

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

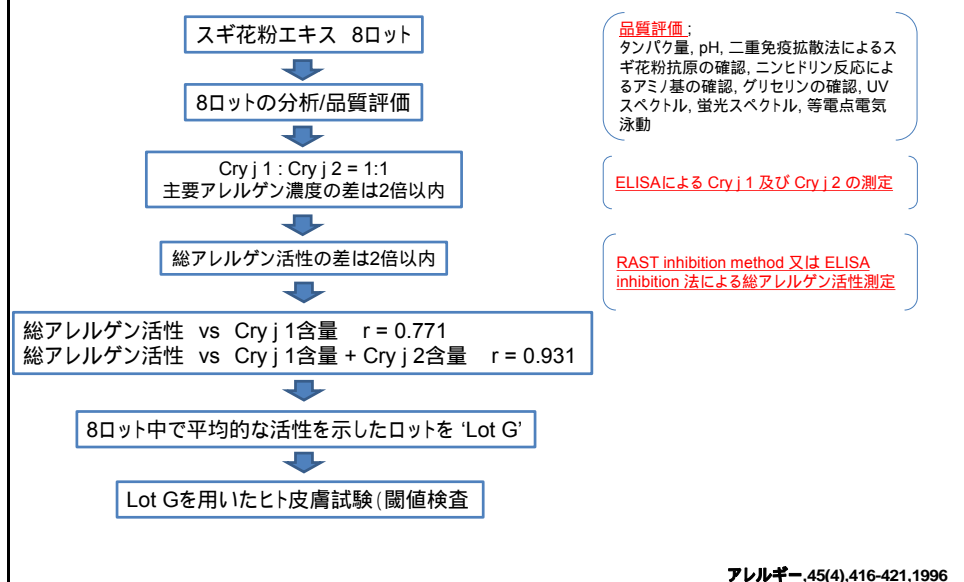
## 研究目的

- 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。

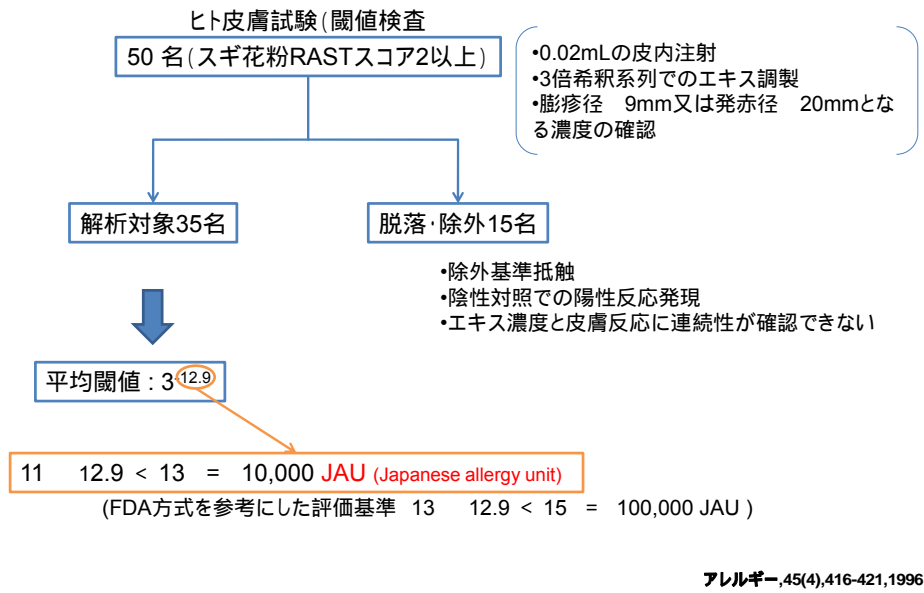
## アレルギーエキスの標準化 基本方針 (日本アレルギー学会)

- 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. 総アレルギー活性方式: 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アレルギーエキス(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。(3<sup>-19</sup>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「診断用アレルギー皮内エキス対照液「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うけたことのある者
  - 重症喘息の者 等

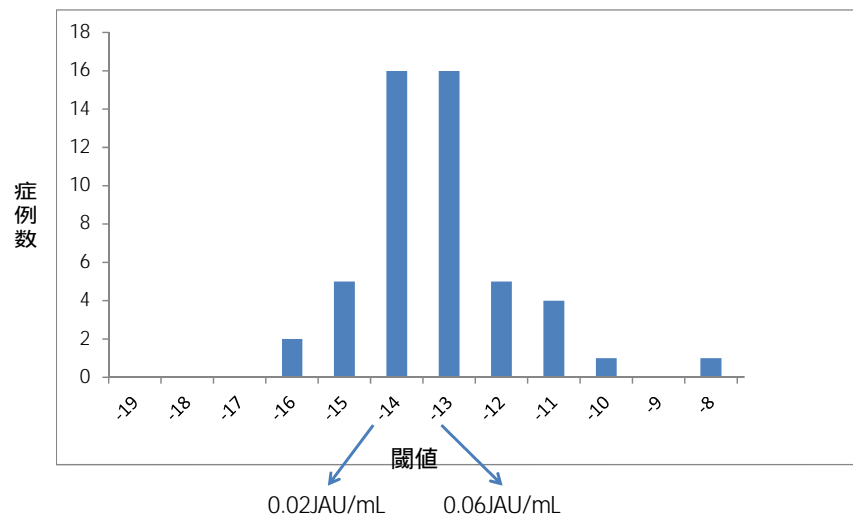
## 標準プール血清の作製

- 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。

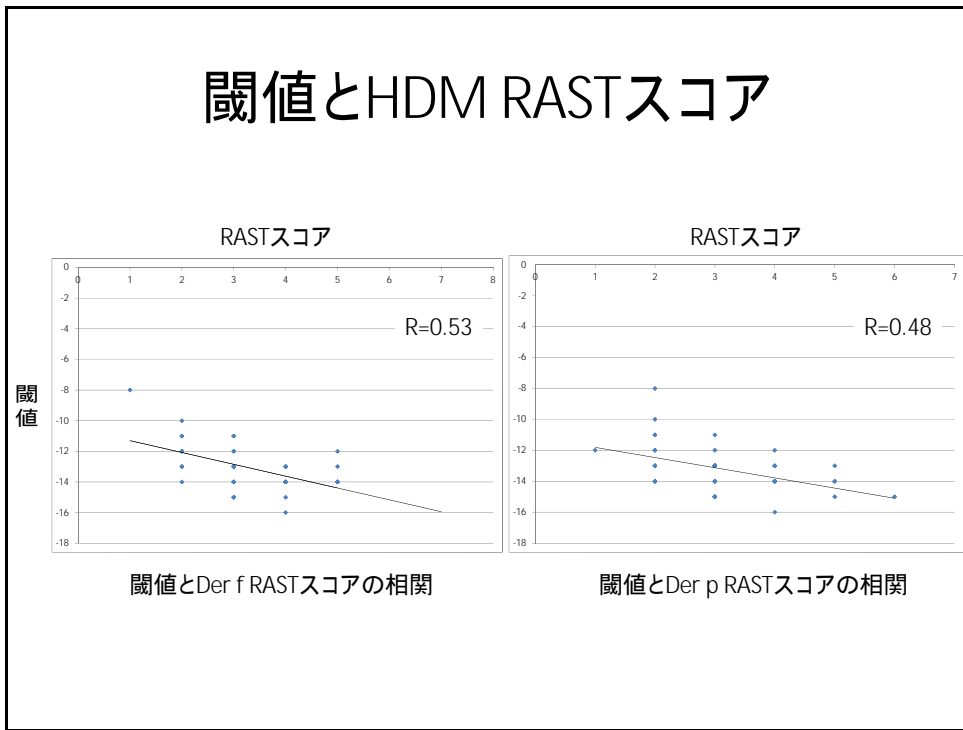
## 試験結果概要

- 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:  $3.31 \pm 1.00$
  - ヤケヒョウヒダニ:  $3.18 \pm 1.03$
- 標準品候補品平均閾値:  $-13.22 \pm 1.43$ 
  - 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
    - $100,000\text{JAU/mL}^{-13.22} = 0.049\text{JAU/mL}$

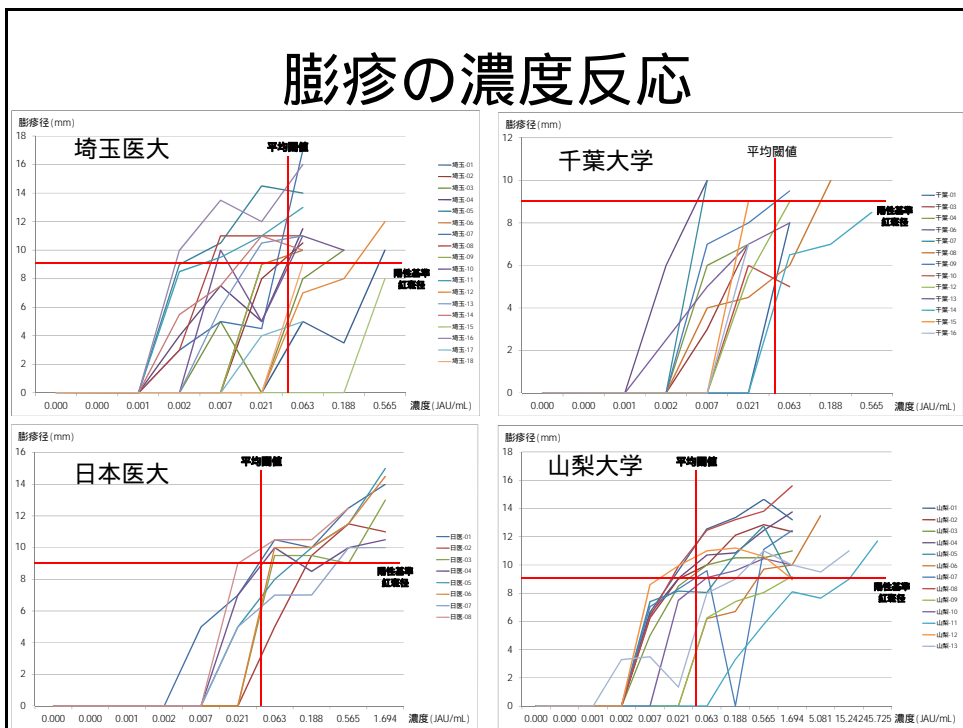
## 閾値度数分布



# 閾値とHDM RASTスコア

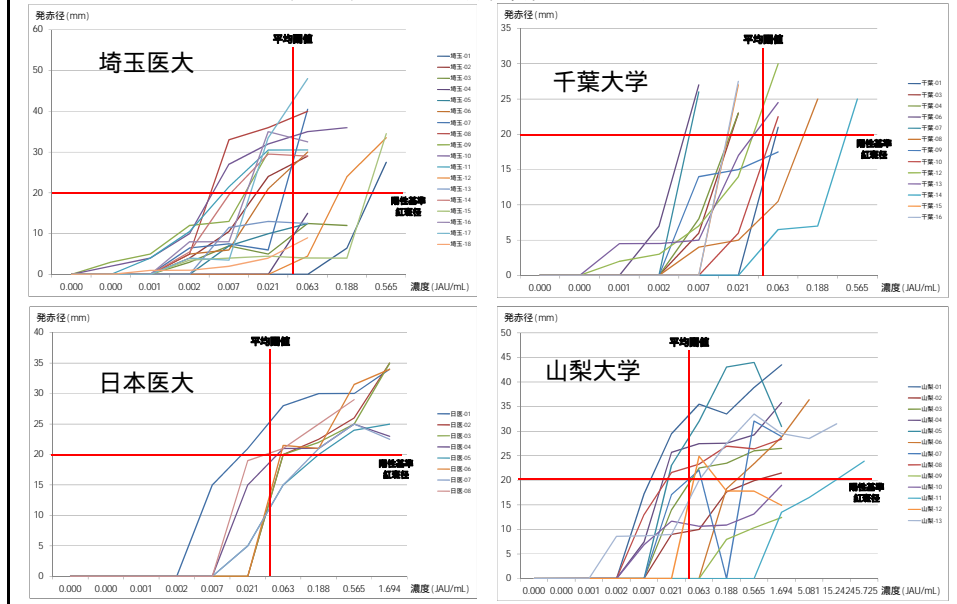


# 膨疹の濃度反応





# 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(総アレルギー活性方式 vs メジャー・アレルギー方式)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・アレルギー方式が利便性に優れる)

ダニのメジャー・アレルギー(グループ1と2の、2グループ)のうち、グループ1アレルギー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アレルギーだけの濃度に基づいたメジャー・アレルギー方式**

# 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

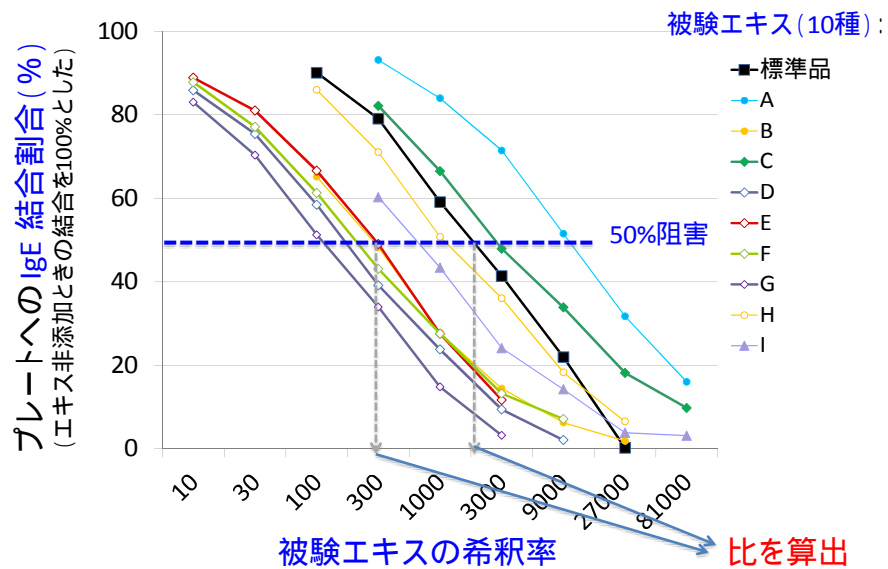
**ダニエキス**: 合計10種類。協力企業2社から標準品を含む複数エキスの提供。  
 FDA標準品はFDAより1種類。他の市販品1種類を購入。  
 Dermatofagoides farine (以下Der f) と D. ptrebyssinus (以下Der p) のエキスを等量混合して試験に用いた。

**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

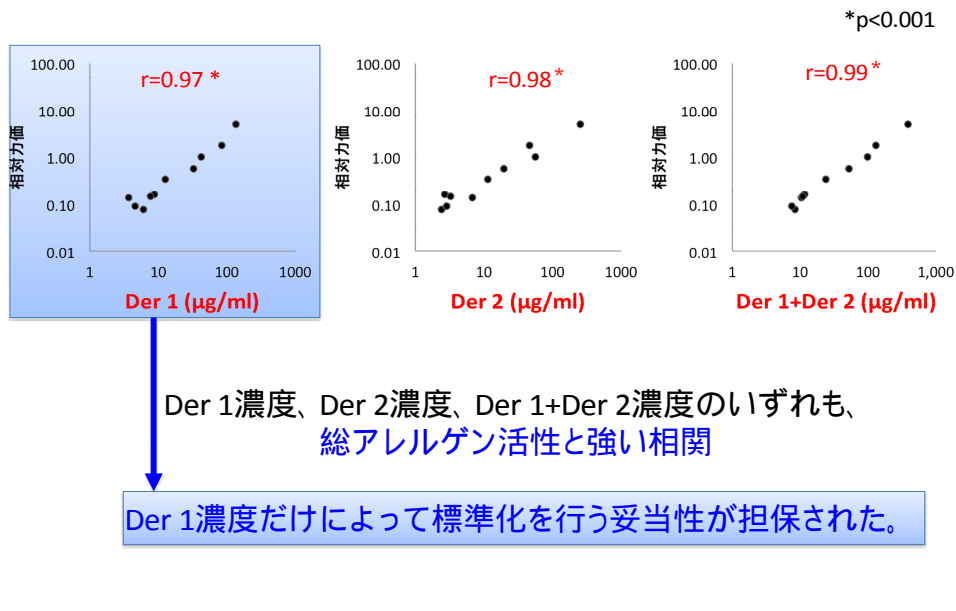
## 標準品とその他のダニエキス9種(計10種)の メジャーアレルゲン量と総アレルゲン活性

	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)



## 結論

標準品ダニエキスのメジャーアレルゲン量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

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  $\mu\text{g}/\text{ml}$ =100,000 JAU

## 結論

### • In vivo試験

標準品候補品平均閾値:  $-13.22 \pm 1.43$

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

### • 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$ =100,000 JAU/ml