

20132203/A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

アレルギー疾患におけるダニ抗原標準化の研究

H25-難治等(免)-一般-007

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大久保公裕

平成26(2014)年3月

〈目 次〉

1. 総括報告書	
アレルギー疾患におけるダニ抗原標準化の研究	3
2. 分担研究報告書	
ダニアレルゲンエキス標準化における力価評価のための代替 in vitro 試験 方法の検討	6
3. 試験のまとめ	
室内塵ダニアレルゲンエキス標準品候補品を用いた皮内閾値検査（試験計画 書番号：HDM-STD-01）臨床研究報告	8
4. 発表報告	
平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金 研究課題：アレルギー疾患におけ る ダニ抗原標準化の研究（H25-難治等(免)一般-007）	30
5. 臨床研究実施計画書	
HDM アレルゲンエキス標準品候補品を用いた皮内閾値検査	39
6. 同意説明文書	
HDM アレルゲンエキス標準品候補品を用いた皮内閾値検査 説明文書	47
7. ダニ抗原	
アレルゲンエキス標準化ダニ	52
8. ダニ抗原 2	
皮内反応診断テスト	62
9. 事後評価資料	
厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患 等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野）事後評価資料	67

アレルギー疾患におけるダニ抗原標準化の研究

主任研究者	大久保公裕	日本医科大学大学院医学研究科頭頸部感覚器科学分野	教授
分担研究者	岡本美孝	千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科頭頸部腫瘍科	教授
	永田 真	埼玉医科大学 呼吸器内科	教授
	増山敬祐	山梨大学大学院医学工学研究部 耳鼻咽喉科	教授
	高井敏朗	順天堂大学 アトピー疾患センター	准教授
	阪口雅弘	麻布大学獣医学部 微生物第一	教授
	福富友馬	国立病院機構相模原病院 臨床研究センター	

アレルギー疾患診療における抗原の標準化は適正な医療を考えるうえで、診断、治療において重要である。今回、我々は通年性アレルギー性鼻炎や喘息、アトピー性皮膚炎などアレルギー疾患共通の通年性アレルゲンであるダニの標準化を日本独自の方法で行った。各国で行われている標準化は多くは *in vitro* の試験のみでしかも製薬会社によって行われているのが現状であるが、本邦では抗原の標準化には *in vivo* の試験と *in vitro* の試験が組み合わせて医師の手によって行われ、今回のダニ抗原標準化にあたって同様の方法がとられた。その結果 **Standardized Mite Extracts Mixed Mite** は日本において **100,000 JAU (Japanese Allergology Unit)** と診断され、その結果は *in vitro* の研究でも支持された。これからのアレルギー診断、皮下注射や舌下によるアレルゲン免疫療法においても重要な検討であり、どのような抗原が日本に輸入されても標準品があれば、新しい抗原エキスも **JAU** に読み替える事が可能になり、診療の幅が広がった。このアレルゲン標準化の方法論を持って、今後の新たなアレルゲンに関しても標準化していきたい。

A. 研究目的

アレルギー疾患は喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎とも増加している疾患である。花粉症のような季節性アレルギーも存在するが、共通するものは通年性アレルギーが多い。これらアレルギー疾患の診断（皮膚テスト）、治療（アレルゲン免疫療法）において原因物質の同定は欠かせない診療項目である。原因物質、アレルゲン（抗原）は主要アレルゲン **major allergen** が適切に含まれ、標準化されたものが疾患の標準的診断、治療に求められるべきであることが国際的ガイドラインである **ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma)** や国内の鼻アレルギー診療ガイドラインにも記載されている。しかしこのアレルゲンに関して、世界的にはそれぞれの国によってその単位、力価が異なっている。これは各国のアレルゲン作成の状況が異なり、製薬メーカーにそれを任せている部分が多い。このため、実際に患者さんのアレルゲンに対する反応を考えた規格として用いられる検査としての皮内反応などではなく、メジャーアレルゲン濃度や患者プール血清だけによる規格として **AU (Allergy Unit)**、**BAU (Bioequivalent Allergy Unit)** など様々な単位で国際的に販売されている。一方、本邦ではアレルゲンの標準化として日本固有のアレルゲンの代表であるスギ花粉アレルゲンの標準化が **1996** 年に日本アレルギー学会を中心に行われた。日本におけるスギ花粉症患者へのアレルゲン **3** 倍希釈での皮

膚反応閾値を多数症例で行い、閾値の決定を行った。その閾値を **1 JAU (Japanese Allergology Unit)** として標準化し、その上で、プール血清による **RAST** 抑制法、**IgE** 結合活性やメジャーアレルゲン濃度を決定して、最終的な標準品を作成したのである。現在、**10000JAU** の標準品をもとに製品である **2000JAU**、**200JAU** のアレルゲンが発売されているのである。今回、我々はダニに対する標準化を試みようとするものである。通年性抗原で喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎すべてに共通するアレルゲンのダニがあるが、日本でこれらの診断、治療に使用されているものは混在アレルゲンであるハウスダスト **HD** である。もちろん混在物質であるため **HD** では標準化は不可能で、アレルギー疾患において診断、治療に使用している現状は国際的にみても問題がある。このため、日本人のアレルギー疾患におけるダニの標準化が求められている。スギと同じように喘息、アレルギー性鼻炎患者に対する皮膚テストにより標準的な反応閾値を求め、その標準化されたアレルゲンに対し主要アレルゲン活性あるいは **IgE** 結合活性をもとめ、標準アレルゲンを決定し、アレルゲン標準化とするものである。このアレルゲン標準化は皮内テスト、スクラッチテストなどの診断、皮下注射によるアレルゲン免疫療法、さらにこれから出現してくるであろう舌下免疫療法にも重要な役割を担うものである。これら標準化アレルゲンは正しい診断、適正なアレルゲン免疫療法によ

る確実な患者治療を実践させうる重要な課題であり、今後スギ、ダニに引き続き、種々のアレルギーに対しての標準化の指標となり得るものである。この標準化は臨床医学、基礎医学の共同での日本独自で特色ある研究であり、前述のとおり今後の適切なアレルギー診療につながる研究と考えられる。現在、増加するアレルギー疾患診療において欠かせないものであり、国民への正しい診療を可能にするものと考えられる。実際の臨床医学での研究ではその倫理性は各診療施設での倫理委員会の審理を受けるが、実際に行われている皮膚テストを行うものであり、安全に施行可能である。

B.研究方法

アレルギーの標準化には *in vivo* の試験と *in vitro* の試験が組み合わせて行われる。しかし各国で行われている標準化は多くは *in vitro* の試験のみであり、主として製薬会社によって行われているのが現状である(Standardization of house dust mite extracts in korea. Allergy Asthma Immunol Rs 4: 456-50, 2012.)。日本においては国内での初めての標準化を日本アレルギー学会主導で行われ、「特異的減感作療法のための標準化スギ花粉エキス(TO-194)アレルギー活性における現有製品との比較. 耳鼻と臨床 45: 245-250, 1999」にて報告された。この方法論は日本独自であり、日本アレルギー学会により Japanese Allergology Unit(JAU)と力価の単位が決定された。標準化されたアレルギーを標準品と定め、以降この標準品との一致性により抗原エキスが作成されるのである。一般的には標準品の力価は皮膚テストによって決定されるが、前述のとおり国際的にみると *in vitro* 試験のみで、皮膚テストが行われていない事が多い。我々は以前にも行ったこの標準化手法を用いて、ダニの抗原エキスを標準化しようと試みている。現有の二つのダニ抗原エキスをを用いた皮膚テストを行い、標準品の候補を挙げて、*in vitro* 試験で検証を行う。対象はハウスダスト・ダニに感さされた患者さんで、ヤケヒョウヒダニあるいはコナヒョウヒダニの特異的 IgE がクラス 2 以上の患者さんである。前もって経口薬剤使用した患者は閾値の修飾が行われている可能性が否定できないため、除外とした。

① *in vivo* 試験

皮膚テストではデンマーク ALK-Abello 社の Standardized Mite Extracts Mixed Mite を 0.005%

日局ポリソルベールと 80 転科診断用アレルギー皮内エキス対照液「トリイ」によって 3 倍希釈の細かい希釈倍率のアレルギーエキスを 3-19 倍希釈まで作成し、閾値検査用試薬とした。この希釈段階でのダニ皮膚閾値検査であり、患者の閾値を同定し、その濃度を 1 JAU とおく。この皮内閾値試験を実施した患者のうち RAST スコア 4 以上のダニ特異的 IgE 高値の患者よりプール血清を作成して、その後の *in vitro* 試験に用いる。実際の皮内反応閾値を求める検討ダニアレルギー希釈濃度を反応しない低濃度から順に高濃度へと移行して前腕部へダニエキスを 0.02ml、皮内注射して行った。皮内反応陽性を満たす反応が確認された段階で投与を終了するものである。陽性の判定基準は投与 15 分後の投与部位の膨疹径 9 mm 以上、または発赤径 20 mm 以上を陽性と判定する。この際に初めて陽性になった希釈濃度を閾値と判定した。陰性対照としては「診断用アレルギー皮内エキス対照液「トリイ」」を用いた。

② *in vitro* 試験

9 月までに回収できた血清を用いてプール血清として、試験を行った。主要アレルギー含量を指標とする方式と IgE 結合阻止試験を指標とする方式の 2 方式があり、それぞれ一長一短がある。主要アレルギー方式は、血清が不要かつ高い再現性が期待できるが、我が国の患者血清を用いた場合の IgE 結合活性との整合性は不明である。前者としては主要アレルギー特異的抗体、Der P1 抗体あるいは Der P2 抗体を用いたサンドイッチ ELISA にて標準品におけるその含有主要アレルギー量を決定する。後者としては現在までにプールしている患者血清を用いた IgE 結合阻害試験によりその力価を測定する。血清に試験を行う標識したダニアレルギーエキスを結合させ、それを別のダニアレルギーエキスで抑制させるものである。これにより正確な標準品、あるいはそれ以外の新規ダニアレルギーエキスの患者 IgE への結合性が確認できるものであり、力価が決定可能である。これに合わせて、標準品とならなかったアレルギーエキスの含有主要アレルギー量を決定して、比較検討する。我々は基礎的な検討として両方の相関などを検討する研究を行い、標準品の品質を決定する。

③ 最終的な標準化と標準品決定

実際には分担研究者らの多施設における皮膚閾値テストによるダニアレルギーエキスからの

標準品の決定とJAUの単位を決定する。各種ダニ抗原エキスに対し、主要アレルゲン含量を指標とする標準化とIgE結合活性を指標とする標準化を行う。そしてどちらがダニアレルゲン標準化にふさわしいか決定し、最終的な基礎的標準化とする。

C. 結果

①in vivo 試験

検査実施症例は52症例で、51症例が解析対象者となった。平均のRASTスコアはコナヒョウヒダニ3.31、ヤケヒョウヒダニ3.18だった。

Standardized Mite Extracts Mixed Mite に対する皮膚反応閾値検査は平均閾値-13.22であった。この結果-13~-15までは標準品100,000JAU/mlが同定された。結果として閾値である100,000JAU/mlの-13.22乗は0.049JAU/mlとなった。

②in vitro 試験

9月中旬に回収できた血清(10例)を用いて作製したプール血清と、8種のダニエキスを用いた試験を行った。IgE結合阻害試験により算出したエキスの相対力価とグループ1主要アレルゲン

(Der 1量=Der f 1+Der p 1)との相関は極めて高かった。Der 1+Der 2量との相関係数とほとんど変わらず、Der 1量のみで相対力価が説明可能。よってDer 1量によってエキス力価を標準化するという当初方針の正当性が担保された。Der 1量測定のためのELISAの測定系としては、相模原の測定系を用いても、Indoor社のものを用いても大きな差は無かった。

D. 考察

日本において増加するアレルギー疾患の正しい診断、確実な治療をすることは国民の健康に対して重要なことである。花粉症のような季節性アレルギーも存在するが、それぞれのアレルギー疾患で共通するものは通年性アレルギーが多い。この診断(皮膚テスト)、治療(アレルゲン免疫療法)において原因物質の同定は欠かせない診療項目である。原因物質、アレルゲンは主要アレルゲン major allergen が適切に含まれ、標準化されたものが疾患の標準的診断、治療に求められるべきであることが国際的ガイドラインである Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma や国内の鼻アレルギー診療ガイドラインにも記載されている。通年性抗原で喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性

皮膚炎すべてに共通するアレルゲンのダニがあるが、日本でこれらの診断、治療に使用されているものは混在アレルゲンであるハウスダスト HD である。このアレルゲン標準化は皮内テスト、スクラッチテストなどの診断、皮下注射によるアレルゲン免疫療法、さらにこれから出現してくるであろう舌下免疫療法にも重要な役割を担うものである。混在物では主要アレルゲン濃度などの規定がなく、各ロットにおける濃度の違いがアナフィラキシーなどの重大な問題を生じさせるものである。このように今回のダニアレルゲンの標準化は正しい診断、適正なアレルゲン免疫療法による確実な患者治療を実践させる重要な課題であり、今後種々のアレルゲンに対しての標準化の指標となり得るものである。

E. 結論

アレルギー疾患診療における抗原の標準化は適正な医療を考えるうえで、診断、治療において重要である。今回、我々は通年性アレルギー性鼻炎や喘息、アトピー性皮膚炎などアレルギー疾患共通の通年性アレルゲンであるダニの標準化を行った。その結果 Standardized Mite Extracts Mixed Mite は日本において100,000 JAU (Japanese Allergology Unit) と診断され、その結果は in vitro の研究でも支持された。これからのアレルギー診断、皮下注射や舌下によるアレルゲン免疫療法においても重要な検討であり、どのような抗原が日本に輸入されても標準品があれば、新しい抗原エキスも JAU に読み替える事が可能になり、診療の幅が広がった。このアレルゲン標準化の方法論を持って、今後の新たなアレルゲンに関しても標準化していきたい。

ダニアレルゲンエキス標準化における力価評価のための代替 in vitro 試験方法の検討

研究班員	高井敏朗	順天堂大学大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター 准教授
研究班員	阪口雅弘	麻布大学獣医学部獣医学科 教授
研究班員	福富友馬	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 診断・治療開発研究室 室長
研究協力者	安枝浩	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 診断・治療開発研究室 特別研究員
研究協力者	齋藤明美	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 診断・治療開発研究室 研究員

研究要旨:

治療用および診断用のアレルギーエキスの力価は製造方法などによって様々であり、統一された方法によって決定することが必要である。本分担研究では、ダニアレルゲンエキスの標準化作業の一部として、力価評価のための代替 in vitro 試験方法の検討を行った。標準品エキスを含む8種類のダニアレルゲンエキス、および患者ボランティアのプール血清を用いて検討を行った。各エキス中のメジャーアレルゲン濃度はサンドイッチ ELISA により測定した。in vitro における総アレルゲン活性は、IgE 結合阻害 ELISA によって、標準品エキスとの相対力価として決定した。グループ1アレルゲン濃度、グループ2アレルゲン濃度、および両者の合計濃度の3通りのメジャーアレルゲン濃度に対して IgE 結合阻害活性相対力価との相関を解析したところ、いずれにおいても高い相関性を認めた。力価評価における煩雑さをできるだけ低減する目的には、標準血清が不要なメジャーアレルゲン含量に基づく in vitro 試験が適切であり、対象アレルゲンとしてはダニグループ1アレルゲンのみの測定でも十分であることが示された。

A. 研究目的

アレルギー免疫療法はアレルギー疾患の唯一の根治療法であり、今後、我が国においても利用が広がる可能性がある。日本アレルギー学会ではタスクフォースを立ち上げ、ダニアレルゲンエキスの標準化の計画立案を進めてきた。本分担研究では、その標準化作業の一部として、in vitro 試験方法の検討を行った。

治療用および診断用のアレルギーエキスの力価は製造業者や製造方法などによって異なるため、統一された方法によって力価を決定することが望ましい。これをアレルギーの標準化という。しかし、全ての被験エキスの力価をアレルギー患者皮膚反応などのアレルギー応答に基づいて決定することは、多大な労力を要し、結果の再現性や倫理などの観点でも問題がある。そこで、皮膚試験により力価決定するのは標準品となる単一のエキスのみとし、他のエキスの力価決定は in vitro 試験による標準品との相対比較によって代替的に行うことが、標準化の現実的な手段であると考えられている。

力価評価のための代替 in vitro 試験方法として有力な方式は2つある。IgE 結合活性に基づく方式(以下、総アレルゲン活性方式と呼ぶ)とメジャーアレルゲン含量に基づく方式(以下、メジャーアレルゲン方式と呼ぶ)である。本分担研究の目的は、これら

2方式のどちらを採用するかを判断するための検討を行い、選択した方式における具体的な試験方法を決定することである。

B. 研究方法

1. ダニアレルゲンエキス

コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) エキスとヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*) エキスを等量混合したエキスを試験に用いた。協力企業2社より6種類(標準品を含む)とFDAより1種類のダニアレルゲンエキスの提供を受け、市販品1種類を購入し、合計8種類の混合エキスを in vitro 試験に用いた。

2. メジャーアレルゲンの測定

サンドイッチ ELISA 系によって8種類全てのエキス中のメジャーアレルゲン濃度を測定した。メジャーアレルゲン濃度としては、グループ1アレルゲンである Der f 1 と Der p 1 の各濃度、そしてグループ2アレルゲンの総濃度 (Der 2 濃度: Der f 2 と Der p 2 の合計濃度) の3値を測定した。グループ1アレルゲンの総濃度 (Der 1 濃度) は Der f 1 濃度と Der p 1 濃度の和として算出した。測定の標準物質としては、過去に相模原病院にて個々のメジャーアレルゲン含量を決定済みの Der f エキスと Der p エキスを混合して用いた。

3. 血清

本研究事業の皮膚試験に参加した患者ボランティアの血清のうちで、予定した *in vitro* 試験開始期日までに採取され、かつダニ特異的 IgE 抗体スコアが 4 以上であったものは 10 名分であった。これらの血清を等量混合してプール血清を作製し、*in vitro* 試験に用いた。

4. IgE 結合阻害活性の解析

固相化ダニアレルゲンエキスへ結合する血清中 IgE を抗 IgE 抗体によって検出する ELISA 系を利用した。血清添加と同時に、希釈倍率を振った被験アレルゲンエキスを添加し IgE 結合を阻害した。阻害曲線から 50%結合阻害率を与える被験エキスと標準品エキスの希釈倍率をそれぞれ求め、その比を被験エキスの相対力価とした。固相化エキスとしては、標準品エキスとそれ以外のエキス 1 種類の、合計 2 種類のそれぞれを用いて試験を行った。被験エキスは、8 種類全てのエキスを用いて試験を行った。

5. メジャーアレルゲン濃度と IgE 結合阻害活性の相関性の解析

8 種類全てのエキスについてメジャーアレルゲン濃度と *in vitro* アレルゲン活性相対力価の相関関係について、散布図を作製し、ピアソンの相関係数を算出した。

(倫理面への配慮)

血清の採取および使用は、本研究事業の皮膚試験に参加した患者ボランティアの同意および必要な倫理的審査手続きを経て行われた(大久保らによる分担研究報告を参照)。

C. 研究結果

1. メジャーアレルゲン濃度

8 種類全てのエキスの Der f 1, Der p 1, および Der 2 の濃度を決定した。これに先立ち、標準品エキスについて複数の市販の定量キットを用いた定量を行ったところ、顕著な差はなく、本研究で用いた測定系の妥当性を確認できた。麻布大学および相模原病院の 2 施設で独立に試験を実施し、同様の結果を得た。

2. IgE 結合阻害活性の相対力価

固相化抗原として標準エキスを用いた場合と別のエキスを用いた場合のそれぞれについて、7 種類のエキスの、標準品エキス(相対力価 1)に対する相対力価を決定した。麻布大学および相模原病院の 2 施設で独立に試験を実施し、同様の結果を得た。

3. メジャーアレルゲン濃度と IgE 結合阻害活性の相関

Der 1 濃度、Der 2 濃度、Der 1 と Der 2 の合計濃度のそれぞれと、総アレルゲン活性相対力価の相関を解析した。3通りのメジャーアレルゲン濃度のいずれにおいても、相対力価との相関係数は 0.9 以上であり、相対力価に対してきわめて高い相関を示した。麻布大学および相模原病院の 2 施設のそれぞれのデータをそれぞれ解析し、同様の結果を得た。両者の幾何平均値を用いた解析においても同様の結果

を得た。

D. 考察

アレルゲン標準化において、IgE 結合活性などに基づく *in vitro* 総アレルゲン活性は、皮膚試験などに基づく *in vivo* でのアレルギー応答と相関すると考えられており、米国 FDA が採用している。一方、メジャーアレルゲン方式は、小数種類のメジャーアレルゲンがアレルゲン活性の大半を占める場合には有用性が高く、過去に日本アレルギー学会が主導したスギ花粉エキス標準化の際に採用されている。両方式とも標準品エキスの供給が必要であるが、前者では、これに加えて標準血清を確保して供給する必要がある。後者の実施はメジャーアレルゲンの測定手段が確立されていることが必要条件となる。

ダニアレルゲン標準化において、上述の 2 方式のどちらを採用するかを判断規準は、(1)標準血清の確保と供給を行えるか(米国では政府機関である FDA が担当)、(2)メジャーアレルゲンの測定が可能か(ダニメジャーアレルゲンの測定法は確立されている)、(3)各種エキスのメジャーアレルゲン含量と *in vitro* 総アレルゲン活性が相関するか、の 3 点である。スギ花粉アレルゲンと異なり、ダニの場合、メジャーアレルゲン以外に多くのアレルゲンが存在しその重要性を示唆する報告がある。一方、近年の研究により、メジャーアレルゲン含量が総アレルゲン活性と相関するという知見も報告されている。本研究事業の開始に先立ち、このような状況について調査し、議論を深めたうえで研究の基本方針を定め作業計画を立案した。

本分担研究の 8 種類のエキスを用いた試験において、Der 1 濃度、Der 2 濃度、Der 1+Der 2 濃度、のそれぞれと総アレルゲン活性相対力価はいずれも高い相関を示した。これにより、メジャーアレルゲン方式によって力価評価を行う妥当性が担保され、2つのメジャーアレルゲンの片方の測定で十分であることも示された。力価評価における煩雑さをできるだけ低減する目的には、標準血清が不要なメジャーアレルゲン方式が適切であり、測定すべきアレルゲンとしては測定系がある程度普及している Der 1 のみでも十分であると考えられる。

E. 結論

In vivo 試験で決定された標準品エキスの力価に被験エキスと標準エキスの Der 1 濃度比を乗することによって被験エキスの力価を算出する方式の、妥当性が担保された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

室内塵ダニアレルゲンエキス標準品候補品を用いた皮内閾値検査
(試験計画書番号：HDM-STD-01)
臨床研究報告

In vitro 試験による室内塵ダニアレルゲンエキス標準品候補品の評価及び力価評価のため
の代替 in vitro 試験方法の検討
試験報告

1. 緒言

アレルゲン（抗原）は、主要アレルゲンが適切に含まれ、標準化されたものが疾患の診断、治療に必要であるとして、国際的ガイドラインである ARIA（Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma）等に記載されている。しかし、世界的にもその力価単位が異なっており、これは各国のアレルゲン作製の状況が異なるためである。実際には患者のアレルゲンに対する反応性から設定した単位ではなく、主要アレルゲン濃度や患者プール血清だけへの反応性から、AU（Allergy Unit）や BAU（Bioequivalent Allergy Unit）など様々な単位が設定され、国際的に販売されており、統一されていない。

本邦では固有のアレルゲンであるスギ花粉の標準化が 1996 年に一般社団法人日本アレルギー学会（以下、JSA）で行われた^①。スギ花粉症患者に 3 倍希釈系列で皮膚反応閾値検査を行い、皮膚反応からスギ花粉アレルゲンの標準品を 10,000 JAU (Japanese Allergy Unit) /mL と決定し、以降標準品に含まれる主要アレルゲン量を基準に、スギ花粉アレルゲンの力価が設定されている。

喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等の原因アレルゲンとして知られる室内塵ダニ（以下、HDM）アレルゲンは国際的に見ても重要なアレルゲンであり、日本における診断、治療を適切に行うためにも、日本人患者の皮膚反応に基づく標準品の力価設定が必要であると判断し標準化の臨床研究を行った。

また、標準化に際しては、*in vitro* 試験による標準品の物性評価と HDM アレルゲンエキスの力価管理のための代替 *in vitro* 試験法の設定が必要であることから、*in vitro* 試験による検討も並行して行った。

2. HDM のアレルゲン

本邦の一般家庭においてアレルギーが問題となるダニは、主にチリダニ科の 2 種のヒョウヒダニ コナヒョウヒダニとヤケヒョウヒダニである。チリダニ科のダニは温暖湿潤な気候地域に特に多く、気温 25℃、相対湿度 75%前後で最もよく繁殖することから、本邦のような気候帯は繁殖に適していると言える。

2 種のヒョウヒダニはアレルゲンの研究が進み、既に多くのアレルゲンが同定されて報告されているが、ヒョウヒダニの最重要アレルゲンはコナヒョウヒダニの Der f 1 及び Der f 2 と、ヤケヒョウヒダニの Der p 1 及び Der p 2 であるとされている。

コナヒョウヒダニとヤケヒョウヒダニの対応するアレルゲンは非常に高い構造的類似性を示し、アミノ酸配列は Der f 1 と Der p 1（以下、Der 1）の間及び Der f 2 と Der p 2（以下、Der 2）の間で 80～90%が一致しており、非常に強く交叉反応することが知られている。そのため、臨床的には分けて考える必要はないとされている。また、特に Der 2 では、混合されたサンプルでの分離同定が困難ということもあり、分けずに評価される場合もある。

3. 背景と試験計画

(1) 標準化の基本方針

＜スギ花粉アレルゲンエキスの標準化において採択した手法（基本方針）＞

- ① 標準品となるアレルゲンエキスを選定する。
- ② 一定の実施基準に基づく皮膚テストによって標準品の力価を設定する。このとき、力価は全てのアレルゲンに共通する単位を用いる。
- ③ *In vitro* の力価測定法の評価を行い、これらの方法によってアレルゲンエキス本来の生物学的活性を正しく反映する値が得られるかどうかを確認する。
- ④ 定められた *in vitro* の力価測定法で市販エキスの力価を測定し、その力価が一定の許容範囲内で標準品と一致していれば、そのロットのエキスは標準品と同等の力価であると表示することができる。

なお、今回行った HDM アレルゲンエキスの標準化において、標準品となるアレルゲンエキスは、臨床試験を実施することから、注射剤として臨床使用が可能な薬剤でなければならなかった。また、国内で承認される予定があるものの中から選ばれるべきとの意見が出された。これらの条件を満たす薬剤として、協力企業が開発中の HDM アレルゲンエキスのひとつが標準品の候補品として選定された。

(2) 臨床研究（*in vivo* 試験）

1) 計画の背景

本邦においては、スギ花粉から得られたアレルゲンエキスについて、JSA が標準化を行い^①、その標準化に基づいた皮下注射の製品が販売されている。

今般、HDM アレルゲンエキスが複数の企業により本邦にて開発されることとなり、品質の維持管理の必要性に加えて、それら複数の企業の製品間における力価の比較の観点からも、早急に HDM アレルゲンエキスの標準化を行う必要性が生じた。

JSA は、HDM アレルゲンエキスの標準化に際して、スギ花粉アレルゲンエキスの標準化において採択した手法に則った標準化を行うこととし、HDM アレルゲン標準品候補品を用いて HDM 感作陽性者への皮内閾値検査（以下、皮内検査）を行い、アレルゲン活性を同定することとした。

2) 目的

日本における HDM アレルゲンエキスの標準品候補品を用いて、HDM 感作陽性者に皮内検査を行い、各被験者における反応閾値を求める。

また、HDM 感作陽性者から採血を行い、標準プール血清を作製する。

本試験の結果を用いて、JSA は、標準品候補品の被験者平均閾値を求め、標準品候補品の Japanese allergy unit (JAU) を決定する。

3) 実施医療機関

- ① 埼玉医科大学 呼吸器内科
- ② 千葉大学医学部 耳鼻咽喉科

- ③ 日本医科大学 耳鼻咽喉科
- ④ 山梨大学医学部 耳鼻咽喉科

(3) in vitro 試験

1) 計画の背景

アレルギーエキスの力価を評価する方法として、現在 2 通りの方法が考えられる。

一方は IgE 結合阻害活性を指標とした「総アレルギー活性」(以下、Total potency) に基づく方式 (以下、Total potency 方式) であり、他方はメジャーアレルギー含量に基づく方式 (以下、メジャーアレルギー方式) である。

Total potency 方式、メジャーアレルギー方式ともに、標準品を各アレルギー製造業者に提供することが必要となるが、Total potency 方式の場合には、更に標準血清の提供も必要となる。各アレルギー製造業者は提供された標準血清を用いて標準品との比較を ELISA inhibition test で行い、製品の Total potency を決定し、力価のコントロールを行う。

メジャーアレルギー方式の場合は、標準品中のメジャーアレルギー含量を決定し、公開する必要がある。各アレルギー製造業者はその標準品をスタンダードとして用いて ELISA にて製品中のメジャーアレルギー含量を測定し、力価のコントロールを行うことになる。

両方式に相関性が認められるのであれば、標準血清が不要なメジャーアレルギー方式が利便性に優れており、更に HDM のメジャーアレルギーの中でも、Der 1 アレルギー量だけの濃度に基づいた標準化が妥当であれば、最も利便性に優れている。

複数のアレルギー製造業者により統一した単位：JAU での力価表記が行われるためにはより利便性の高い方法が好ましいと考え、その主旨に則って試験計画を行い実施することとした。

2) 目的

標準品候補品のメジャーアレルギー含量の測定を行い、同定する。

また、各種 HDM アレルギーエキスをを用いて、total potency と良く相関するメジャーアレルギーを調査し、メジャーアレルギー方式での代替 in vitro 測定法の提案を行う。

3) 実施施設

- ① 国立病院機構相模原病院
- ② 麻布大学獣医学部

4. In vivo 試験

(1) 臨床研究計画要約

デザイン	非盲験、陰性対照
薬剤 (標準品候補品)	標準品候補品 HDM アレルギーエキス ※対照液：診断用アレルギー皮内エキス対照液「トリイ」
薬剤投与濃度	0.005%日局ポリソルベート 80 添加診断用アレルギー皮内エキス対照液「トリイ」により 3 倍希釈する。希釈したエキスを同様に更に

	3倍希釈を繰り返し、3倍希釈系列のエキスを作製する。 投与は希釈倍率 3^{-19} ～ 3^{-7} までとする。
投与方法及び投与量	<ul style="list-style-type: none"> ・ 投与量：0.02mL ・ 投与方法：ツベルクリン用シリンジ（1mL）を用いて、各薬剤の低濃度から順に高濃度へと前腕部へ皮内投与する。なお、投与に際しては各投与の安全性を確認の上、次の濃度の投与を行う。陽性判定の基準を満たす反応が確認された段階で投与を終了する。 <p>※初回投与濃度：標準品候補品 HDM アレルゲンエキスについては治療用アレルゲンエキス皮下注「トリイ」ハウスダスト 1:10 に比し、100倍程度活性が高い可能性があることを念頭におき、適切な初回投与濃度を決定する。</p>
判定基準	<p>閾値判定基準：投与15分後に投与部位の膨疹径9mm以上、又は、発赤径20mm以上を陽性と判定とし、初めて陽性判定となった希釈濃度を閾値とする。</p> <p>※対照液：陰性対照として対照液を用いて閾値の判定を行う。</p>
目標症例数	52例
評価項目	閾値
調査項目	<ul style="list-style-type: none"> ・ 皮内検査：投与部位の膨疹径及び発赤径 ・ 免疫学的検査：ヤケヒョウヒダニ又はコナヒョウヒダニ IgE 抗体測定（RAST法） ・ 有害事象
その他の調査等	<p>(1) 被験者背景：被験者識別コード、被験者イニシャル、性別、生年月日、アレルギー疾患現病歴（原疾患）</p> <p>(2) 選択基準：</p> <ol style="list-style-type: none"> ①同意：本臨床研究への参加について文書による同意が得られた者 ②年齢：同意取得日の満年齢が20歳以上、50歳以下の者 ③性別：男女 ④入院・通院の別：不問 ⑤抗体検査：HDM（ヤケヒョウヒダニ又はコナヒョウヒダニ）IgE抗体陽性の者（RASTクラス2以上の者） <p>(3) 除外基準：</p> <ol style="list-style-type: none"> ①皮内検査を実施する側の前腕部に皮内検査の評価に影響を与えるような皮膚疾患等を有する者 ②皮内検査実施日前に以下の薬剤を使用している者 <ul style="list-style-type: none"> ・ 1日以内：皮内検査を実施する側の前腕部への全ての外用剤 ・ 7日以内：全身性抗ヒスタミン薬、全身性α刺激薬、全身性β刺激薬、皮内検査を実施する側の前腕部への外用ステロイド剤又は外用免疫抑制剤 ・ 14日以内：抗ヒスタミン作用を持つ三環系抗うつ薬又はフェノチアジン系抗精神病薬 ・ 21日以内：非選択的β遮断薬 ・ 30日以内：全身性免疫抑制薬 ・ 90日以内：抗体薬 ③皮内検査実施日に妊娠している者又は妊娠している可能性のある者

	<p>④皮内検査実施前に HDM エキス又はハウスダストエキスの免疫療法による治療を受けたことのある者</p> <p>⑤重症喘息の者</p> <p>⑥エピネフリンに対する過敏症の既往のある者</p> <p>⑦臨床研究の実施に影響するような心臓、肝臓、腎臓、血液疾患の合併症並びに感染症を有すると判断される者</p> <p>⑧研究責任（分担）者が臨床研究への参画を不相当と判断する者</p>
標準プール血清の作製	<p>採血（血清採取用）</p> <p>HDM IgE RAST クラス 4 以上の者については、標準プール血清作製のために以下の採血を行う。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 採血量：20mL ・ 採取方法：採血用シリンジにて静脈血を採取する。 ・ 処置：得られた血液は血清分離用チューブにて遠心分離により血清を分離し、凍結保存する。

(2) 研究結果

1) 採否

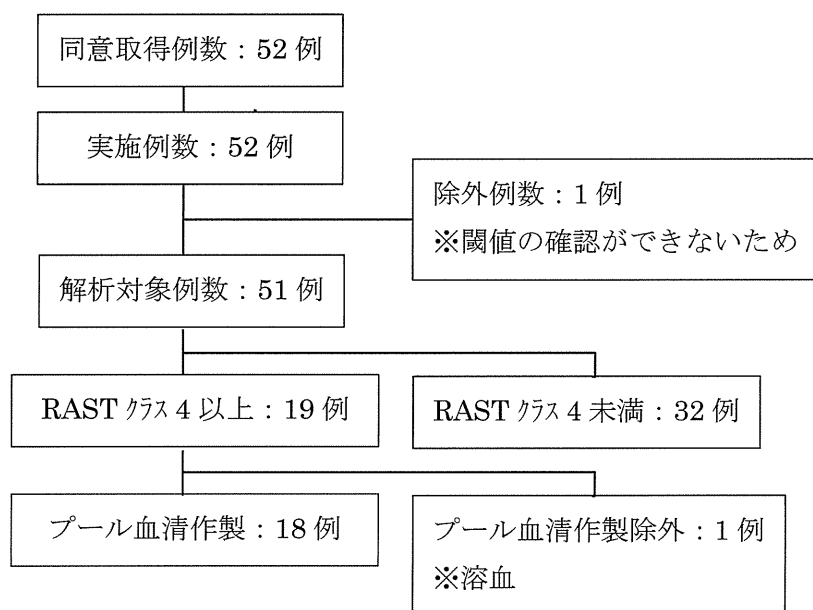


図 3.(2)1)-1 被験者の採否

2) 被検者背景

① 性別：

	男性	女性
例数	24	28

② 年齢：

20 歳以上 30 歳以下	20 例
31 歳以上 40 歳以下	25 例
41 歳以上 50 歳以下	7 例
平均値±SD	32.9±6.5 歳

③ 原疾患

	通年性アレルギー性鼻炎	喘息	健康人・原疾患なし	その他
例数	33 5(喘息合併) 4(スギ花粉症合併)	4	5	1(咳喘息)
合計	42	4	5	1

3) 結果

① 結果

閾値、RAST スコアの一覧を「表 3.(2)3)-1 結果一覧」に示した。

② 閾値

平均値±SD : -13.22±1.43

閾値の度数分布を「図 3.(2)3)②-1 被験者閾値別頻度」に示した。

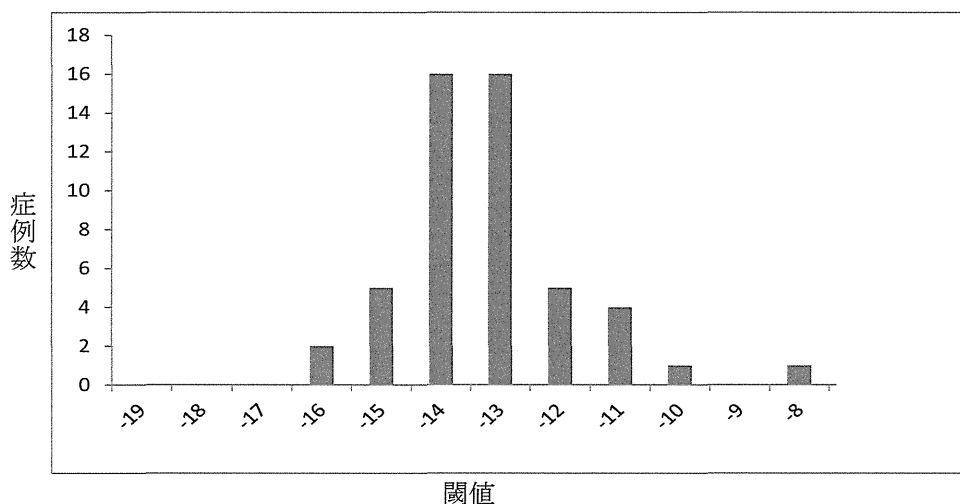


図 3.(2)3)②-1 被験者閾値別頻度

③ コナヒョウヒダニ IgE RAST スコア

平均値±SD : 3.31±1.00

閾値との関係について、「図 3.(2)3)-1 閾値と RAST スコアの関係」に示した。

④ ヤケヒョウヒダニ IgE RAST スコア

平均値±SD : 3.18±1.03

閾値との関係について、「図 3.(2)3)-1 閾値と RAST スコアの関係」に示した。

⑤ プール血清

RAST スコア 4 以上 19 例から採血を行い、血清分離を行った結果、1 例が溶血していたため、残り 18 例にてプール血清を作製した。

作製されたプール血清量は、72mL であった。

表 3.(2)3)-1 結果一覧

番号	RAST Der p	RASTDer f	閾値希釈倍率指数	閾値(AU/mL)	閾値(JAU/mL)
1	2	2	-11	0.05645	0.565
2	3	3	-14	0.00209	0.021
3	2	3	-12	0.01882	0.188
4	3	4	-13	0.00627	0.063
5	4	4	-16	0.00023	0.002
6	2		-14	0.00209	0.021
7	3	3	-13	0.00627	0.063
8	3		-15	0.00070	0.007
9	2		-14	0.00209	0.021
10	6		-15	0.00070	0.007
11	3	3	-15	0.00070	0.007
12	1	2	-12	0.01882	0.188
13	5	5	-14	0.00209	0.021
14	5	4	-15	0.00070	0.007
15		3	-11	0.05645	0.565
16	4	5	-14	0.00209	0.021
17	2		-13	0.00627	0.063
18		4	-14	0.00209	0.021
19	4	4	-14	0.00209	0.021
20	2	2	-13	0.00627	0.063
21	4	4	-14	0.00209	0.021
22	3	3	-14	0.00209	0.021
23	2	2	-11	0.05645	0.565
24	4	4	-13	0.00627	0.063
25	3	3	-14	0.00209	0.021
26	2	2	-10	0.16935	1.694
27	3	3	-13	0.00627	0.063
28	2	1	-8	1.52416	15.242
29	4	4	-14	0.00209	0.021
30	3	3	-13	0.00627	0.063
31	3	3	-13	0.00627	0.063
32	4	4	-14	0.00209	0.021
33	3	4	-14	0.00209	0.021
34	3	3	-15	0.00070	0.007
35	3	3	-15	0.00070	0.007
36	4	5	-12	0.01882	0.188
37	3	3	-13	0.00627	0.063
38	3	3	-13	0.00627	0.063
39	5	5	-13	0.00627	0.063
40	4	4	-13	0.00627	0.063
41	3	3	-11	0.05645	0.565
42	4	5	-14	0.00209	0.021
43	4		-14	0.00209	0.021
44	5	5	-14	0.00209	0.021
45	2	2	-13	0.00627	0.063
46	3	3	-13	0.00627	0.063
47	3	3	-13	0.00627	0.063
48	2	2	-12	0.01882	0.188
49	4	4	-13	0.00627	0.063
50	3	3	-12	0.01882	0.188
51	2	2	-14	0.00209	0.021
平均値	3.18	3.31	-13.22	0.00495	0.049

閾値 (AU/mL) : 閾値の希釈倍率を考慮した濃度を FDA 標準化単位 AU/mL で表した値

閾値 (JAU/mL) : 閾値の希釈倍率を考慮した濃度を本剤が 100,000JAU/mL になったと仮定して JSA 標準化単位 JAU/mL で表した値

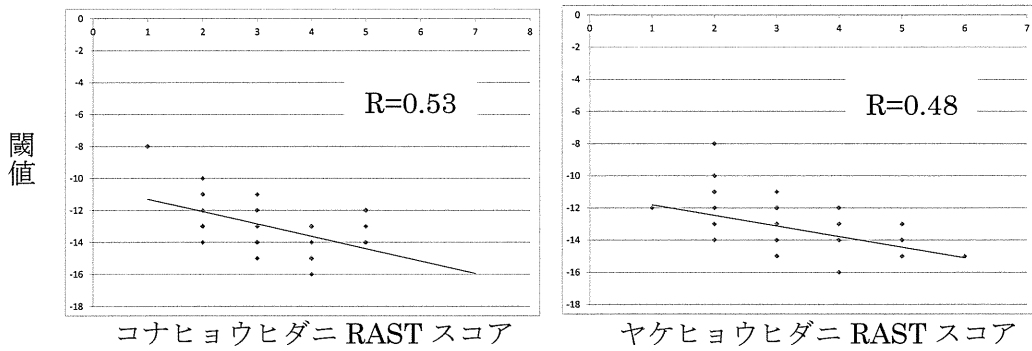
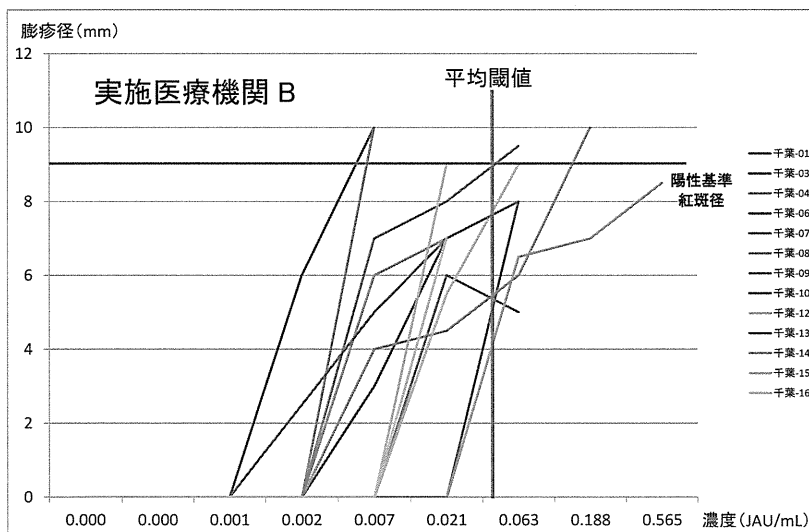
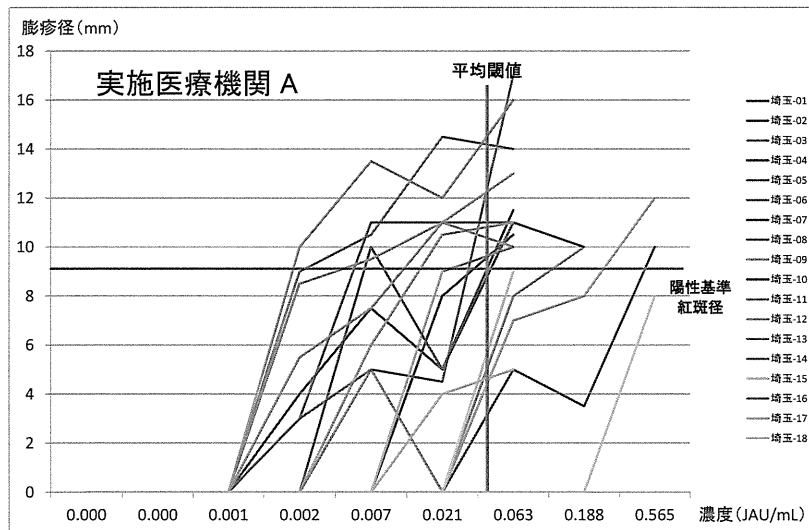
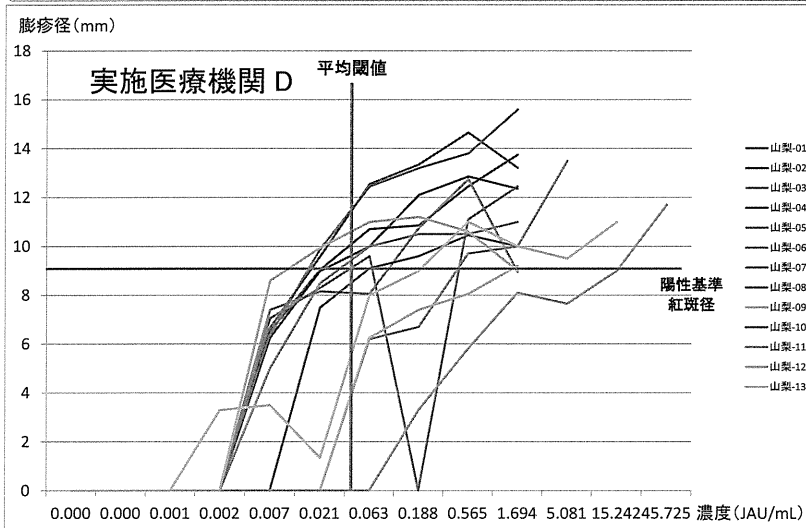
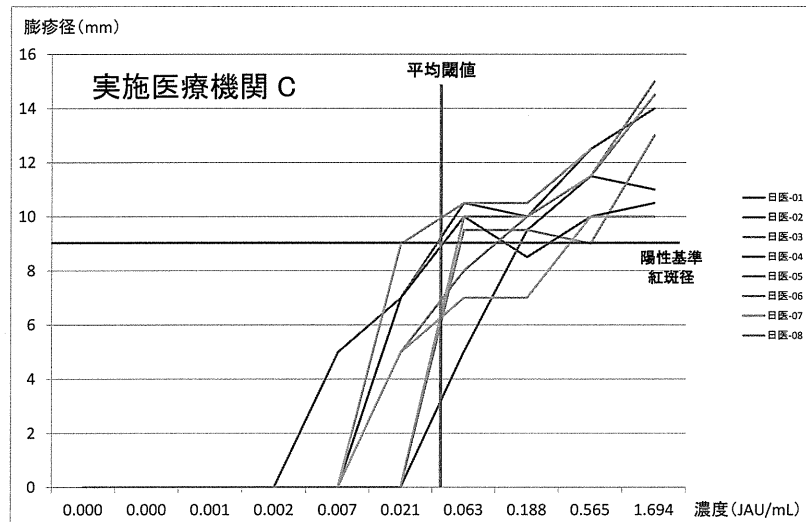


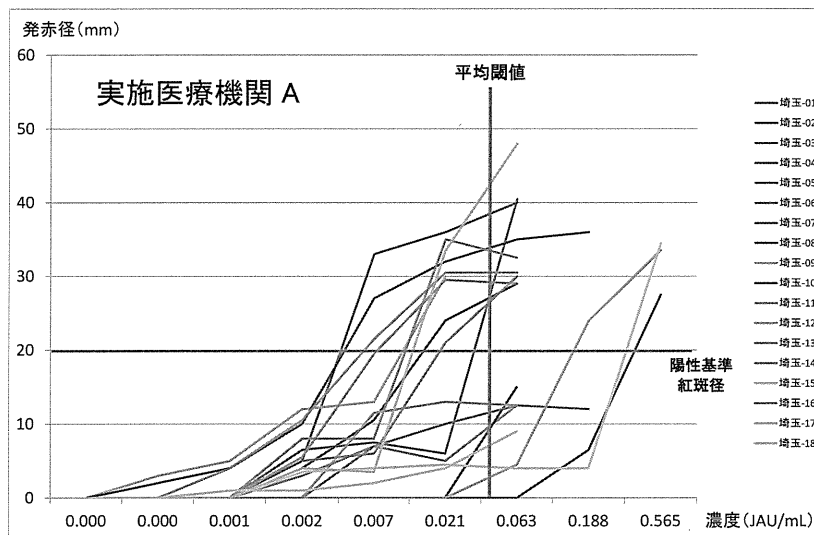
図 3.(2)3)-1 閾値と RAST スコアの関係

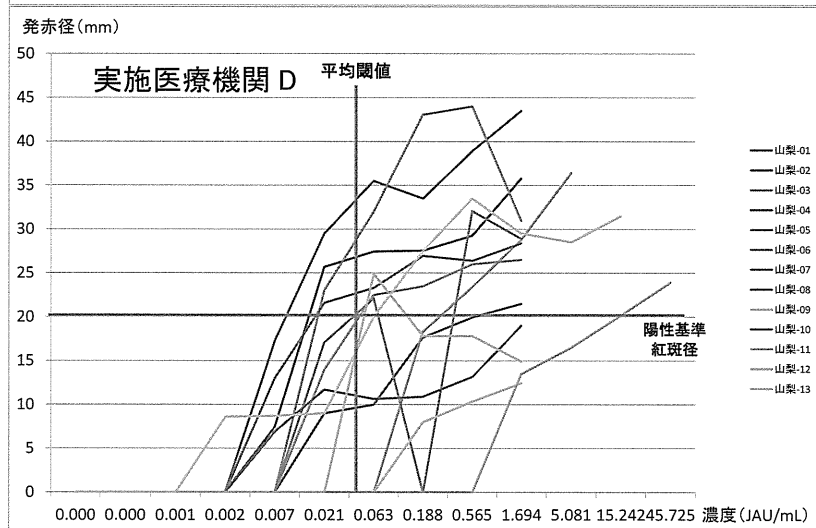
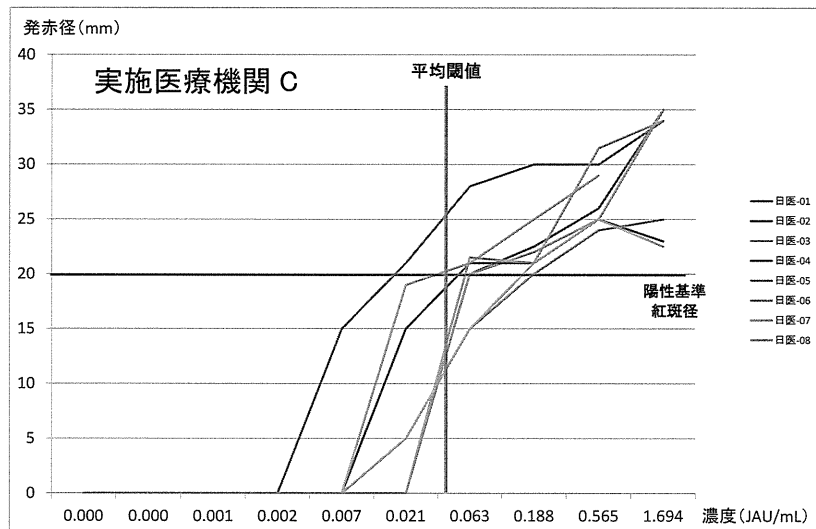
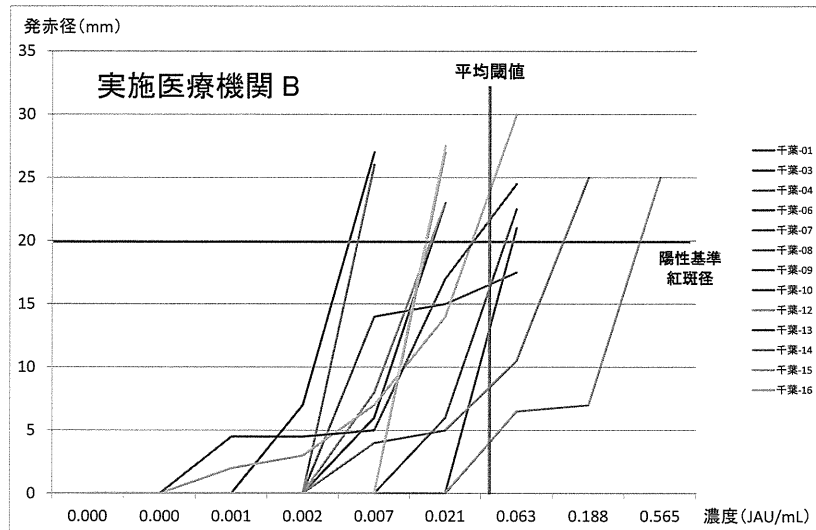
⑥ 被験者別膨疹径曲線





⑦ 被験者別発赤径曲線





(3) 考察

1) 標準品候補品の活性

標準品候補品の閾値の3倍希釈倍率の指数の平均値は、-13.22であった。このことはスギ花粉エキス標準化時に決められた方針に基づくと、-13~-15の範囲に入ることから、100,000JAU/mLに相当する。

2) 閾値とIgE RASTスコアの関係

希釈倍率が3倍間隔であること及びRASTスコアが6段階であることから、細かな変動を確認することができず、関係性の検証は困難であるが、RASTスコアが高いほど閾値濃度が低下する負の相関の傾向を確認することができた。

(4) 添付資料

1) 結果全データ一覧

2) 臨床試験実施計画書 室内塵ダニアレルゲンエキス標準品候補品を用いた皮内閾値検査（実施計画書番号：HDM-STD-01）第1版（作成年月日：2013年7月23日）

3) 症例報告書 室内塵ダニアレルゲンエキス標準品候補品を用いた皮内閾値検査（実施計画書番号：HDM-STD-01）第1版（作成年月日：2013年7月23日）

4) 試験に参加頂くにあたって 室内塵ダニアレルゲンエキス標準品候補品を用いた皮内閾値検査 説明文書（案）

5) 室内塵ダニアレルゲンエキス標準品候補品を用いた皮内閾値検査 薬剤調製に関する手順書（試験実施計画書番号：HDM-STD-01）（作成年月日：2013年7月23日）

6) 室内塵ダニアレルゲンエキス標準品候補品を用いた皮内閾値検査 データ取り纏めに関する手順書（試験実施計画書番号：HDM-STD-01）（作成年月日：2013年9月23日）

(5) 参考文献

- ① 安枝ら、アレルギー1996；45(4)：416-421