

重症アレルギー疾患患者に対する 抗IgE抗体治療のコンパニオン診断薬の開発

岡山吉道¹⁾, 豊島翔太¹⁾, 坂本朋美¹⁾, 高橋恭子²⁾,
葉山惟大¹⁾, 木澤靖夫³⁾, 丸岡秀一郎¹⁾, 權寧博¹⁾

Development of companion diagnostics for treatment of patients with severe allergic diseases with anti-IgE antibody

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Shota TOYOSHIMA¹⁾, Tomomi SAKAMOTO¹⁾, Kyoko TAKAHASHI²⁾,
Koremasa HAYAMA¹⁾, Yasuo KIZAWA³⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾

要旨

重症喘息, 重症慢性特発性蕁麻疹および重症花粉症患者に対してomalizumabがわが国で使用されているが, 投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerは存在せず年余に渡り投与されている。既に私達は, omalizumabの投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerであるfree IgE値の測定系を実験室レベルで確立しており, 今回さらに感度が5倍高く安定した測定系(コンパニオン診断薬)を確立させた。今後omalizumabによる治療効果と治療後の血清free IgE値との関係を明らかにすることによって治療効果が有効となるfree IgE値が明らかとなり重症喘息, 重症慢性特発性蕁麻疹および重症花粉症患者へのomalizumab投与量を減らすことができ, 患者の負担額と副作用の頻度が減少できると思われる。

1. はじめに

我が国の全喘息患者(300万人)のなかで高容量吸入ステロイド薬と長時間作用性β刺激薬等の長期管理薬の併用でも効果不十分な難治性喘息は, 約34~35万人いる。この患者の治療費は全喘息患者の治療費の七割を占めているため難治性喘息患者の医療費の削減が喫緊の課題である。難治性喘息患者の治療薬として使用されているヒト化抗IgE抗体(omalizumab)は, 日本での売上額は50億円であり, 患者の1カ月の医療費は30万円にもおよび, 投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerは存在せず年余に渡り投与されている。従って副作用の頻度も上昇する。さらに, 我が国で慢性特発性蕁麻疹と診断された患者の中で重症患者は5~6万人と推定されており, omalizumabは重症患者に適応があり, その患者の約7000人に年余に渡り投与されており, その減薬方法は確立されていない。我が国にて2019

年秋にomalizumabは, 既存薬で効果が不十分な重症花粉症の適応となり, その患者数は国内に200~300万人いると推定されている。既に私達は, omalizumabの投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerであるfree IgE値の測定系を実験室レベルで確立しており¹⁾, 今回さらに感度が高く安定した測定系(コンパニオン診断薬)を確立させた。

2. 対象及び方法

2-1 倫理的配慮

日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会に小臨床試験の新規申請をし, 承諾を得た(RK-150908-12)。

2-2 対象

現在, 日本大学医学部附属板橋病院皮膚科外来に通院中でomalizumab治療中の重症慢性特発性蕁麻疹

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

3) 日本大学薬学部

岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

疹患者28名および健常人4名を対象とした。末梢血2 ml をomalizumab投与前後の2回採血させていただいた。

2-3 free IgE 測定ELISAの最適化

2-3-1 プレートに固定化するリコンビナント可溶性FcεRIα鎖濃度の最適化

- (1) リコンビナント可溶性FcεRIα鎖をプレートに固定化するが、種々濃度のリコンビナント可溶性FcεRIα鎖 (0.03 ~ 0.50 μg/well) を含むコーティングバッファーを調製した。リコンビナント可溶性FcεRIα鎖は、CHO細胞にFcεRIα鎖を強制発現させて、その細胞上清をconcentratorにより濃縮後、抗FcεRIα鎖抗体 (clone CRA1) とaffinity columnを用いて精製した。ウエスタンブロットング法で精製を確認した²⁾。
- (2) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

2-3-2 ブロッキングバッファーの最適化

- (1) 種々のブロッキング溶液 (種々の濃度のFBS/PBS, BSA/PBSなど) を調製した。
- (2) それぞれ等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

2-3-3 サンプル濃度の最適化

- (1) サンプルのマトリックスに極力近い標準希釈液を調製した。
- (2) それぞれ等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (3) 標準曲線で適切なダイナミックレンジを確認し、サンプルの希釈直線を確認した。
- (4) スパイク回復または希釈直線試験を行った。マトリックス効果を示す干渉物質の除去を行った。

2-3-4 検出抗体濃度と酵素複合体の最適化

- (1) 種々の濃度の検出抗体 (種々のcloneやpolyclonalのHRP標識抗IgE抗体) を含む標準希釈液を調製した。各基質に対する濃度範囲内の濃度に設定した。各種酵素複合体結合抗IgE

抗体としてclone 4F4, clone 1A2, clone 4C3, clone M94176, polyclonal抗体を用いた。

- (2) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

2-3-5 シグナル検出と希釈標準液の最適化

- (1) サンプル中の抗原想定量や、使用機器による抗原検出能力に基づいて、基質を選択した。
- (2) 作業溶液をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (3) 抗原が全ダイナミックレンジにわたり確実に検出可能か検討した。
- (4) 種々濃度の酵素複合体を含む標準希釈液を調製した。各基質に対する濃度範囲に対応した濃度に設定した。
- (5) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (6) シグナルとバックグラウンドを確認した。

2-4 ELISAの分析法バリデーション

最適化したELISAの分析法バリデーションを評価した。分析法バリデーション試験は以下の省令やガイダンスに従った。

- ・厚生省令第21号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」(平成9年3月26日、一部改正 厚生労働省令第114号 平成20年6月13日) 準用
- ・「トキシコキネティクス (毒性試験における全身的曝露の評価) に関するガイダンスについて (平成8年7月2日薬審第443号)」準拠

以下の項目について評価した。

2-4-1 検量線の作製

2-4-2 定量下限の決定

2-4-3 日内・日差再現性

2-4-4 感度

3. 結果

3-1 ELISAの最適化

3-1-1 プレートに固定化するリコンビナント可溶性FcεRIα鎖濃度の最適化

リコンビナント可溶性FcεRIα鎖の至適濃度は0.50 μg/well (PBSで希釈)であった。至適インキュベーション温度と時間は、4℃にて16時間であった。

3-1-2 ブロッキングバッファの最適化

ブロッキングバッファの最適条件は、PBS/0.5% Casein, Wash Bufferは、PBS/0.05% Tween-20と決定した。至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて16時間であった。

3-1-3 サンプル濃度の最適化

血清をSample Diluent (PBS/0.05% Tween-20, 0.5% Casein)で希釈し、オマリズマブ投与前は血清を40倍希釈。オマリズマブ投与後は血清を10倍希釈が至適条件であった。至適インキュベーション温度と時間は、4℃にて16時間であった。

3-1-4 検出抗体濃度と酵素複合体の最適化

検出抗体HRP標識マウス抗ヒトIgE抗体をPBS/0.5% Caseinで1/1000に希釈が至適条件と決定した。至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて1時間であった。

3-1-5 シグナル検出と希釈標準液の最適化

TBS (Sera Care, Milford, MA, USA)を用いて至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて30分であった。

3-2 ELISAの分析法バリデーションの評価

3-2-1 検量線の作製

検量線の作製にはヒトIgEを用いた、300 ng/mLから150 ng/mL, 75 ng/mL, 37.5 ng/mL, 18.75 ng/mL, 9.375 ng/mL, 4.688 ng/mL, 2.344 ng/mLと段階希釈して使用した。

3-2-2 定量下限の決定

定量下限は、検量線から2.344 ng/mLと決定した。

sample #	1回目free IgE測定値 (IU/ml)	2回目free IgE測定値 (IU/ml)
N96	102.89732	95.6919546
N99	207.93215	325.946815
N101	41.487436	47.3377897
N102	952.29925	1181.83206

図1 free IgE測定値の再現性

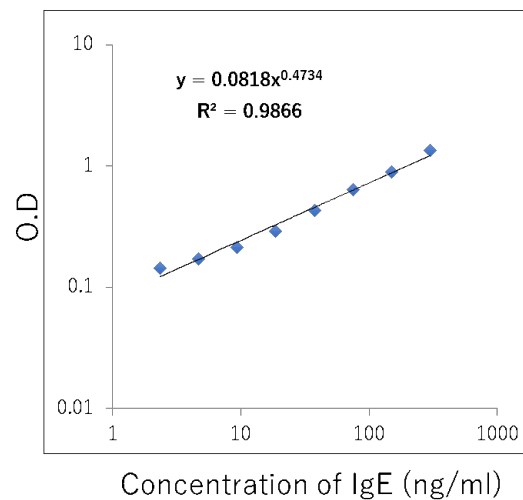


図2 free IgEの検量線

3-2-3 日内・日差再現性

左の表は、1週間の間隔をあけて2回同一のサンプルのfree IgE値 (IU/ml)を測定した結果である。Nはnormal healthy control (健常人)を指す。健常人4名において日差の再現性は確認できた (図1)。

3-2-4 感度

検量線スタンダードの最小値の1/2である1.17 ng/mLを感度とした (図2)。

4. 考察

ヒト化抗IgE抗体 (omalizumab) は、血清中のIgEを捕獲し、さらにマスト細胞や好塩基球の高親和性IgE受容体 (FcεRI) に結合したIgEをも解離させ捕獲することを機序とした抗体療法である³⁾。omalizumabに結合していないfreeのIgEがアレルギー

ギー疾患の病態に関与している^{1,3,4)}、理論的には、このfreeのIgEを0にすればよい訳である。既に私達はこのfreeのIgEの測定系を実験室レベルで確立しており¹⁾、今回、測定感度を5倍まで上げることに成功した。以上より高感度free IgE測定系(コンパニオン診断薬)は、確立できた。

今後ELISAの分析法バリデーションの評価のためにさらに確認アッセイ、抗体価算出、凍結融解安定性および選択性の検討を進める。そして、omalizumabによる治療効果と治療後の血清free IgE値との関係を明らかにする予定である。その結果、このコンパニオン診断薬によって重症喘息、重症慢性特発性蕁麻疹および重症花粉症患者へのomalizumab投与量を減らすことができ、患者の負担額と副作用の頻度が減少する。omalizumabの投与量を漸減あるいは、中止できれば我が国の医療費削減に結び付くと考えている。

5. 結語

高感度free IgE測定系(コンパニオン診断薬)は、確立できた。今後omalizumabによる治療効果と治療後の血清free IgE値との関係を明らかにすること

によって治療効果が有効となるfree IgE値が明らかとなり重症喘息、重症慢性特発性蕁麻疹および重症花粉症患者へのomalizumab投与量を減らすことができ、患者の負担額と副作用の頻度が減少できると思われる。

謝辞

本研究の成果は、令和2年度日本大学学術研究助成金[社会実装]の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

文献

- 1) Ito R, Gon Y, Okayama Y, et. al.: Development of assay for determining free IgE levels in serum from patients treated with omalizumab. *Allergol Int* 2014; 63 (Suppl 1):37-47.
- 2) Ra C, Kuromitsu S, Hirose T, et. al.: Soluble human high-affinity receptor for IgE abrogates the IgE-mediated allergic reaction. *Int Immunol* 1993; 5:47-54.
- 3) Okayama Y, Matsumoto H, Odajima H, et. al.: Roles of omalizumab in various allergic diseases. *Allergol Int* 2020; 69: 167-177.
- 4) Gon Y, Ito R, Maruoka S, et. al.: Long-term course of serum total and free IgE levels in severe asthma patients treated with omalizumab. *Allergol Int* 2018; 67: 283-285.