

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⁾²⁾, 丹羽悠介¹⁾³⁾, 坂本朋美¹⁾²⁾, 高橋恭子⁴⁾,
葉山惟大¹⁾³⁾, 木澤靖夫⁵⁾, 丸岡秀一郎¹⁾⁶⁾, 權寧博¹⁾⁶⁾

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

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾²⁾, Yusuke NIWA¹⁾³⁾, Tomomi SAKAMOTO¹⁾²⁾, Kyoko TAKAHASHI⁴⁾,
Koremasa HAYAMA¹⁾³⁾, Yasuo KIZAWA⁵⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾⁶⁾, Yasuhiro GON¹⁾⁶⁾

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、投与の適応を決めるbiomarkerや投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerは、はっきりしていない。既に私達は、omalizumabの投与中の薬剤効果の目安となる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。omalizumabによる慢性特発性蕁麻疹の治療適応となるのは治療前のfree IgE値が368.6 ng/mL以上であることを見出した。さらにアレルギー性気管支喘息患者とは異なりomalizumab治療後の血清free IgE値が0に近くとも治療効果が見られない症例群が存在し、それら慢性特発性蕁麻疹患者群の病態にはIgEが関与していないことが示唆された。

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。難治性アレルギー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の投与中の薬剤効果の目安となる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、治療効果とfree IgE値との関係を調べた。

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-

1) 日本大学医学部附属板橋病院アレルギーセンター
2) 日本大学医学部医学教育学分野
3) 日本大学医学部皮膚科学分野
4) 日本大学生物資源科学部
5) 日本大学薬学部
6) 日本大学医学部呼吸器内科学分野
岡山吉道：okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

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 治療予定の重症慢性特発性蕁麻疹患者61名および健常人4名を対象とした。末梢血 2ml 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。ウエスタンブロッティ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ドランスに従った。

- ・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) に関するガイドランスについて (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 日差再現性

2.4.4 感度

2.4.5 確認アッセイ

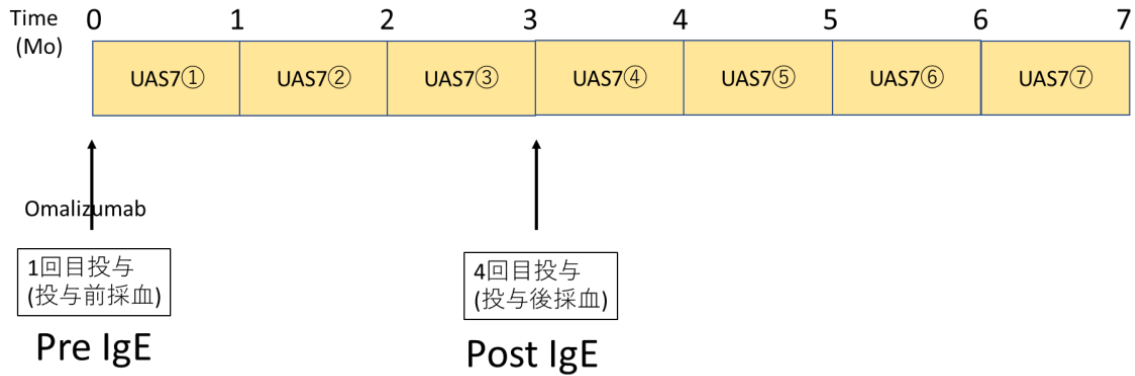


図1 採血のタイミングとomalizumab 治療プロトコール

2.5 omalizumab 投与前後の free IgE 値と total IgE 値と omalizumab 治療効果の関連に関する解析

2.5.1 採血のタイミングと omalizumab 治療プロトコール

前述の如く、omalizumab 治療予定の重症慢性特発性蕁麻疹患者61名の末梢血 2ml を omalizumab 投与前後の 2 回採血させていただいた。1 回目は投与前、2 回目は 4 回目投与时、すなわち 1 回目投与 3 か月後とした (図1)。omalizumab は 1 か月間隔で 300 mg を皮下注した。

2.5.2 omalizumab 治療効果判定方法

UAS7 を用いた。omalizumab 投与間隔 1 か月間の平均 UAS7 で評価した。図1のようにそれぞれ UAS7 ①、UAS7 ② から UAS7 ⑦ と記載した。平均 UAS7 が 6 以下を responder, 6 より大きい場合を non-responder と定義した。

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ーの最適化

ブロッキングバッファーの最適条件は、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 (図2)。

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。

3.2.3 free IgE 測定値の日差再現性

表 1 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

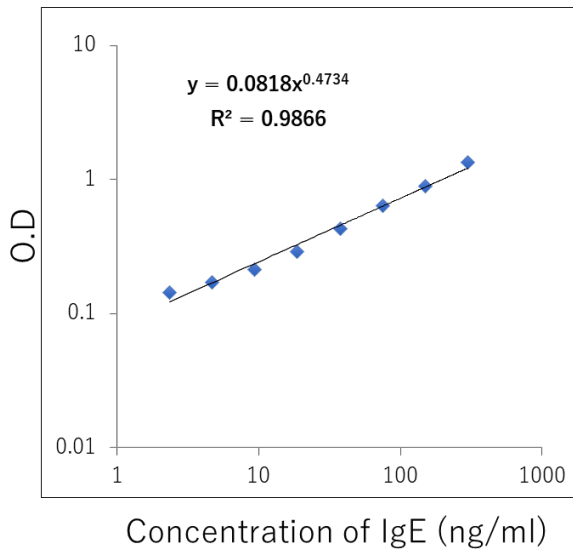


図2 free IgE ELISAの検量線

表1 free IgE 測定値の日差再現性

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

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。

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。

3.2.5 確認アッセイ

omalizumab投与前の慢性特発性蕁麻疹患者のfree IgE値 (pre free IgE) は、血清IgE値に相当するので受託臨床検査会社であるエスアールエル株式会社 (SRL) に外注しその測定値 (pre total IgE) と比較したところ、図3の如く相関係数は0.8198であった。

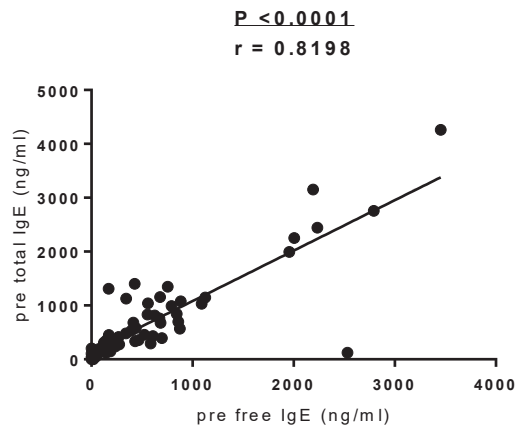


図3 pre free IgE 値とpre total IgE 値の相関

3.3 omalizumab投与前のfree IgE値 (pre free IgE) とtotal IgE値 (pre total IgE) とomalizumab治療効果の関連に関する解析

omalizumab投与前1か月間の平均UAS7で評価した。図1のようにそれぞれUAS7①, UAS7②からUAS7⑦と記載した。平均UAS7が6以下をresponder, 6より大きい場合をnon-responderとし, responderとnon-responderの2群間においてfree IgE値とtotal IgE値に有意差があるかどうか評価した。図4のようにpre free IgEはpre total IgEと比較してより早期にomalizumabの有効性を評価できた。図4cのresponderとnon-responderのデータからROC曲線を作成しカットオフ値を求めたところ (図5), omalizumabによる慢性特発性蕁麻疹の治療適応となるのは治療前のfree IgE値が368.6 ng/mL以上であった。また, pre free IgEとpre total IgEは両者とも3か月以降のomalizumabの有効性を評価できた。

3.4 post free IgEとpost total IgEの相関関係

post total IgEは, post free IgEとomalizumab-IgEの複合体の和であるので図6の如く, post free IgEが高ければpost total IgEは高くなるが, 相関係数は0.5059であった。

3.5 pre free/total IgEとpost free/total IgEの関係

free IgEはomalizumab治療によって有意に低下し, 一方, total IgEは有意に増加した (図7)。

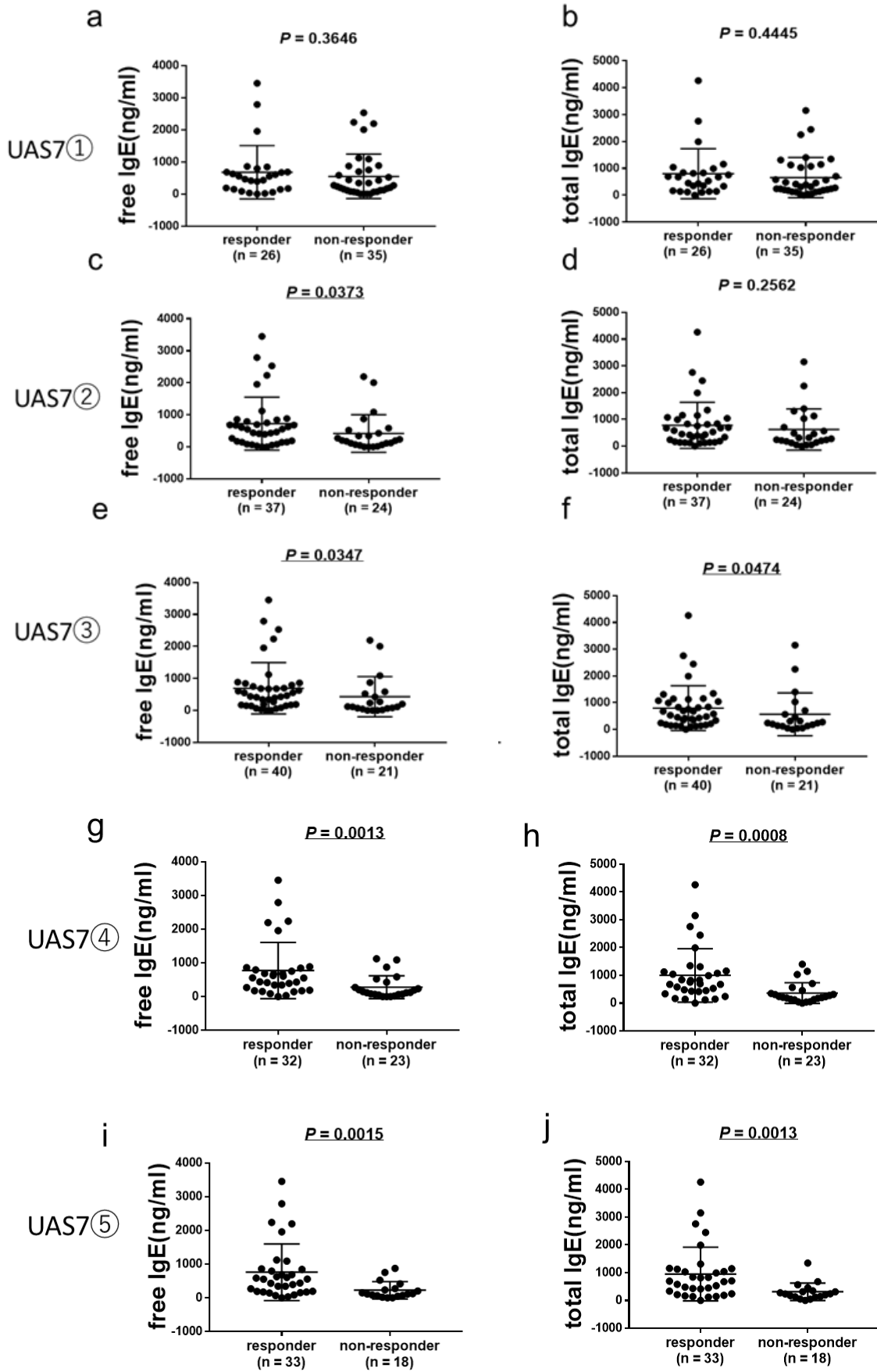


図4 responderとnon-responderの2群間においてfree IgE値とtotal IgE値の比較

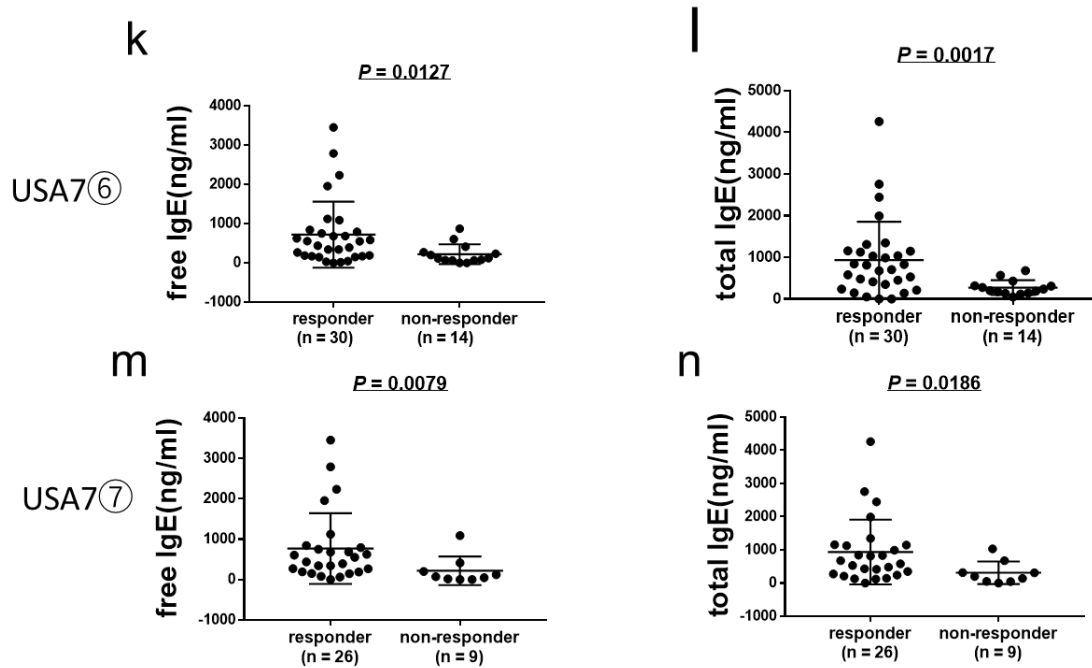


図4 responderとnon-responderの2群間においてfree IgE値とtotal IgE値の比較(続き)

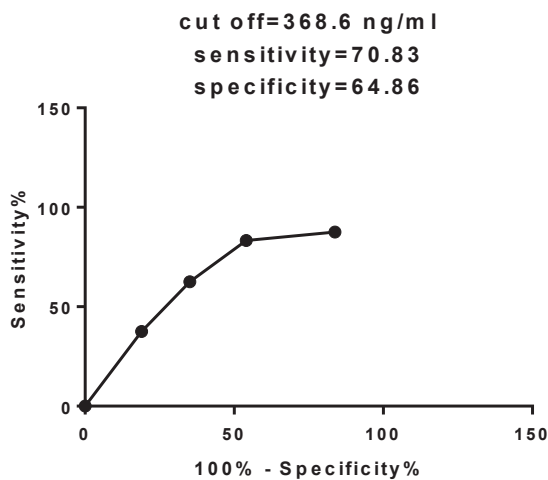


図5 図4cのresponderとnon-responderのデータからROC曲線を作成

3.6 omalizumab投与4か月目以降におけるpost free IgEおよびpost total IgEのnon-responderとresponder間の有意差検定

post free IgEおよびpost total IgEがomalizumab投与4か月目以降における治療効果を判定できるかどうか調べるためにnon-responderとresponderの2群間のpost free IgEおよびpost total IgEを比較解析した。post free IgEはUAS7 ⑦においてnon-responderで有意に低値であった(図8g)。post total IgEは、UAS7 ④と⑦においてnon-responderで有意に低値であった(図8bとg)。したがって、むしろpost free IgEが低いことがomalizumabの治療効果がないことを示す結果となった。

4. 考察

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。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

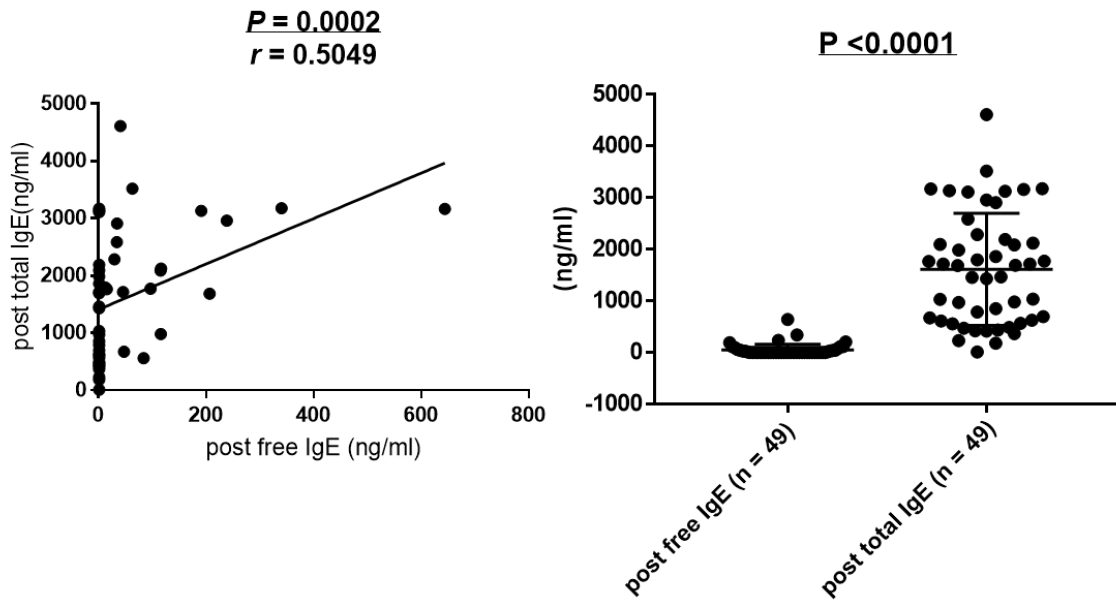


図6 post free IgE と post total IgE の相関関係

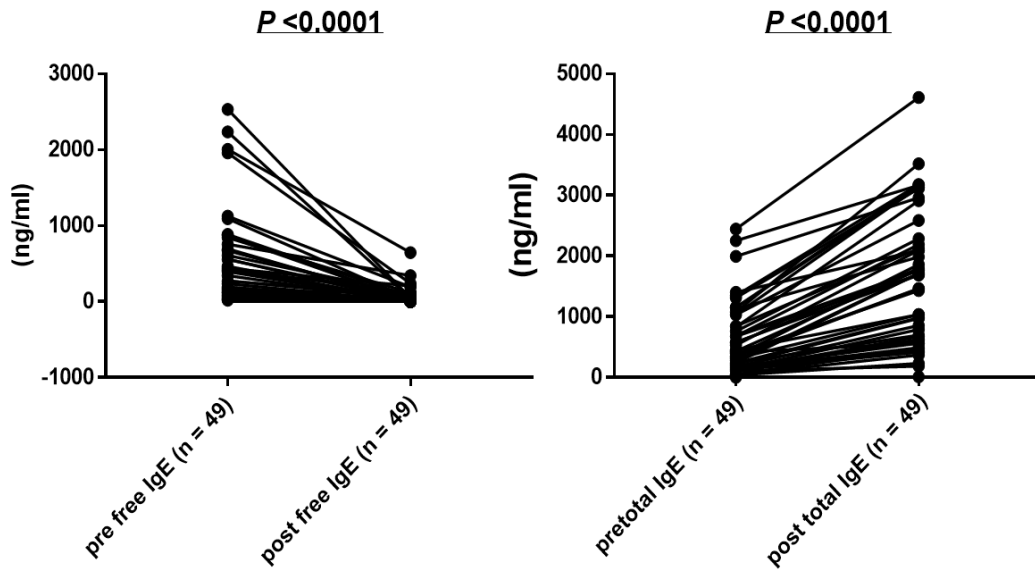


図7 pre free/total IgE と post free/total IgE の関係

していない free の IgE がアレルギー疾患の病態に関与しているので^{1,3,4)} 理論的には、この free の IgE を 0 となれば治療効果がみられるはずである。しかしながら、慢性特発性蕁麻疹においては omalizumab 治療によって free IgE が 0 に近づいても治療効果がない群が存在し、その慢性特発性蕁麻疹患者群の病態には IgE が関与していないことが示唆された。

重症アレルギー性喘息においては、omalizumab

による治療後の血清 free IgE 値が 25 ng/mL 以下になる群が omalizumab の治療効果がみられる群であること⁵⁾ を私達も確認している。⁴⁾ 今後重症アレルギー性喘息患者において 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アレルギー性喘息への omalizumab 投与量を減らすことができ、患者の負担額と副作用の

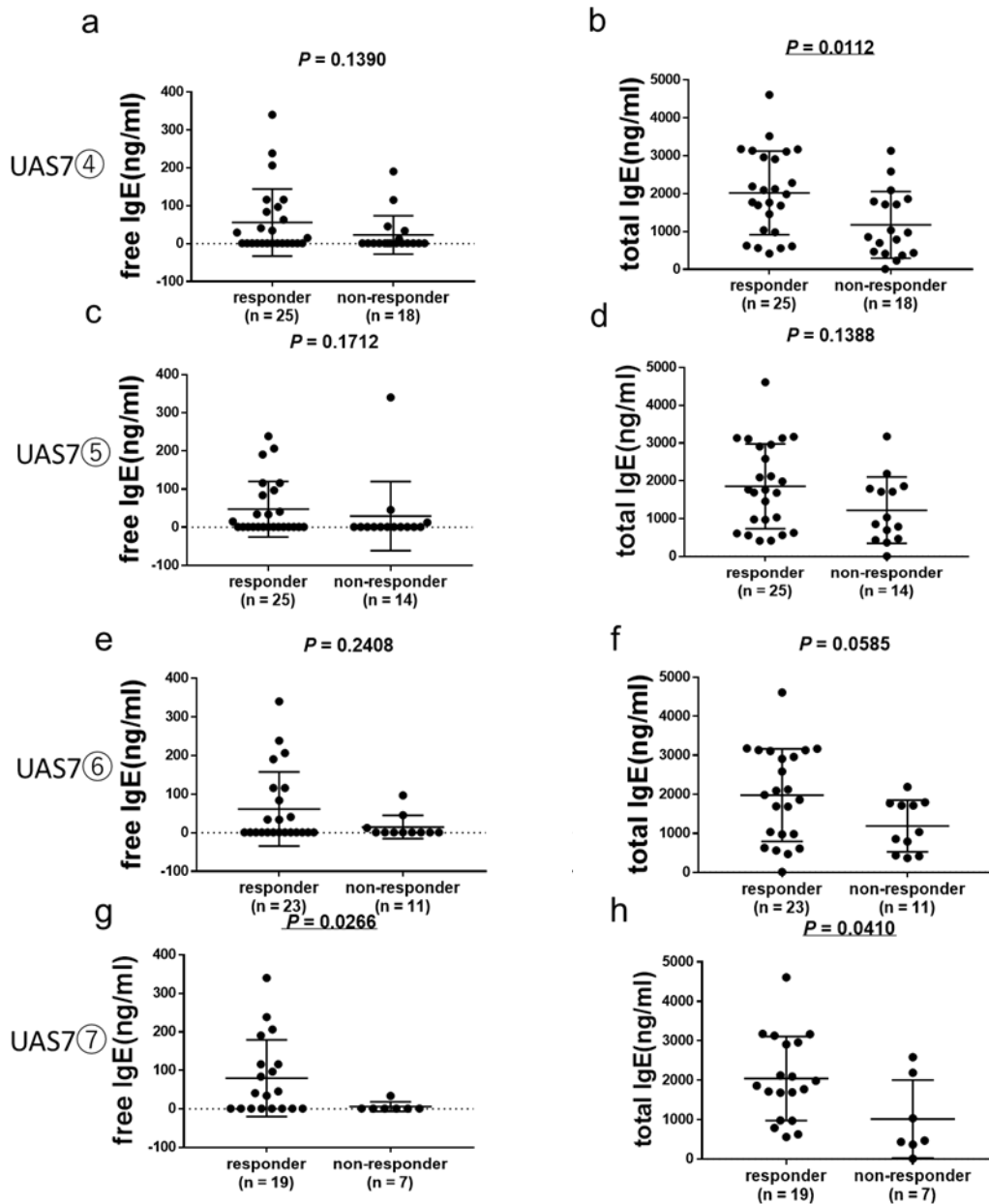


図 8 omalizumab 投与4か月目以降における post free IgE および post total IgE の non-responder と responder 間の有意差検定

頻度が減少できると思われる。

今回の私達の慢性特発性蕁麻疹患者での結果では、このコンパニオン診断薬によって慢性特発性蕁麻疹に対する omalizumab の早期の治療効果が判定できることが明らかになった。しかしながら慢性特発性蕁麻疹患者においては omalizumab 治療後の free IgE の測定によって omalizumab の投与量を漸減あるいは、中止できるかの判定はできないことが分かった。

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。重症アレルギー性喘息においては治療効果が有効となる free IgE 値が明らかとなり今後重症アレルギー性喘息患者において omalizumab 休薬後の治療効果と omalizumab 休薬前の血清 free IgE 値との関係を明らかにすることによって重症アレルギー性喘息患者への 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

と思われる。慢性特発性蕁麻疹においては、omalizumab治療前のfree IgEを測定することによってomalizumabの治療効果を判定でき、omalizumab以外の治療法を選択することによって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2-3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.
- 5) Odajima H, Ebisawa M, Nagakura T, et al. Omalizumab in Japanese children with severe allergic asthma uncontrolled with standard therapy. *Allergol Int.* 2015; 64: 364-370.