

## 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<sup>1)</sup>, 丹羽悠介<sup>1)</sup>, 葉山惟大<sup>1)</sup>, 丸岡秀一郎<sup>1)</sup>, 木澤靖夫<sup>2)</sup>, 高橋恭子<sup>3)</sup>, 權寧博<sup>1)</sup>

### Development of companion diagnostic medicine for treatment of severe allergic patients with anti-IgE antibody

Yoshimichi OKAYAMA<sup>1)</sup>, Yusuke NIWA<sup>1)</sup>, Koremasa HAYAMA<sup>1)</sup>, Shuichiro MARUOKA<sup>1)</sup>,  
Yasuo KIZAWA<sup>2)</sup>, Kyoko TAKAHASHI<sup>3)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1)</sup>

#### 要旨

慢性特発性蕁麻疹の治療薬であるヒト化抗IgE抗体（オマリズマブ）の投与前に治療効果を予測できる biomarker およびオマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となる biomarker の測定系として free IgE の酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）の測定系を最適化し、感度が 1.17 ng/mL となる臨床検体の測定系が確立できた。オマリズマブ投与前の free IgE の測定はオマリズマブ投与開始 8～12 週間後の治療効果を判定できた。しかしながら、臨床血液検査で測定している血清 IgE 値（オマリズマブと結合した IgE と free IgE の総和: total IgE）においてもオマリズマブ投与前の total IgE の測定はオマリズマブ投与開始 8～12 週間後の治療効果を判定できた。free IgE のカットオフ値は、133.3 ng/ml、感度は、57.1%、特異度は、85%であった。total IgE のカットオフ値は、327.6 ng/ml、感度は、71.4%、特異度は、72.5%であった。free IgE 値が 133.3 ng/ml 以上でオマリズマブの治療効果が得られることが分かった。

#### 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（オマリズマブ）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、オマリズマブ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。我が国にてオマリズマブは、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、オマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となる biomarker の測定系を実験室レベルで確立しており<sup>1)</sup>、これはオマリズマブと結合していないIgE（free IgE）の測定系である。オマリズマブと結合したIgEは、マスト細胞や好塩基球を活性化できないが、free IgEはこれら細胞に結合し抗原に結合するとこれら細胞を活性化させる。臨床血液検査で測定している血清IgE値はオマリズマブと結合したIgEとfree IgEの総和である。今回さらに感度が高く安定したfree IgEの測定系（コンパニオン診断薬）を確立させ、free IgEが、

1) 日本大学医学部

2) 日本大学薬学部

3) 日本大学生物資源科学部

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

慢性特発性蕁麻疹の治療薬であるオマリズマブの投与前に治療効果を予測できるbiomarkerとなりうるかどうかを判定することを本研究課題の目的とする。

## 2. 対象及び方法

### 1. free IgE測定のための私達が実験室レベルで確立した酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) <sup>1)</sup> の最適化

#### 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

(1) リコンビナント可溶性FcεRIα鎖をプレートに固定化する際、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 (WB) で精製を確認した。

(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。

#### 1-2. 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) 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。

#### 1-3. 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。

#### 1-4. 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poly-

clonal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。

#### 1-5. シグナル検出の最適化

(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。

#### 1-6. 希釈標準液の最適化

(1) 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。

(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. free IgE測定系のバリデーションの評価

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、承認を得た (RK-150908-12)

重症慢性特発性蕁麻疹患者の血清を用いて開発した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。

1) 検量線の作製

2) 定量下限の決定

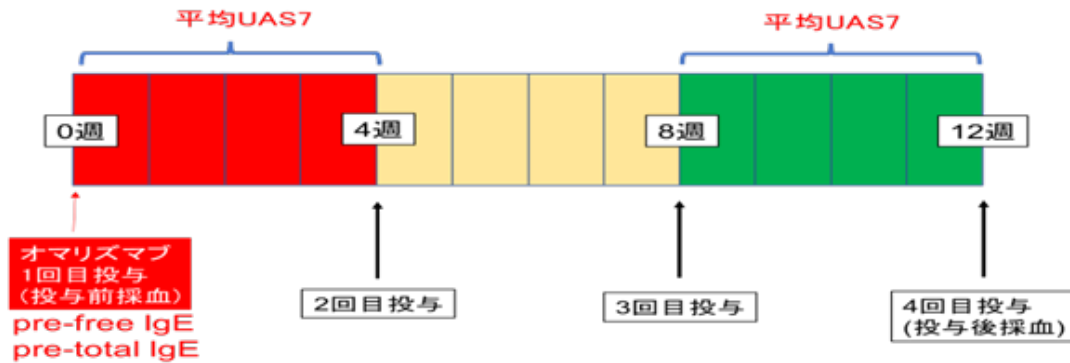


図1 臨床研究プロトコール

- 3) 日差再現性
- 4) 感度
- 5) 確認アッセイ
- 6) 抗体価算出

### 3. オマリズマブ投与前のfree IgE値 (pre-free IgE) とtotal IgE値 (pre-total IgE) とオマリズマブ治療効果の関連に関する解析

当該研究は、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臨床試験の申請をし、承認を得た (RK-150908-12) 図1のようにオマリズマブ1回目投与前に採血し、pre-free IgEとpre-total IgEを測定した。オマリズマブ2回目投与までの4週間のUAS7の平均値とオマリズマブ投与3回目から4回目までのUAS7の平均値を用いて治療効果を判定した。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pre-free IgE値とpre-total IgE値に有意差があるかどうか評価した。

## 3. 結果

### 1. 私達が実験室レベルで確立したfree IgEの酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) <sup>1)</sup> の最適化

#### 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。

#### 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。

#### 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。

#### 1-4. 検出抗体濃度と酵素複合体の最適化

検出抗体は、HRP標識マウス抗ヒトIgE抗体clone M94176 (Fitzgerald Industries International, North Acton, MA, USA) と決定し、検出抗体を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。

#### 1-5. および6. シグナル検出の最適化および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。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。

### 2. free IgE測定系のバリデーションの評価

#### 1) 検量線の作製

検量線の作製にはimmunoCAP 総IgE (#10-9387-10 ファディア社) を用いた。300 ng/mLから150 ng/mL, 75 ng/mL, 37.5 ng/mL, 18.75 ng/mL,

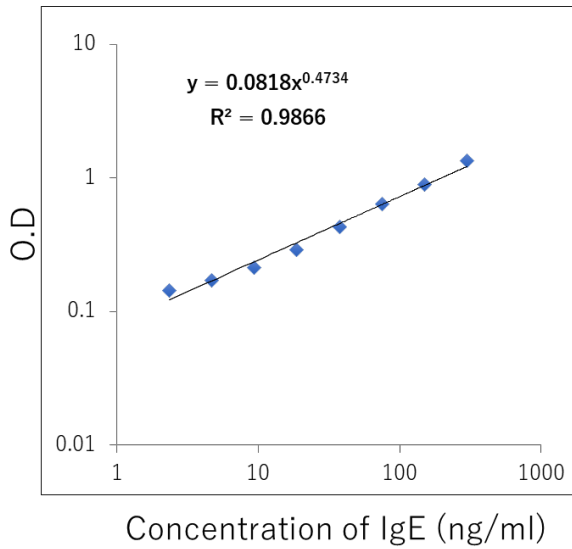


図2 free IgE ELISAの検量線

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) Human myeloma IgE (Meck Millipore, Darmstadt, Germany) を検量線の作製に用いた場合に比較してimmunoCAP 総IgE (#10-9387-10 ファディア社)の方が感度がよかった。

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) 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はnormal healthy control (健康人) を指す。健康人4名において日差の再現性は確認できた。

4) 感度

Human myeloma IgE (Meck Millipore, Darmstadt, Germany) を検量線の作製に用いた場合に比較してimmunoCAP 総IgE (#10-9387-10 ファディア社)の方が感度がよかった。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。

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。

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

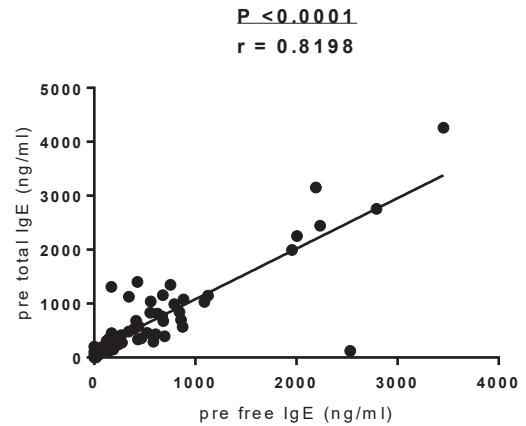


図3 pre free IgE 値とpre total IgE 値の相関

6) 抗体価算出

3.4 ng/mLは1 IU/mLに相当し抗体価はIU/mLで表した。

7) 凍結融解安定性

表2の如く、凍結サンプルと凍結融解を繰り返したサンプルでは測定値に大きな差が認められ、測定には-20℃以下で凍結保存したサンプルでなければならないことが明らかとなった。

表2 凍結融解安定性

サンプル番号	濃度(IU/ml) 凍結サンプル	濃度(IU/ml) 凍結融解サンプル
C197	367.422291	176.426263
C208	260.443437	120.592118
C216	571.457588	104.143648
C226	142.474057	69.7607231
C242	172.595234	74.6027514

3. オマリズマブ投与前のfree IgE値 (pre-free IgE) とtotal IgE値 (pre-total IgE) とオマリズマブ治療効果の関連に関する解析

その結果, 図4に示すように投与開始0~4週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderではpre-free IgE値, pre-total IgE値は有意差がなかった。

次に図5に示すようにオマリズマブ投与開始8~

12週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderの2群間でのpre-free IgE値, pre-total IgE値の有意差検定を行った。

オマリズマブ投与開始8~12週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderの2群間でのpre-free IgE値, pre-total IgE値は両者ともresponder群で有意に高かった。pre-free IgEのカットオフ値は, 133.3 ng/ml, 感度は, 57.1%, 特異度は, 85%

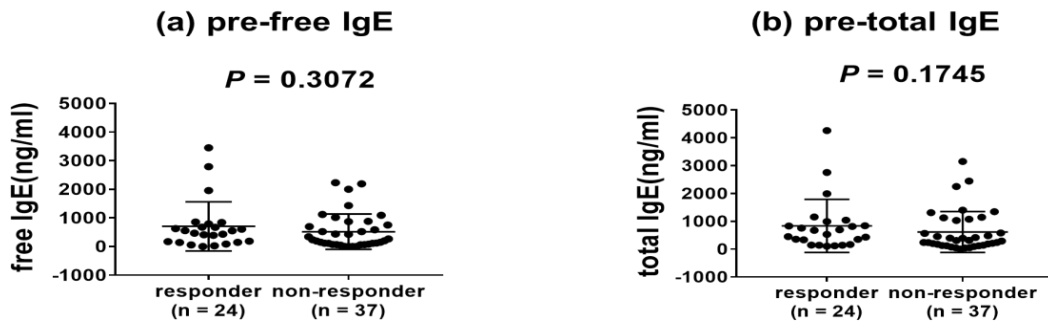


図4 オマリズマブ投与開始0~4週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderの2群間でのpre-free IgE値, pre-total IgE値の有意差検定

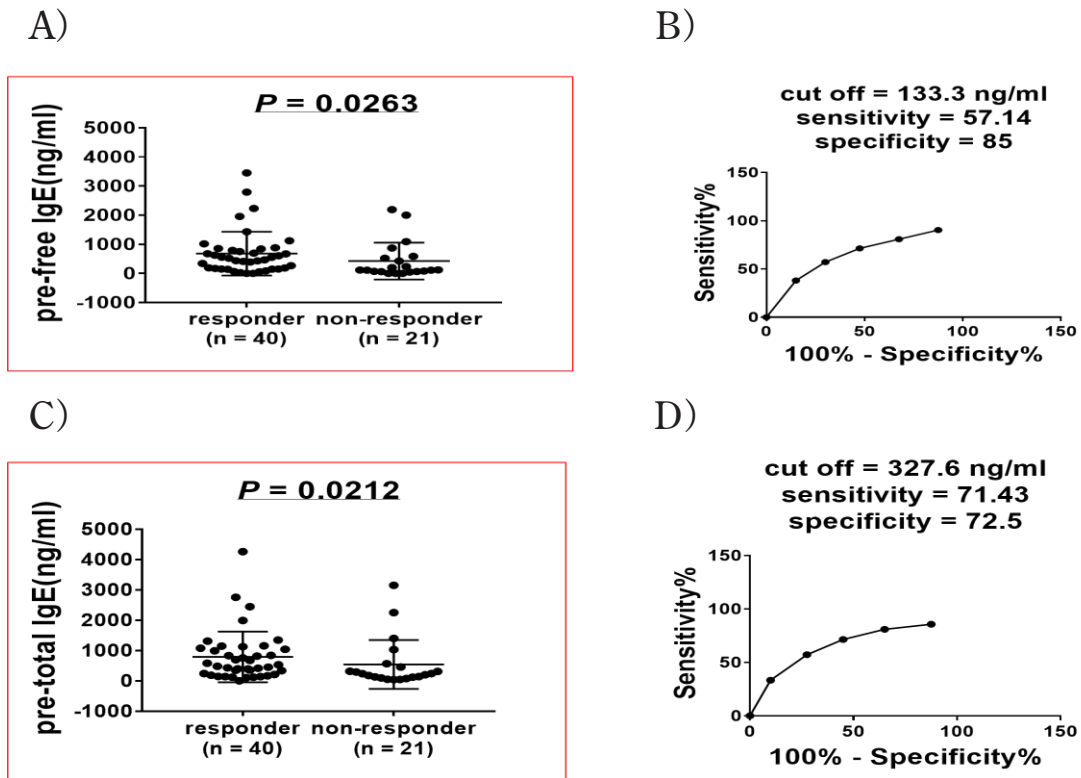


図5 オマリズマブ投与開始8~12週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderの2群間でのpre-free IgE値, pre-total IgE値の有意差検定(それぞれAとC)およびそれぞれのカットオフ値, 感度と特異度(それぞれBとD)

であった。pre-total IgEのカットオフ値は、327.6 ng/ml, 感度は、71.4%, 特異度は、72.5%であった。

#### 4. 考 察

慢性特発性蕁麻疹の治療薬であるオマリズマブの投与前に治療効果を予測できるbiomarkerおよびオマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerの測定系としてfree IgEの酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) の測定系を最適化し、感度が1.17 ng/mLとなり、この感度は臨床検体の測定に十分使える系が確立できたとと言える。

free IgEが、慢性特発性蕁麻疹の治療薬であるオマリズマブの投与前に治療効果を予測できるbiomarkerとなりうるかどうかを判定するためにオマリズマブ投与前のfree IgEの測定し、オマリズマブ投与開始0～4週間および8～12週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderの2群間で有意差検定を行ったがオマリズマブ投与開始0～4週間後では有意差は認められなかったが、オマリズマブ投与開始8～12週間後の治療効果は予測できた。しかしながら臨床血液検査で測定している血清IgE値 (total IgE) においてもオマリズマブ投与前のtotal IgEの測定はオマリズマブ投与開始8～12週間後の治療効果を判定できた。この結果はChuangらの報告<sup>2)</sup>と合致していた。pre-free IgEのカットオフ値は、133.3 ng/ml, 感度は、57.1%, 特異度は、85%であった。すなわちpre-free IgE値が133.3 ng/ml以上でオマリズマブの治療効果が得られることが分かった。pre-total IgEのカットオフ値は、327.6 ng/ml, 感度は、71.4%, 特異度は、72.5%であった。従ってpre-free IgEのカットオフ値はpre-total IgEのカットオフ値より特異度は高かったが感度は低く、慢性特発性蕁麻疹に対してオマリズマブの治療効果を判定するbiomarkerとしてpre-free IgEがpre-total IgEに勝るものではなかった。現在オマリズマブ投与3回目の際に採血しpost-free IgEとpost-total IgEを測定しオマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerとなるかを検討中である。

#### 5. 結 語

慢性特発性蕁麻疹の治療薬であるオマリズマブの投与前に治療効果を予測できるbiomarkerおよびオマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となるbio-

markerの測定系としてfree IgEの酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) の測定系を最適化し、感度が1.17 ng/mLとなる臨床検体の測定系が確立できた。しかしながら、慢性特発性蕁麻疹に対してオマリズマブの治療効果を判定するbiomarkerとしてpre-free IgEがpre-total IgEに勝るものではなかった。

#### 謝辞

本研究の成果は、令和4-5年度日本大学学術研究助成金 [社会実装研究] 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) Chuang KW, Hsu CY, Huang SW, Chang HC. Association Between Serum Total IgE Levels and Clinical Response to Omalizumab for Chronic Spontaneous Urticaria: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2023;11 (8) :2382-2389.