

5. In vitro 試験

(1) 試験計画要約

試験内容	<p>1)メジャーアレルゲン含量の測定</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Der f 1 ・ Der p 1 ・ Der 2 (Der f 2 と Der p 2 の合計量) <p>※検量線：92DF 及び 92DP にて作成（相模原病院にて作製したコナヒョウヒダニ由来アレルゲン及びヤケヒョウヒダニ由来アレルゲン。同施設において精製した Der f 1、Der p 1、Der f 2 及び Der p 2 を用いて、92DF 及び 92DP の Der 1 含量及び Der 2 含量は決定済み）</p> <p>※測定系：相模原病院にて確立した Der f 1、Der p 1 及び Der 2 を測定できる ELISA による測定系</p> <p>2)Total potency の測定</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 固相化に標準品候補品を用いた場合の inhibition 法での測定 ・ 固相化にエキス C を用いた場合の inhibition 法での測定 <p>※用いた血清は in vivo 試験に参加した被験者の血清（HDM 特異的 IgE 抗体スコアが 4 以上であった 10 名の血清を混合した血清）</p>
薬剤	<p>標準品候補品 HDM アレルゲンエキス及びその他の入手可能な HDM アレルゲンエキス 9 種（エキス A～I）（エキス名はブライド化してある）</p> <p>※FDA 標準品 1 種、海外製品 1 種及び JSA アレルゲンと免疫療法専門部会の協力企業である鳥居薬品株式会社、塩野義製薬株式会社からの提供を受けた 7 種の合計 9 種のエキス。</p>

(2) 試験結果

1) メジャーアレルゲン含量の測定

表 4.(2)1)-1 各 HDM アレルゲンエキス中のメジャーアレルゲン濃度

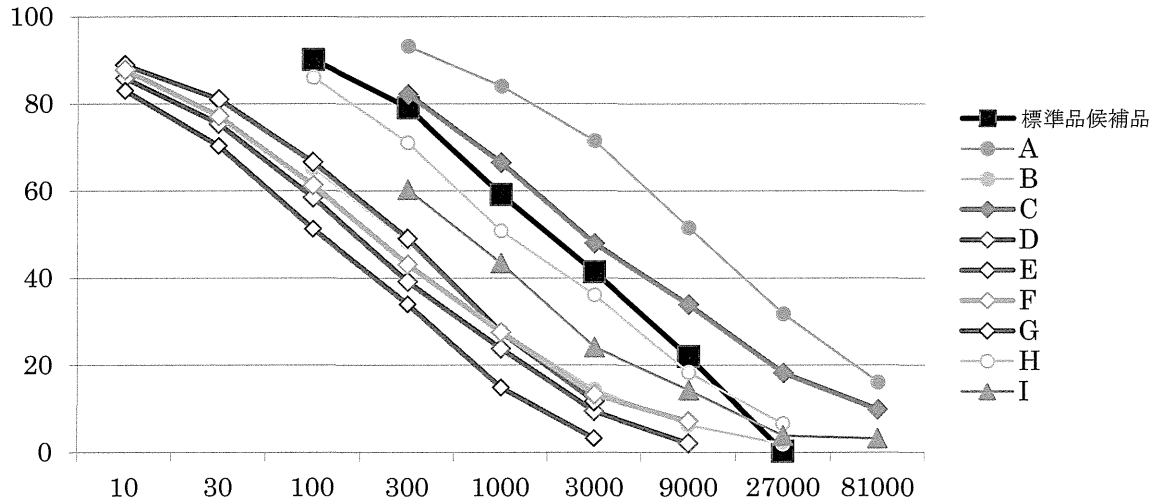
エキス 名称	Der p 1	Der f 1	Der 1	Der 2	Der 1 +Der 2	Der 1 /Der 2
標準品 候補品	28.2	14.1	42.3	55.5	97.8	0.76
A	80.0	54.2	134	254	388	0.53
B	2.69	0.98	3.67	6.76	10.4	0.54
C	30.9	52.7	83.6	45.8	129	1.83
D	3.59	2.50	6.09	2.38	8.47	2.56
E	3.58	5.26	8.84	2.67	11.5	3.31
F	2.27	5.45	7.72	3.28	11.0	2.35
G	2.26	2.36	4.62	2.84	7.46	1.63
H	16.7	16.3	33.0	19.6	52.6	1.68
1	10.1	2.54	12.6	11.3	23.9	1.12

単位: $\mu\text{g/ml}$ (Der 1/Der 2 についてのみ比率)

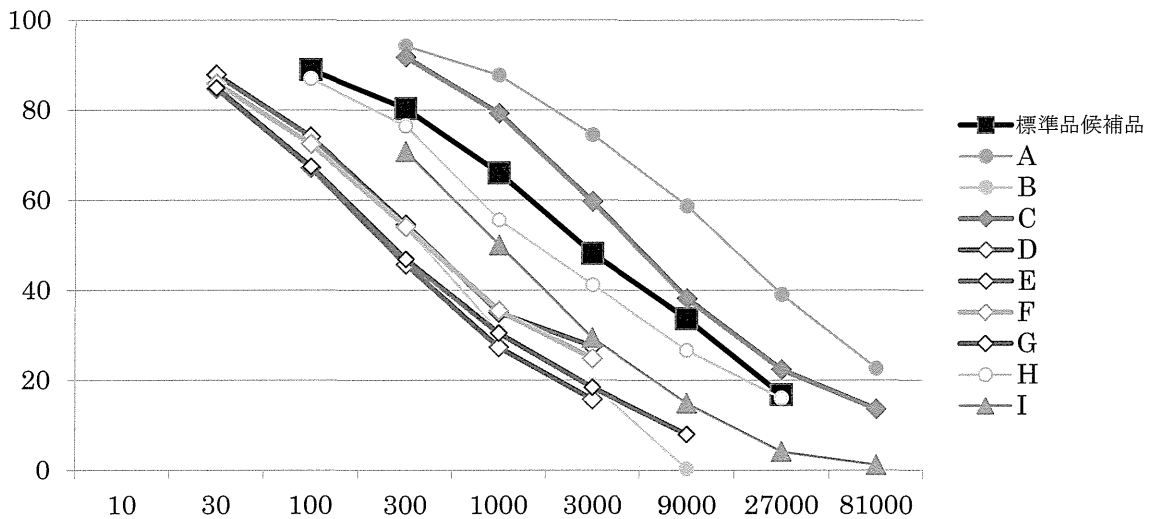
2) Total potency の測定

① 各エキスの力価

標準品候補品を固相化し、プール血清を反応させたのち結合した IgE を検出する ELISA 系を用い、各エキスの添加による IgE 結合阻害試験を行った。固相化するエキスとしては標準品候補品以外にエキス C を用いた試験も行った (図 4.(2)2) ①)。



固相化に標準品候補品を用いた結果



固相化にエキス C を用いた結果

図 4.(2)2)① IgE 結合阻害活性の測定

凡例：阻害活性をテストしたエキス。横軸：阻害のために添加した被験エキスの希釈率。

縦軸：それらのエキスを添加しないときの IgE 結合を 100 とした結合割合 (%)。

② Total potency とメジャーアレルゲン濃度の相関性

図 4.(2)2)①の阻害カーブより、IgE 結合を 50%阻害するエキス希釈倍率を各エキスについて求め、標準品候補品の値を 1 として、各エキスの相対力価を求めた。この相対力価と表 4.(2)1)-1 のメジャーアレルゲン濃度の相関を解析したところ、Der 1 含量、Der 2 含量又はその合計量のいずれに対しても相対力価は強い相関を示した。

(図 4.(2)2)②) また、エキス C を用いて同様の試験を実施したところ、同様の結果が得られた。

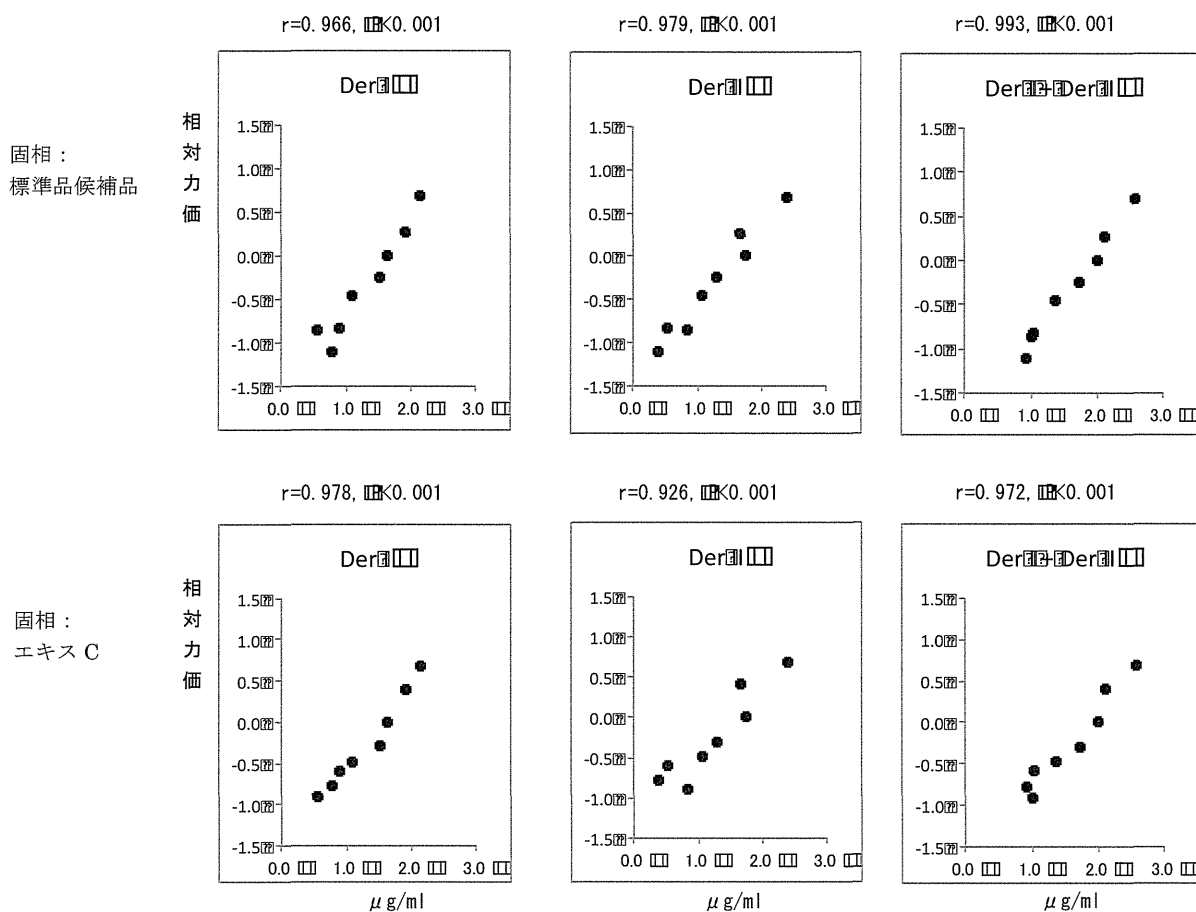


図 4.(2)2)②. 相対力価とメジャーアレルゲン濃度の相関

縦軸は図 4.(2)2)①の IgE 結合阻害試験から求めた各エキスの相対力価。横軸はメジャーアレルゲン濃度 (それぞれ、Der 1、Der 2 またはその合計)。

(3) 考察

1) メジャーアレルゲン含量

標準品候補品に含まれる Der 1 と Der 2 の含量比は 0.76 (Der 1 /Der 2) であり、Der 1 と Der 2 概ね同程度含まれるエキスであった。また、Der p1 と Der f 1 の含量比は、2.00 (Der p1/Der f 1) であり、Der p2 と Der f 2 の含量比は不明ではあるが、Der p 由来アレルギーが多く含まれる可能性がある。他の 9 種のエキスについては、含量比 (Der 1 /Der 2) が 0.53~3.31 の範囲ばらついており、Der 1 の含量比が高いエキス、Der 2 の含量比が高いエキスのいずれもが存在した。

また、市販キットによる測定も行い、この結果が信頼できることを確認している (データ示さず)。

2) Total potency

標準品候補品と比較して、エキス A 及び C は活性が強く、エキス H 及び I がほぼ同等、その他は弱いという結果であったが、これらはメジャーアレルギー濃度との相関性が示唆された。また、固相化するエキスを変えてもその傾向に変化はなかったことから、標準品候補品とエキス C は同質のアレルギーエキスであると推察された。

各エキスの標準品候補品又はエキス C に対する相対力価と Der 1 含量、Der 2 含量又はその合計量の間の相関性を調べたところ $r=0.926\sim 0.993$ といずれも高い相関性を示した。この結果から、Der 1 含量、Der 2 含量又はその合計量のいずれも、total potency を正しく反映するものと判断した。

3) 2 施設での試験結果の再現性

表 4.(2)1)-1 と図 4.(2)2)①及び②で示したデータは相模原病院における試験結果である。麻布大学でも同様の試験を独立に行い、同様の試験結果が得られている (データ示さず)。

4) プール血清について

皮膚テストは 52 名の患者ボランティアで行われ、閾値採用症例数は 51 名であった。そのうちダニ特異的 CAP-RAST 値がクラス 4 以上の患者は 19 名であった。このうち、予定した測定期日までに回収した 10 名分の血清を用いて本報告の検討のためのプール血清を作製した。期日後に最終的に回収された 19 名のうち、溶血しかつ回収体積の少なかった 1 名を除いた 18 名分の血清を用いて学会保存用のプール血清を作成した (4 ml/人 $\times 18=72$ ml)。学会保存プール血清 (18 名分) には試験に用いたプール血清 (10 名) に新たに 8 名分の血清が加わっているが、データの実質的解釈への影響はないものと推察する。

6. 結論

In vivo 及び in vitro の試験結果から、今回の HDM アレルギーエキスの標準化については、以下のことを決定事項としたい。

- (1) 標準品候補品は、Der 1 濃度と Der 2 濃度がほぼ同程度であり、かつ、ヤケヒョウヒダニ由来アレルギー濃度とコナヒョウヒダニ由来アレルギーも大きな差はないものと推察され、バランスの取れたアレルギーエキスであった。更に、調査した種々の HDM ア

レルゲンエキスの中でも中間的な力価を有するもので、十分なアレルギー含有するものであった。以上のことから、標準品候補品を日本の HDM アレルギーエキスの標準品として選定することは妥当であると判断し、標準品として選定する。

- (2) 標準品の力価は、in vivo 試験の結果より、100,000JAU/mL とする。

この標準品のメジャーアレルギー Der 1 (Der f 1 +Der p 1)濃度を、2 施設（相模原病院及び麻布大学）での Der 1 濃度測定値の幾何平均値である 38.5 µg/ml と正式に定める（表 4.(2)1）-1 の相模原病院での測定値 42.3µg/ml は正式な値ではない。

- (3) 日本における HDM アレルギーエキスの力価測定において用いる代替となる指標の検討において、Der 1 含量、Der 2 含量又はその合計量のいずれもが total potency を適正に反映するものであることが確認された。そのため Der 1 含量のみでも相対力価を説明することは可能と判断し、また利便性の面を考慮して、ヤケヒョウヒダニ由来の Der p 1 とコナヒョウヒダニ由来の Der f 1 の合計量（Der 1 量）とする。ただし、今回検討したエキスがいずれもヤケヒョウヒダニ及びコナヒョウヒダニ由来のアレルギーエキスを含み、Der 1 含量と Der 2 含量の間に問題となるような大きな差異がなく、その含量比（Der 1 含量 / Der 2 含量）は 0.53～3.31 であった。

- (4) 標準品の継代する場合は、今回選定した標準品と同じ製法で製造された別のロットを選定することが望ましい。その際、メジャーアレルギー濃度は、今回選定した標準品を用いて決定する。

以上

アレルギーと免疫療法専門部会 ダニアレルギー標準化タスクフォース

・ *in vivo* グループ

埼玉医科大学 呼吸器内科 教授 永田 真

千葉大学医学部 耳鼻咽喉科 教授 岡本美孝

日本医科大学 耳鼻咽喉科 教授 大久保公裕

山梨大学医学部 耳鼻咽喉科 教授 増山敬祐

・ *in vitro* グループ

麻布大学獣医学部獣医学科 教授 阪口雅弘

国立病院機構相模原病院臨床研究センター 診断・治療薬開発研究室長 福富友馬

診断・治療薬開発研究室 安枝 浩

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 高井敏朗

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)

大久保公裕 日本医科大学
岡本美孝 千葉大学
増山敬佑 山梨大学
永田 真 埼玉医科大学
高井敏朗 順天堂大学
坂口雅弘 麻布大学
福富友馬 相模原病院

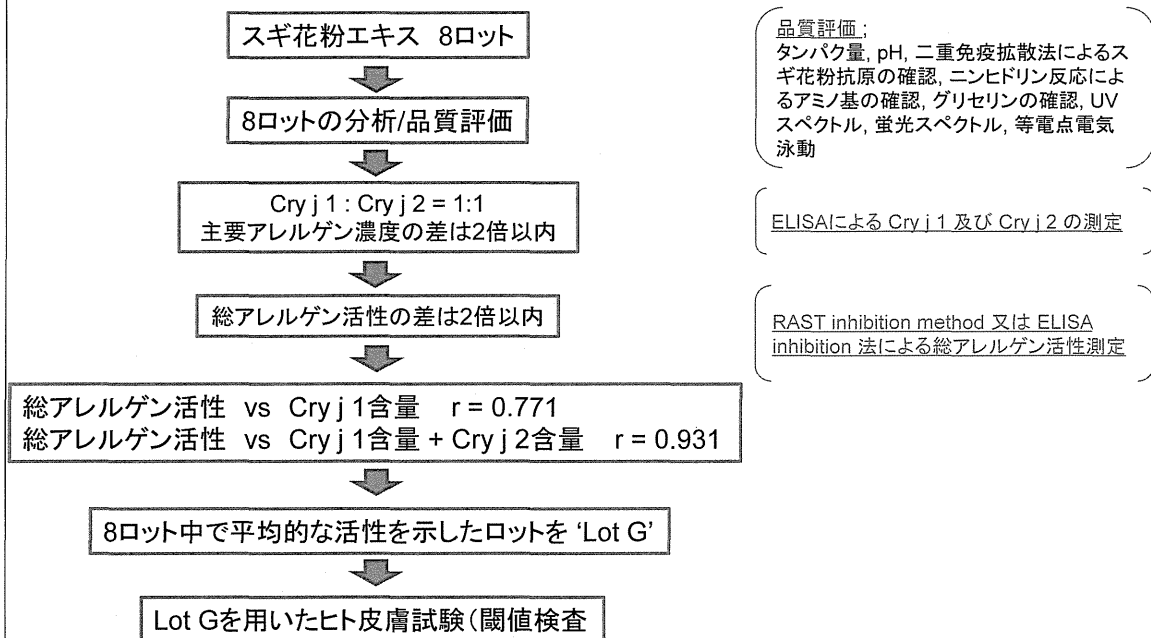
研究目的

- 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成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年に日本アレルギー学会で行われた。スギ花粉症患者に3倍希釈系列で皮膚反応閾値試験を行い、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)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ダニ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研究を行った。

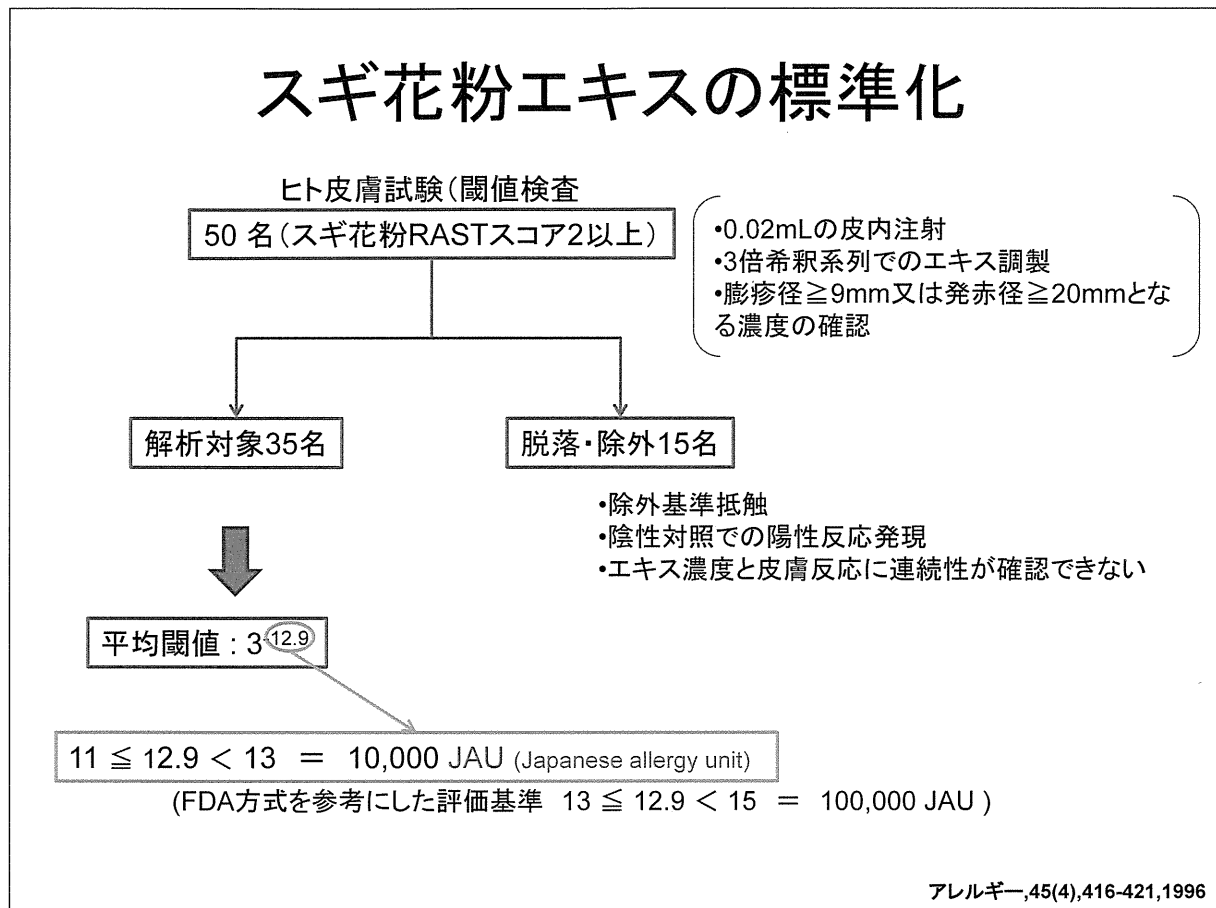
アレルギーエキスの標準化 基本方針(日本アレルギー学会)

- 標準品となるアレルギーエキスを選定する
- 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ギーに共通する単位を用いる。
- 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ギー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。
- 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。

スギ花粉エキスの標準化



スギ花粉エキスの標準化



背景

標準化の基本方針

- 標準品を選定し、その力価を皮膚テストによって決定(in vivoテスト)
- 各社製品の力価はin vitroテストによって決定

In vitroテスト

現在2通りの方法が考えられる。

1. 総アレルゲン活性方式: IgE結合活性に基づく方式(米国FDAが採用。IgE結合阻害試験によるもの)
2. メジャー・アレルゲン方式: メジャー・アレルゲン含量に基づく方式。

in vivo (ヒト皮膚試験)

- 目的

- 日本における室内塵ダニ(以下, 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, 日本アレルギー学会は, 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。

実施医療機関

- 埼玉医科大学 呼吸器内科
- 千葉大学医学部 耳鼻咽喉科
- 山梨大学医学部 耳鼻咽喉科
- 日本医科大学 耳鼻咽喉科

薬剤

- 標準品候補品
 - HDMアレルゲンエキス(国内開発中)
- 薬剤の準備
 - 標準品候補品を0.005%日局ポリソルベート80添加診断用アレルゲン皮内エキス対照液「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。(3⁻¹⁹倍希釈まで)

ヒト皮膚試験(閾値検査)

- 投与量:0.02mLを皮内投与する。
- 希釈した標準品候補品を低濃度から順に高濃度へと前腕部へ皮内投与する。
- 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。
- 陽性判定
 - 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。
 - 陰性対照として「診断用アレルゲン皮内エキス対照液「トリイ」」を用いる。

対象

- 対象
 - HDMに感作されている者
- 選択基準
 - 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)
- 除外基準
 - 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
 - 皮内検査実施日前に検査に影響を与える薬剤を使用している者
 - HDMエキス等の免疫療法による治療を受けたことのある者
 - 重症喘息の者 等

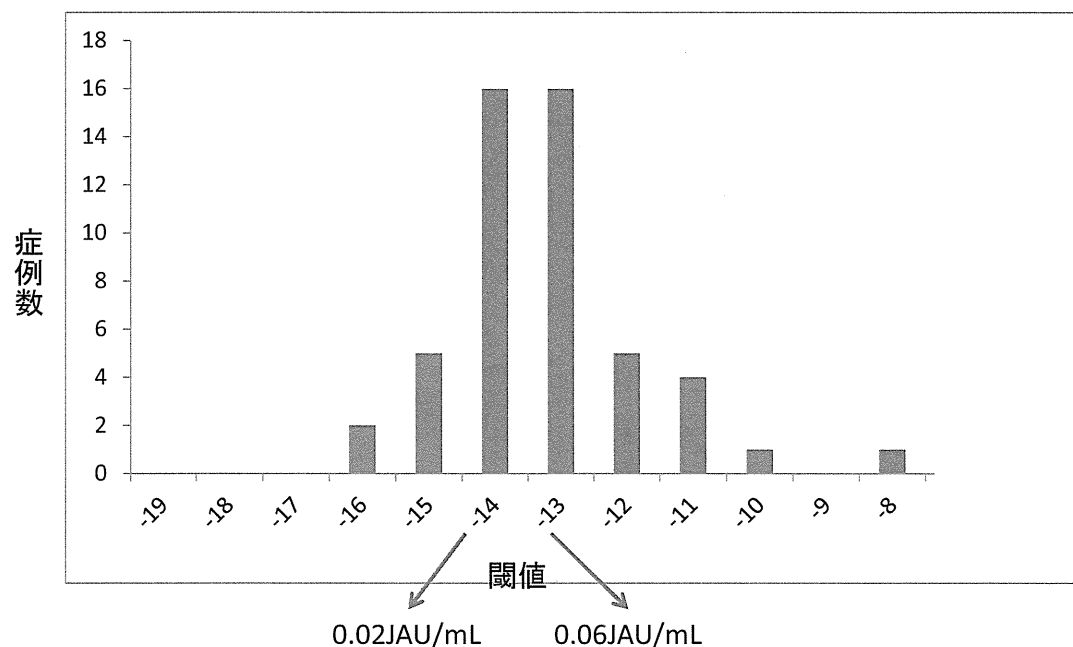
標準プール血清の作製

- 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採血を行い、血清を分離し、凍結保存する。
- 適格症例の血清を混合し、標準プール血清とする。

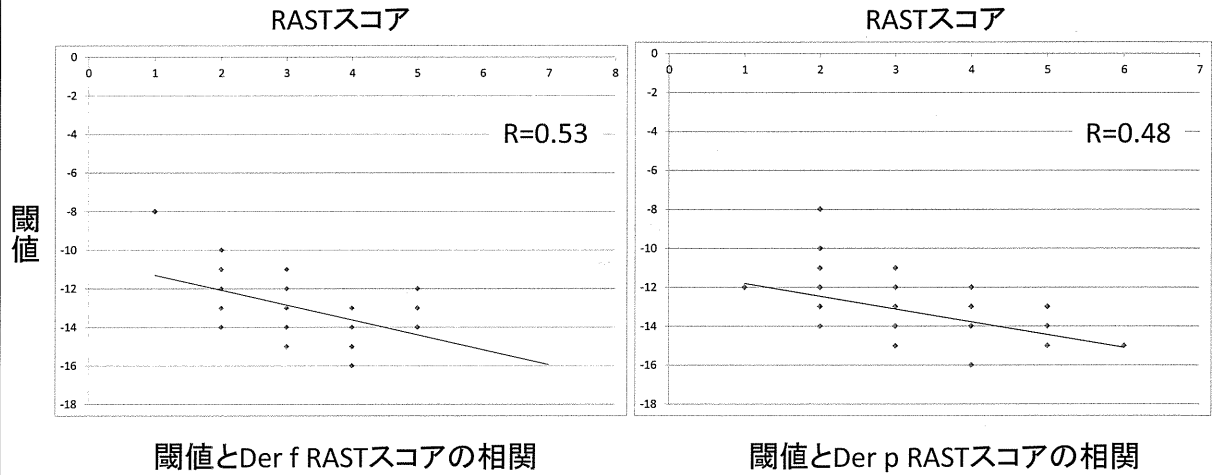
試験結果概要

- 実施症例数 : 52例
- 閾値採用症例数 : 51例
- 平均RASTスコア :
 - コナヒョウヒダニ : 3.31 ± 1.00
 - ヤケヒョウヒダニ : 3.18 ± 1.03
- 標準品候補品平均閾値 : -13.22 ± 1.43
 - 閾値が $-13 \sim -15$ の場合は $100,000\text{JAU/mL}$
 - (スギ花粉エキス標準化時に決められた方針に基づく評価)
 - 参考情報
 - $100,000\text{JAU/mL}^{-13.22} = 0.049\text{JAU/mL}$

閾値度数分布



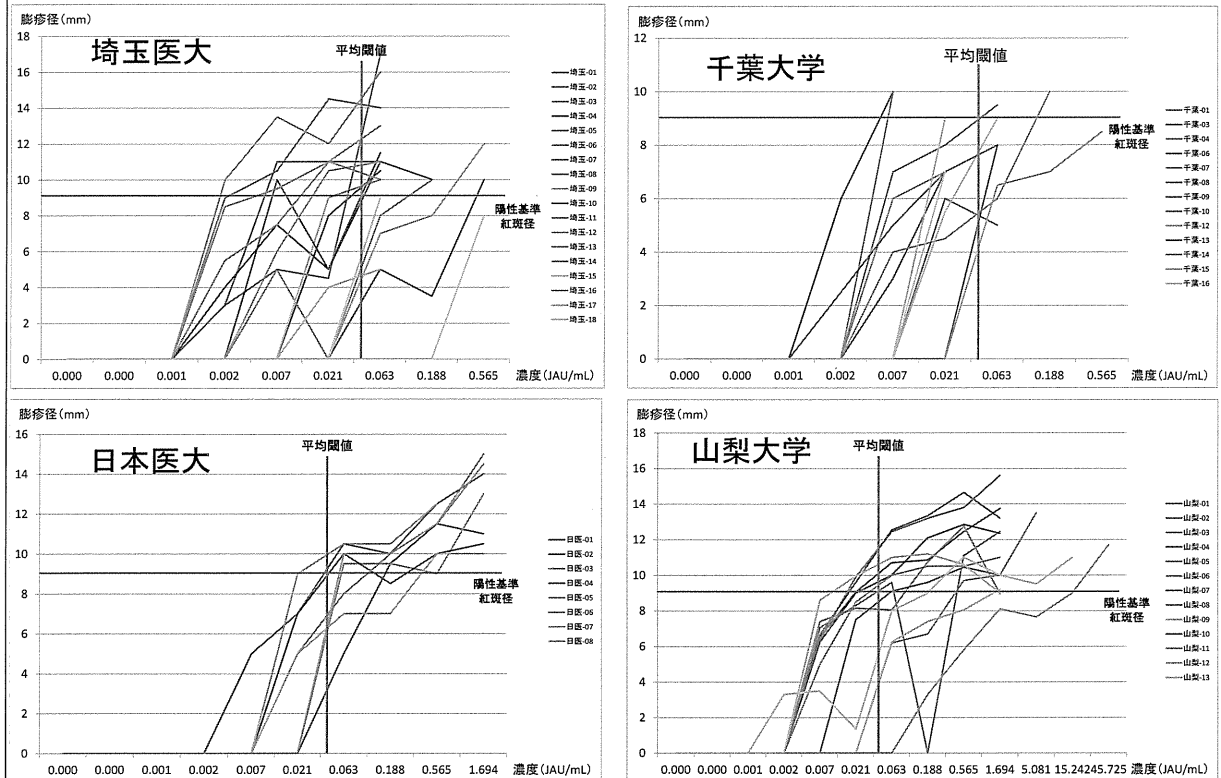
閾値とHDM RASTスコア



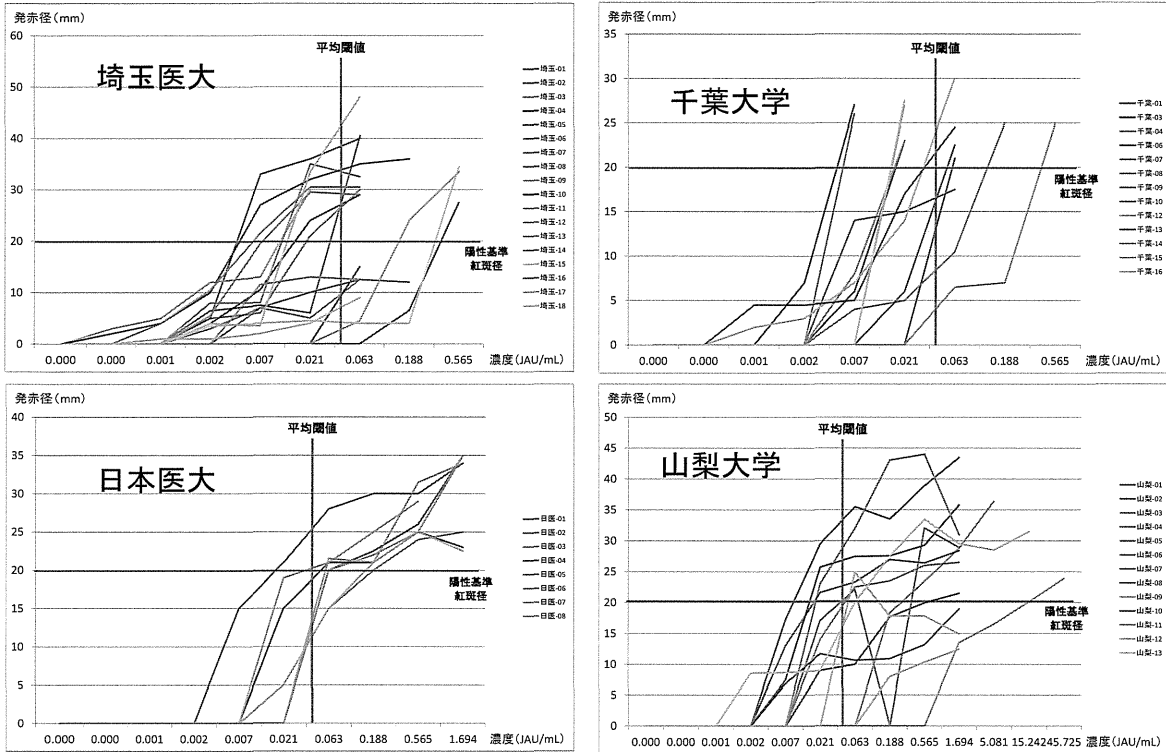
閾値とDer f RASTスコアの相関

閾値とDer p RASTスコアの相関

膨疹の濃度反応



発赤の濃度反応



目的

In vitroでの力価決定手段について、下記を決定する:

- ・2つの方式(総アレルゲン活性方式 vs メジャー・アレルゲン方式)のどちらを採用すべきか
- ・選択した方式における、具体的な方法

両方式による力価に相関が認められるか？(相関するなら、血清が不用なメジャー・アレルゲン方式が利便性に優れる)

ダニのメジャー・アレルゲン(グループ1と2の、2グループ)のうち、グループ1アレルゲンだけの濃度に基づいた標準化が妥当か？(そうであれば、最も利便性に優れる)。

・・・利便性に優れるのは、グループ1アレルゲンだけの濃度に基づいたメジャー・アレルゲン方式

方法

血清: 10名分の血清を用いて標準化検討用のプール血清を作製

ダニエキス: 合計10種類。協力企業2社から標準品を含む複数エキスの提供。FDA標準品はFDAより1種類。他の市販品1種類を購入。

Dermatofagoides farine (以下Der f)と *D. pteryssinus* (以下Der p) のエキスを等量混合して試験に用いた。

メジャー・アレルゲンの定量: 相模原病院で確立されたサンドイッチELISA系

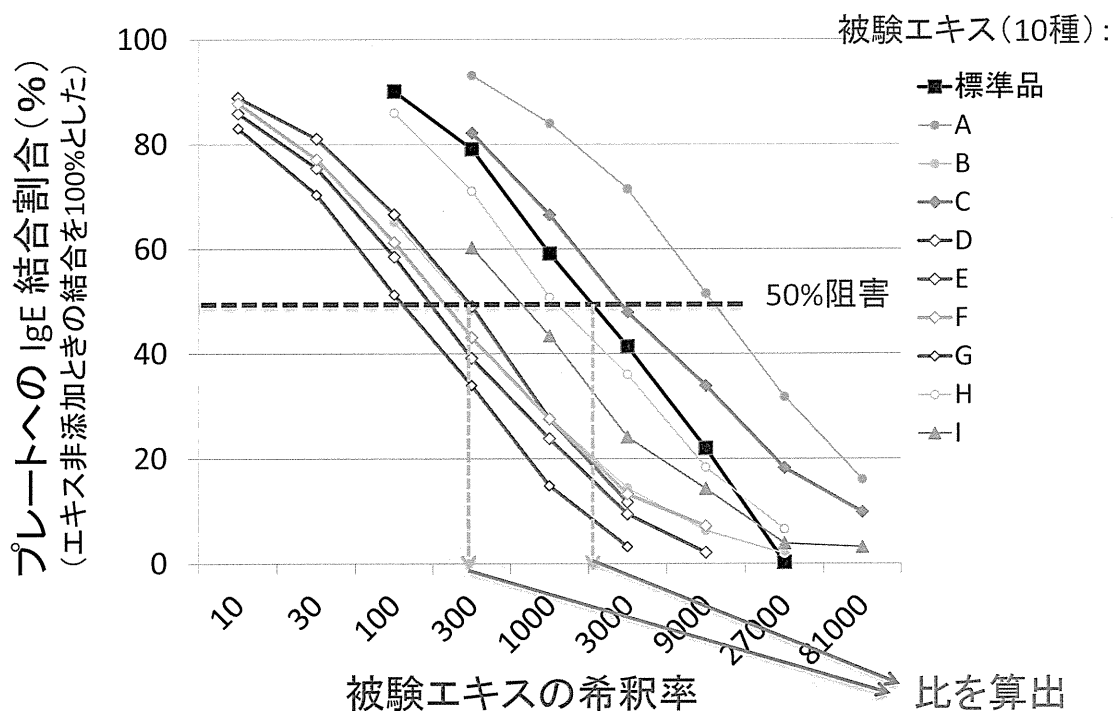
「総アレルゲン活性」の比較: プール血清を用いたIgE結合阻害実験

・標準品エキスを固相化(他の1エキスでも行った)→血清を反応→結合したIgEを検出(相模原病院で確立されたELISA)

・この系を用い、他のエキスの添加によるIgE結合阻害試験を行った。

結果

IgE 結合阻害活性の測定



結果

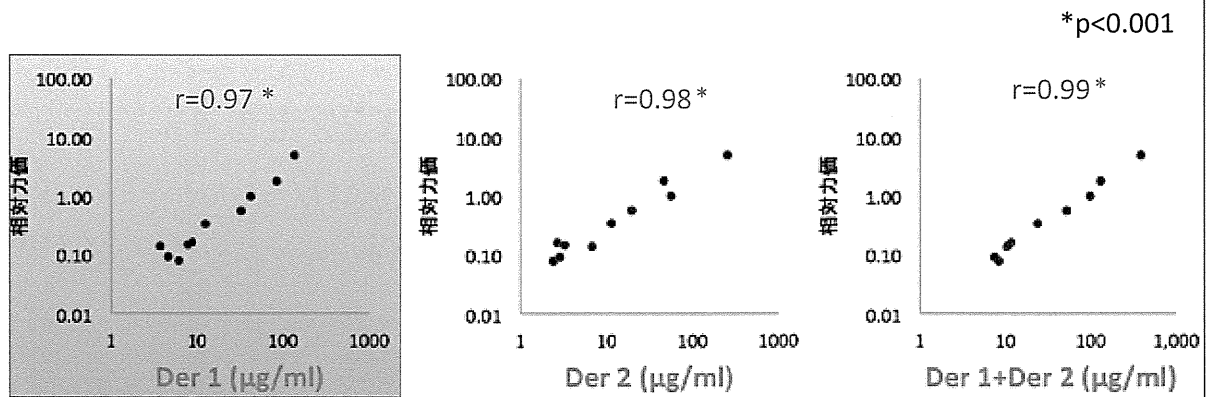
標準品とその他のダニエキス9種(計10種)の メジャーアレルゲン量と総アレルゲン活性

	メジャーアレルゲン量(μg/ml)					総アレルゲン活性 (50%Inhibition 相対力価)	
	Der p 1	Der f 1	Der 1	Der 2	Der 1 + Der 2	固相:標準品	固相:Extract C
	標準品	28.2	14.1	42.3	55.5	97.8	1.00
A	80.0	54.2	134	254	388	4.89	4.85
B	2.69	0.98	3.67	6.76	10.4	0.14	0.13
C	30.9	52.7	83.6	45.8	129	1.83	2.54
D	3.59	2.50	6.09	2.38	8.47	0.08	0.16
E	3.58	5.26	8.84	2.67	11.5	0.16	0.22
F	2.27	5.45	7.72	3.28	11.0	0.15	0.26
G	2.26	2.36	4.62	2.84	7.46	0.09	0.16
H	16.7	16.3	33.0	19.6	52.6	0.56	0.51
I	10.1	2.54	12.6	11.3	23.9	0.35	0.33

相模原病院測定データ:麻布大学データも同等の結果

結果

メジャーアレルゲン量と総アレルゲン活性(相対力価) の相関 (固相として標準品を用いた場合)



Der 1濃度、Der 2濃度、Der 1+Der 2濃度のいずれも、
総アレルゲン活性と強い相関

Der 1濃度だけによって標準化を行う妥当性が担保された。

結論

標準品ダニエキスのメジャーアレルゲン量 (µg/ml)

測定施設	Group 1 allergen									Group 2 allergen
	麻布大学			相模原病院			両施設の幾何平均値			相模原病院
アレルゲン名	Der p 1	Der f 1	Der 1	Der p 1	Der f 1	Der 1	Der p 1	Der f 1	Der 1	Der 2
アレルゲン量	23.2	11.8	35.0	28.2	14.1	42.3	25.6	12.9	38.5	55.5

- ・標準品の力価は、皮膚テストにより100,000 JAUと決定された。
- ・Der 1 濃度と総アレルゲン活性(IgE結合活性)がよく相関することが示された。
- ・よって今後は下記手順によるダニエキスの力価決定が可能となる。

標準品をスタンダードとしてELISAを行う
 → エキス中のDer 1濃度決定
 → 次の換算式により、JAU単位のエキス力価を決定
 Der 1濃度38.5 µg/ml=100,000 JAU

結論

• In vivo試験

標準品候補品平均閾値：-13.22±1.43

– 閾値が-13~-15の場合は100,000JAU/mL

- (スギ花粉エキス標準化時に決められた方針に基づく評価)

– 参考情報

• $100,000\text{JAU/mL}^{-13.22} = 0.049\text{JAU/mL}$

• In vitro試験

– 次の換算式により、JAU単位のエキス力価を決定

Der 1濃度38.5 µg/ml=100,000 JAU/ml

臨床研究実施計画書

「HDMアレルギーエキス標準品候補品 を用いた皮内閾値検査」

[研究代表者]

山梨大学大学院医学工学総合研究部
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学
教授 増山敬祐

1. 研究課題名:「HDMアレルギーエキスの標準品候補品を用いた皮内閾値検査」
2. 研究期間:倫理審査委員会承認後～2014年3月31日
3. 研究組織

研究代表者:社団法人日本アレルギー学会アレルギーと免疫療法専門部会
 部長 増山敬祐

(山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授)

研究責任者	共同臨床研究機関名
大久保公裕	日本医科大学耳鼻咽喉科 教授
岡本美孝	千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 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総合研究部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授

4. 背景と臨床研究計画根拠

アレルギーエキスの品質を維持管理するために標準化の作業が必須となっている。

本邦においては、まず初めにスギ花粉から得られたアレルギーエキスについて、一般社団法人日本アレルギー学会（以下、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（以下、SCIT製品）が販売されている。

今般、室内塵ダニ（以下、HDM）のアレルギーエキスの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、HDMアレルギーエキスの標準化の必要性が生じた。

JSAは、HDMアレルギーエキスの標準化に際して、スギ花粉アレルギー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アレルギー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、アレルギー活性を同定することとした。

5. 目的

日本におけるHDMアレルギー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。

※本臨床研究の結果を用いて、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。