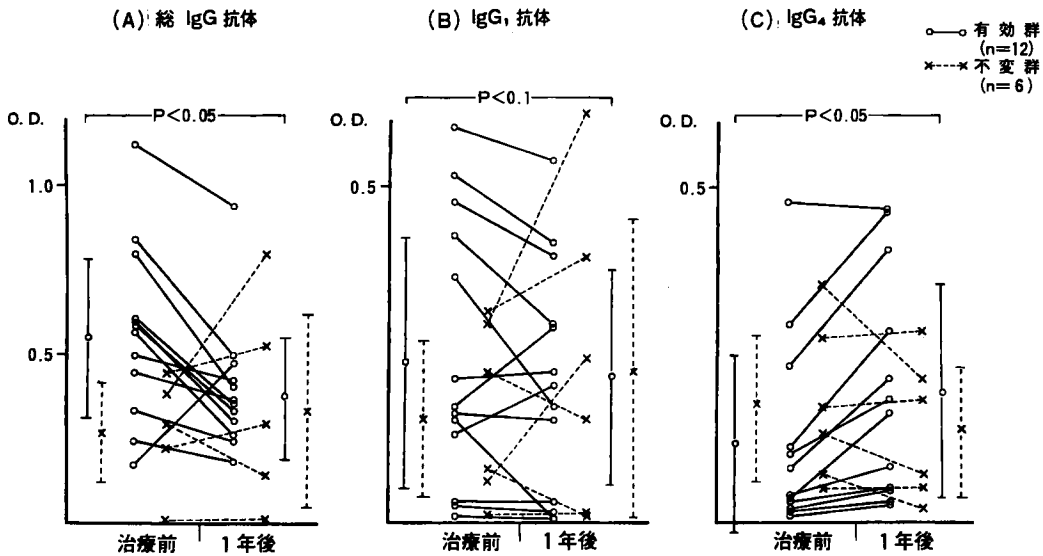


図3 ダニ特異的 IgG サブクラス抗体の変化と臨床効果との関連

反応を停止させ、2N-HCl で pH 3 に調整し、4 °C、3000 rpm、30 分間遠沈した。反応溶液中の LTs を濃縮精製するために、Amprep (C₁₈ カートリッジカラム, Amersham 社) にまず上清を、次いで蒸留水、n-ヘキサン、10%エタノール、ギ酸を順に注入して得られた溶液を HPLC

用サンプルとした。LTs の測定は Waters 社の HPLC 装置を用いて教室の高橋ら⁸⁾の方法に準じて測定した。すなわち、移動相としてアセトニトリル：メタノール：酢酸=99：99：30の割合で混合しアンモニアで pH 5.6 に調整した溶液を用い、280 nm での吸光度を測定し、標準試量

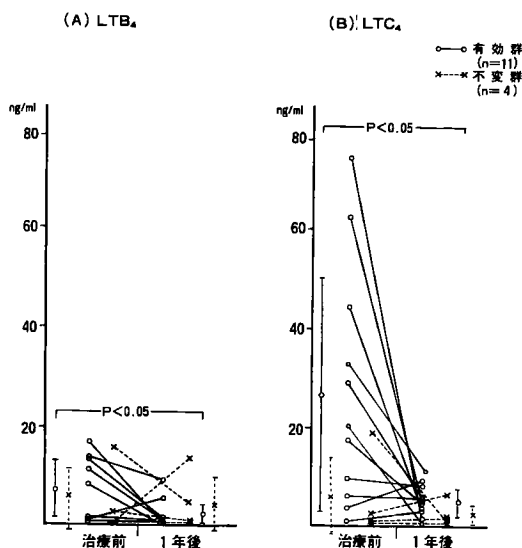


図4 末梢血白血球のダニ抗原に対するLT産生能の変化と臨床効果との関連

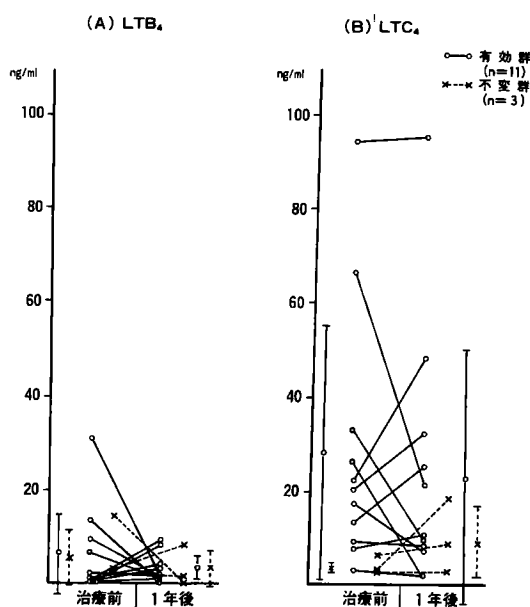


図5 末梢血白血球のCalに対するLT産生能の変化と臨床効果との関連

との比較によりLTs量を算出した。

得られた数値はすべてmean±SEMにて表し、統計学的検討はStudent's *t*-testにて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. 臨床効果とその臨床像

減感作療法の有効群は12例(20~63歳, 平均 33.5 ± 15.9 歳; 男性6例, 女性6例)で, 不変群は6例(20~53歳, 平均 38.3 ± 16.0 歳; 男性3例, 女性3例)であった。また治療前のIgE抗体(RIST)及びダニ特異的IgE抗体価(RAST score), 減感作療法の開始量, 維持量は表1の如くであり, 両群の間に有意な差は認められなかった。

2. 末梢血白血球数及び好酸球数の変化

治療前後での白血球数は図1(A)の如く有効群も不変群もともに治療前及び治療開始1年後のいずれも有意な差は認められなかった。また好酸球数も図1(B)の如く同様に有効群, 不変群ともに治療前後で有意な差は認められなかった。

3. IgE抗体価(RIST)及びダニ特異的IgE抗体価(RAST score)の変化

IgE抗体価(RIST)は図2(A)に示す如く, 有効群, 不変群の治療前値及び治療後の値にいずれも有意差は認められなかった。

また, ダニに対するIgE RAST scoreも図2(B)の如く, 両群の間にいずれも有意な変化は認められなかった。

4. ダニ特異的IgGサブクラス抗体の変化と臨床効果との関連

ダニ特異的総IgG抗体は図3(A)の如く, 有効群では治療前の 0.555 ± 0.366 から1年後には 0.392 ± 0.245 となり有意に減少したが($p < 0.05$), 不変群では有意な変化は認められなかった。さらにダニ特異的IgG₁抗体は図3(B)の如く有効群では 0.205 ± 0.187 から 0.173 ± 0.148 となり減少傾向を認めたのに比し($p < 0.1$), 不変群では著変は認められなかった。一方, ダニ特異的IgG₂抗体は図3(C)の如く有効群では 0.172 ± 0.148 から 0.288 ± 0.281 となり有意な増加を示したのに比し($p < 0.05$), 不変群では著変は認められなかった。

5. LTB₄, LTC₄の変化と臨床効果との関連

1) ダニ抗原添加

減感作療法でのLTs産生能は, 図4(A)の

如くまず LTB₄産生量は有効群において7.73±6.26ng/mlから2.12±2.76ng/mlへ有意に減少したのに対し (p<0.05), 不変群では著変は認められなかった。また LTC₄産生量は図4 (B)の如く有効群では27.33±25.88ng/mlから5.37±2.57ng/mlに有意に減少したのに対し (p<0.05), 不変群では著変は認められなかった。

2) CaI添加

LTB₄産生能は図5 (A)の如く減感作療法の前後で有効群, 不変群ともに有意差は認められなかった。また, LTC₄産生能も同様に図5 (B)の如く両群の間に有意差は認められなかった。

6. ダニ特異的 IgG₄抗体の変化と LTs 産生能の変化との関連

有効群におけるダニ特異的 IgG₄抗体とダニ刺激による LTB₄, LTC₄産生能の変化との相関を検討したが, 有意な関連は認められなかった。

考 察

減感作療法はアレルギー疾患の最も基本的な根本療法のひとつとして現在でも重要な地位を占めているが, その作用機序についてはいまだ不明な点が多い。そこで今回その効果発現機序の一要因を解明する目的で, ハウスダストによる減感作療法の施行前と, 季節による症例の変動要因を取り除くため1年後におけるダニ抗原特異的 IgG サブクラス抗体及び末梢血白血球からの LTs 産生能を比較した。その結果, ダニに対する IgG₁抗体の減少, IgG₄抗体の増加 (p<0.05), 及び LTB₄, LTC₄産生能の抑制効果 (p<0.05, p<0.05)を介して臨床症状が改善する可能性が示された。

1型アレルギー反応における IgG 抗体については, Lichtenstein⁹⁾が提唱した如く blocking antibody として IgE 抗体の反応性を阻止する働きと, Parish⁹⁾が食物アレルギー患者の血清中にサルの皮膚を感作しうる IgG 抗体が存在すると報告した如く anaphylactic antibody としての働きの両面があると考えられている。さらに中川ら¹⁰⁾はアレルギー症状の発現には IgE 抗体だけでなく IgG₁抗体も免疫複合体を形成し補体系を活性化して関与するが, IgG₄抗体は阻止抗

体として IgE 抗体および IgG₁抗体に拮抗して症状発現を抑制する可能性を示唆している。すなわち IgG₄抗体が遮断抗体といわれる⁶⁾理由としては, IgG₄抗体が IgG サブクラスの中で最も微量であるにもかかわらず唯一ヒト好塩基球や肥満細胞と結合し IgE 抗体と競合する能力を有しているため¹⁰⁾と考えられる。かかる観点から本研究では, IgG サブクラスのうち IgG₄に加えて量的に最も多い IgG₁抗体も測定した。その結果, 減感作療法の効果が得られた症例では IgG₄抗体は増加したが (p<0.05), IgG₁抗体は減少傾向を認めた。従って, IgG₄抗体は従来の報告に一致して遮断抗体としての役割が想定されたが, IgG₁抗体は anaphylactic に作用していた可能性も否定できない。

さらに教室では減感作療法の施行期間とダニ特異的 IgG₄抗体との間に正の相関 (r=0.688, p<0.05)があることを報告¹¹⁾しており, 臨床効果と抗原特異的 IgG₄抗体との間には密接な関連が示唆される。また近年, 精製抗原に対する特異的 IgG 抗体価が測定されており, 減感作療法に粗抗原よりも純化された抗原を用いる程 IgG₄抗体価は早期に増加する¹²⁾¹³⁾という報告が多いが, 抗原特異的 IgG₄抗体は治療効果の発現に遅れて増加し, その増加が減感作療法の臨床経過と必ずしも一致していない¹⁴⁾との報告やダニ粗抗原を用いた IgG₁および IgG₄抗体価は主要アレルゲンに対する抗体価を反映していない¹⁵⁾という報告もみられる。このような成績の不一致は使用した抗原の精度や測定方法の違いに由来する可能性もあり, 今後の研究成果が待たれる。

一方, IgE 抗体に対する減感作療法の影響については, 従来その産生を抑制するといわれているが, 最近では影響しないとの報告もある¹⁴⁾¹⁶⁾。今回の著者の成績でも, 総 IgE 抗体及び抗原特異的 IgE 抗体のいずれも有意な変動は認められず, 本療法の臨床効果発現に IgE 抗体産生の抑制という機序は考え難かった。

次に, 炎症細胞からの遊離化学伝達物質のうち強力な気道収縮等の薬理作用を有する LTs の産生に関して, まず気管支喘息患者の白血球は健常者に比べ LTs 産生能が亢進していることが知られている。すなわち, 吉田¹⁷⁾や戸谷ら¹⁸⁾は CaI

刺激による好中球由来のSRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis) が気管支喘息患者では高値であると報告しており、富岡ら¹⁹⁾は気管支喘息患者顆粒球がCaI刺激により健常人顆粒球に比し多くのLTC₄を産生すると報告している。従ってLTB₄が肺局所へ好酸球や好中球などのtarget cellを動員し、次いで主に好酸球からLTC₄が産生され、喘息発作が惹起されるものと考えられる。今回の検討では減感作療法有効例においては末梢血白血球からの抗原特異的なLTB₄、LTC₄産生能がいずれも減少しており、喘息発作の改善に何らかの役割を担っていたものと考えられた。

なおLTC₄産生能は血球の種類により大きく異なることから、今回測定に用いた試料中の各血球成分の比率を検討したところ、90%以上が好中球であり、好酸球数も治療前後で著変が認められなかった。すなわちLT産生能の成績は血球成分の変化に依存せず、減感作療法はtarget cellの動員数を変化させるというよりも、むしろ細胞1個あたりのLT産生能を抑制することにより臨床効果をあげている可能性が考えられた。本研究では減感作療法未施行例については検討していないが、篠川²⁰⁾は減感作療法有効群でLTC₄、LTD₄、LTE₄のペプチドLTが未施行群に比べ低値傾向を示し、さらにLTC₄はspontaneous releaseも有意に低値を示したと報告しており、target cellの反応性の低下が示唆される。しかしアレルギー反応局所でのtarget cellの反応性の低下は確認できておらず、今後減感作療法患者において気管支肺胞洗浄(BAL)を施行しBAL液中の細胞成分やLTs産生能を検討する必要がある。

一方CaIの様な非特異的刺激に対してはLTs産生能は一定の傾向を認めなかったが、ダニによる抗原特異的刺激に対しては明らかな減少が認められており、減感作療法の作用機序に抗原特異性が関与していることが窺われる。

また減感作療法により遅発型喘息反応(LAR)が抑制される²¹⁾といわれており、またLTsに対する気道反応性が抗原吸入時のLARの強さを規定する²²⁾という報告もみられることから、或はLTs産生能の低下も減感作療法の有効性に関連

するものと考えられる。

一方、IgG₁抗体高値例がLARを呈したり²³⁾、皮膚遅発型反応の減弱度とアレルゲン特異的IgG₄抗体価とは逆相関する²⁴⁾という報告がみられ、減感作療法においてIgGサブクラスとLTsとの間に何らかの関連があるものと想定していたが、今回の検討ではダニ特異的IgG₄抗体とダニ刺激によるLTs産生能との間には有意な関連は認められなかった。しかしダニ特異的IgG₄抗体量が多いほどLTs産生量が多い傾向にある²⁰⁾という報告もみられ、今後症例を増して検討する必要があると考えられた。

結 論

気管支喘息における減感作療法の作用機序を明らかにするために、抗原特異的IgGサブクラス抗体と患者末梢血白血球からのLTs産生能を測定し、以下の成績を得た。

1. ハウスダストによる減感作療法の前後で、有効群、不変群とも末梢血好酸球数、総IgE抗体価及びダニ特異的IgE抗体価には有意差は認められなかった。

2. ハウスダストによる減感作療法が有効であった症例では、ダニ特異的IgG₄抗体の増加($p < 0.05$)、及びダニ特異的総IgG、IgG₁抗体の減少傾向が認められた。

3. 末梢血白血球のLTB₄、LTC₄産生能はCaIに対しては一定の傾向が認められなかったが、減感作療法が有効であった症例ではダニ抗原に対していずれも有意な産生能の低下が認められた($p < 0.05$, $p < 0.05$)。

以上、減感作療法による臨床効果発現の一因として、抗原特異的IgG₄抗体の産生調節と炎症細胞からのLTs類産生能の抑制という機序が想定された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師木村郁郎教授に深謝致しますとともに、終始懇切なる御指導と御助言を賜りました高橋 清講師ならびに宗田 良博士に感謝の意を表します。

なお本論文の要旨は第40回日本アレルギー学会総会および第31回日本胸部疾患学会総会において発表された。

文 献

- 1) Noon L : Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* (1911) **i**, 1572—1573.
- 2) Freeman J and Noon L : Further observation on the treatment of hay fever by hypodermic inoculations of pollen vaccine. *Lancet* (1911) **ii**, 814—817.
- 3) Bruun E : Control examination of specific desensitization in asthma. *Acta Allergol* (1949) **2**, 122—127.
- 4) Norman PS, Winkenwerder WL and Lichtenstein LM : Trials of alum-precipitated pollen extracts in the treatment of hay fever. *J Allergy Clin Immunol* (1972) **50**, 31—44.
- 5) Patterson R : Clinical efficacy of allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* (1979) **64**, 155—158.
- 6) Adkinson NF, Sobotka AK and Lichtenstein LM : Evaluation of the quantity and affinity of human IgG “blocking” antibodies. *J Immunol* (1979) **122**, 965—972.
- 7) 小栗栖和郎, 高橋 清, 多田慎也, 宗田 良, 難波一弘, 高田 稔, 難波康夫, 金広有彦, 谷本 安, 木村五郎, 高橋寿保, 木村郁郎, 谷崎勝朗 : 成人喘息における IgG サブクラス抗体に関する研究. 第1報 血清中抗原特異的 IgG サブクラス抗体と遅発型気道反応の関連について. *アレルギー* (1991) **40**, 506—515.
- 8) 高橋 清, 清水一紀, 難波一弘, 中山堅吾, 岡田千春 : 重症難治性喘息患者における末梢血好中球分画からのロイコトリエン産生能に関する検討. *アレルギー* (1988) **37**, 322—330.
- 9) Parish WE : Short-term anaphylactic IgG antibodies in human sera. *Lancet* (1970) **2**, 591—592.
- 10) 中川武政, 大矢直子 : 1型アレルギー反応と IgG₄抗体. *臨床免疫* (1990) **22**, 311—317.
- 11) 宗田 良 : 気管支喘息における減感作療法の実際—ハウスダスト減感作療法140例の解析から—. *医薬の門* (1989) **29**, 120—127.
- 12) Peng Z, Lee HB, Proud D, Naclerio R and Adkinson NF : Ragweed IgE and IgG₄ antibody in nasal secretions during immunotherapy. *Clin Exp Allergy* (1990) **20**, 571—579.
- 13) Einarsson R, Dreborg S, Hammarstrom L, Lofkvist T, Smith CIE and Svenson G : Monitoring of mite *Dermatophagoides farinae* allergen-specific IgG and IgG subclass distribution in patients on immunotherapy. *Allergy* (1992) **47**, 76—82.
- 14) 長谷川真紀, 安枝 浩, 前田裕二, 金子富志人, 早川哲夫, 秋山一男, 柳原行義, 信太隆夫 : ハウスダストによる減感作療法にともなうアレルギー特異的免疫グロブリンの変化. *アレルギー* (1993) **42**, 809—816.
- 15) 中田重俊, 斉藤明美, 安枝 浩, 信太隆夫, 中川武正, 灰田美知子, 伊藤幸治, 宮本昭正 : ダニのゲルろ過分画および精製アレルギーに対する IgE, IgG₁および IgG₄抗体の酵素抗体法による測定. *アレルギー* (1989) **38**, 9—15.
- 16) Bousquet J, Hejjaoui A, Clauzel AM, Guerin B, Dhivert H, Wienia SB and Michel FB : Specific immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. II. Prediction of efficacy of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* (1988) **82**, 971—977.
- 17) 吉田象二, 富岡玖夫, 熊谷 朗 : ヒト白血球由来の Slow Reacting Substance (SRS) に関する研究. 第1報 ヒト多形核白血球よりの Slow Reacting Substance の遊離. *アレルギー* (1980) **29**, 179—186.
- 18) 戸谷康信 : ヒト末梢白血球からのヒスタミンおよび slow reacting substance の遊離. *アレルギー* (1983) **32**, 1113—1118.
- 19) 富岡玖夫, 羅 智靖, 岩本逸夫, 佐藤俊子, 児玉賀洋子 : 気管支喘息患者顆粒球のアラキドン酸代謝. プロスタグランジン, トロンボキサン, ロイコトリエン研究の進歩; 1984年京都プロスタグランジン会議記録, 現代医療社, 東京 (1986) pp271—274.

- 20) 篠川真弓：気管支喘息患者における末梢血白血球のロイコトリエン (LTC₄, D₄, E₄, B₄) 遊離能に関する検討。アレルギー (1990) **39**, 1556—1566.
- 21) 足立 満, 古屋 章, 小林秀樹, 飯島正之, 国分二三男, 岡田哲朗, 高橋昭三：特異的減感作療法の遅発性気管支反応 (LAR) に及ぼす影響について。アレルギー (1986) **35**, 31—39.
- 22) 山井孝夫, 渡辺茂男, 本島新司, 沼尾利郎, 天下井正弘, 大塚智博, 戸田正夫, 福田 健, 牧野荘平：抗原吸入誘発時の即時型および遅発型喘息反応におけるロイコトリエン気道反応性の役割。日胸疾会誌 (1992) **30**, 1687—1694.
- 23) Ito K, Kudo K and Okudaira H : IgG₁ antibodies to house dust mite and late asthmatic response. Int Arch Allergy Appl Immunol (1986) **81**, 69—74.
- 24) Fling JA, Ruff ME, Parker WA, Whisman BA, Martin ME, Moss RB and Reid MJ : Suppression of the late cutaneous response by immunotherapy. J Allergy Clin Immunol (1989) **83**, 101—109.

**Mechanism of immunotherapy related to the production of antigen specific
IgG subclass antibodies and leukotrienes in bronchial asthmatics**

Sachie KATAGI

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

To clarify the mechanism of immunotherapy in bronchial asthma, the level of mite specific IgG subclass antibodies (total IgG, IgG₁, IgG₄) and the production of leukotrienes (LTB₄, LTC₄) released from leukocytes were examined.

Eighteen mite-sensitive asthmatic patients who received immunotherapy with house dust extract for 1 year were divided into two groups, the responsive patients and non-responsive patients. Before treatment and 1 year after treatment, the levels of mite specific serum IgG subclass antibodies were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the levels of LTs were measured by high performance liquid chromatography (HPLC).

In the responsive group, the level of mite specific serum IgG₄ antibody was significantly increased ($p < 0.05$), and the level of mite specific serum total IgG and IgG₁ antibody was decreased. The release of LTB₄ and LTC₄ from leukocytes stimulated by mite antigen was significantly decreased ($p < 0.05, p < 0.05$).

These results indicate that increases in the antigen specific IgG₄ and the inhibition of chemical mediators play important roles in the mechanism of immunotherapy.