

平成 25 年度功労科学研究費補助金事業
難治性疾患等克服事業（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）
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も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依ってその単位、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。このアレルギー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ギー免疫療法、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ギーは正しい診断、適正なアレルギー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する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。

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。

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

要アレルゲン量を決定して、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。

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ゲン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

in 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。

in vitro 試験

9月中に回収できた血清(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实践させう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。

In vitro 試験における被験者の膨疹径

