

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
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

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ギー濃度はサンドイッチ ELISA により測定した。in vitro における総アレルギー活性は、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 アレルギー濃度、グループ 2 アレルギー濃度、および両者の合計濃度の 3 通りのメジャーアレルギー濃度に対して 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ギー含量に基づく in vitro 試験が適切であり、対象アレルギーとしてはダニグループ 1 アレルギー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、全ての被験エキス之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、総アレルギー活性方式と呼ぶ)と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. メジャーアレルギーの測定

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ギー濃度を測定した。メジャーアレルギー濃度としては、グループ 1 アレルギーである Der f 1 と Der p 1 の各濃度、そしてグループ 2 アレルギーの総濃度(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を用いた場合と別のエキスを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、少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