

The Allergen: Sources, Extracts, and Molecules for Diagnosis of Allergic Disease

Richard E. Goodman, P

J Allergy Clin Immunol Pract 2020;8:2506-14

Allergenic source materials include pollen, molds, animal dander, and insects; food allergens from nuts, grains, and animals; venoms; and salivary proteins from insects and ticks. Clinical diagnostic tests have used heterogeneous extracts from allergen source materials for skin prick tests (SPTs). In vitro laboratory methods using immunoassays or microarrays can detect serum IgE directed against allergenic proteins where clinical testing may not be suitable. Clinicians rely primarily on licensed commercial extracts of allergens for SPTs. Manufacturers and regulatory agencies have standardized selected extracts for identity, composition, and potency. Allergen sources contain multiple proteins. The IgE antibody responses to these proteins vary between allergic subjects as does the quantity of specific IgE. Component-resolved molecular diagnostics can be used to improve the specificity of allergy testing and resolve clinical cross-reactivities that may affect treatment outcomes. This clinical commentary will review methods for the production, evaluation, and standardization of allergen extracts

from the perspective of diagnostic testing that may be useful for allergists in practice. 2020 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (J Allergy Clin Immunol Pract 2020;8:2506-14)

アレルギーの原料には、花粉、カビ、動物の皮屑、昆虫などがあります。ナッツ、穀物、動物からの食物アレルギー;毒;昆虫やマダニからの唾液タンパク質。臨床診断テストでは、皮膚プリックテスト (SPT) にアレルギー原料からの不均一な抽出物を使用している。免疫アッセイまたはマイクロアレイを使用する invitro 検査法は、臨床試験が適切でない可能性があるアレルギータンパク質に対する血清 IgE を検出できる。臨床医は主に、SPT用のアレルギーの認可された市販の抽出物に依存しています。製造業者と規制当局は、アイデンティティ、組成、および効力について選択された抽出物を標準化している。アレルギー源には複数のタンパク質が含まれている。これらのタンパク質に対する IgE 抗体の反応は、特定の IgE の量と同様に、アレルギーのある被験者によって異なる。コンポーネント分解分子診断は、アレルギー検査の特異性を改善し、治療結果に影響を与える可能性のある臨床的交差反応性を解決するために使用できる。この臨床解説では、実際のアレルギー専門医に役立つ可能性のある診断テストの観点から、アレルギー抽出物の製造、評価、および標準化の方法を確認する。 2020 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (J Allergy Clin Immunol Pract 2020; 8 : 2506-14)

There has been marked evolution in the manufacture and use of allergenic materials as in vivo diagnostic reagents since 1873, when Charles Blackley determined that grass pollen would elicit hay fever symptoms when applied to his nasal mucosa or conjunctivae.¹ In 1906, von Pirquet coined the term “allergy” to describe the immediate reactions to antigen in the skin.¹ In the 1940s, aqueous extracts of allergenic materials such as short ragweed pollen (*Ambrosia artemisiifolia*) were used in skin testing to diagnose hay fever caused by inhalation of pollen.² The discovery of IgE by the Ishizaka's in 1967 as the mediator of immediate

hypersensitivity responses seen in skin prick tests (SPTs) allowed in vitro tests for measuring IgE antibodies in serum to be developed.³ As allergen extracts became available for a greater number of plant, insect, fungal, and animal species and allergen skin testing grew in popularity among allergists, the purity of the test materials was questioned in relation to accuracy of diagnosis.⁴ This prompted research to identify the relevant allergens from many different sources with the aim of defining the most important, clinically relevant, molecular entities. One outcome of this research was that in many cases selected allergens that bound to serum IgE in >50% of allergic individuals were purified. Specific IgE for these molecules could be used as diagnostic markers for sensitization as an indicator of clinical allergy.

A systematic nomenclature was developed for the identification and naming of allergens, which is maintained by a subcommittee of the International Union of Immunological Societies with the World Health Organization (WHO/IUIS) using a database that is publicly available (www.allergen.org). The committee reviews candidate allergenic proteins that have human serum IgE binding data and assigns the correct nomenclature.⁵ However, names for allergens are often assigned before publication, and a few of the 977 named allergens in the database are not supported by published proof of allergy. The WHO/IUIS database is the primary source for allergen nomenclature. A second allergen database that provides postpublication reviews of data and sequence comparisons is the www.allergenonline.org database of the Food Allergy Research and Resource Program at the University of Nebraska.⁶ It connects the taxonomy of the source and the proteins that are identified as allergens.

This clinical commentary will review biological source materials and established manufacturing methods used to prepare allergenic products for use by allergists in clinical practice. The relative merits of standardized and nonstandardized extracts are

compared together with factors that influence allergenic potency. We overview purified allergen proteins used in component-resolved or molecular diagnostics as new tools for differential allergy diagnosis. Technological advances and quality standards for allergen molecules are reviewed, together with representative examples of the clinical relevance of IgE molecular diagnostics.

チャールズブラックリーがブタクサを鼻粘膜または結膜に適用すると枯草熱（花粉症）の症状を誘発すると決定した 1873 年以来、*in vivo* 診断試薬としてのアレルギー性物質の製造と使用に著しい進化が見られた。1906 年、フォンピルケは皮膚の抗原に対する即時反応を表す「アレルギー」という用語。1940 年代、ブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia*) などのアレルギー性物質の水性抽出物が、花粉の吸入によって引き起こされる枯草熱を診断するための皮膚検査に使用された。1967 年に石坂が皮膚プリックテスト (SPT) で見られる即時過敏反応のメディエーターとして IgE を発見したことにより、血清中の IgE 抗体を測定するための *in vitro* 試験を開発することができた。³ アレルゲン抽出物がより多くの植物で利用できるようになったため、昆虫、真菌、動物種およびアレルゲン皮膚検査はアレルギー専門医の間で人気が高まったが、検査材料の純度に関連して疑問視された。これにより、最も重要で臨床的に関連のある分子実体を定義することを目的として、多くの異なるソースと関連したアレルゲンを特定する研究が促された。この研究の結果の 1 つは、多くの場合、アレルギー患者の 50% 以上で血清 IgE に結合する選択されたアレルゲンが精製されたことである。これらの分子に特異的な IgE は、臨床的アレルギーの指標としての感作の診断マーカーとして使用できる。

アレルゲンの識別と命名のための体系的な命名法が開発されました。これは、国際免疫学会連合と世界保健機関 (WHO / IUIS) の小委員会によって、公開されているデータベース (www.allergen.org) を使用されている。委員会は、ヒト血清 IgE 結合データを持つ候補アレルゲンタンパク質をレビューし、正しい命名法を割り当てた。⁵ ただし、アレルゲンの名前は公開前に割り当てられることが多く、データベース内の 977 個の名前付きアレルゲンのいくつかはアレルギーの証明をなされていません。WHO / IUIS データベースは、アレルゲン命名

法の主要な情報源である。データの公開後のレビューと配列比較を提供する 2 番目のアレルゲンデータベースは、ネブラスカ大学の食物アレルギー研究およびリソースプログラムの www.allergenonline.org データベースである。⁶ これは、ソースの分類とアレルゲンとして同定されたタンパク質とを関連させている。

この臨床解説では、臨床診療でアレルギー専門医が使用するアレルゲン製品を調製するために使用される生物学的原料と確立された製造方法をレビューする。標準化された抽出物と標準化されていない抽出物の相対的なメリットは、アレルゲンの効力に影響を与える要因と比較することである。アレルギー診断のための新しいツールとして、コンポーネントまたは分子診断で使用される精製アレルゲンタンパク質の概要を説明する。アレルゲン分子の技術的進歩と品質基準を、IgE 分子診断の臨床的関連性の代表的な例とともにレビューする

ALLERGENS IN SPECIFIC EXTRACTS

Over more than 40 years, researchers have identified and characterized hundreds of proteins that bind human IgE and, in some cases, cause the degranulation of basophils or skin mast cells. However, the amount and potency of the various allergenic proteins in extracts have not been documented for most allergen extracts. In principle, the potency of a diagnostic allergen extract should reflect its ability to induce degranulation of skin mast cells in allergic individuals. Because allergen extracts are heterogeneous complexes and the allergens recognized by affected individuals may vary, the relevant allergens that need to be measured in an extract are not simple. For those few allergen extracts that are approved as standardized by the US Food and Drug Administration (FDA), relevant allergens or allergen activities are being measured. Short ragweed pollen and perennial ryegrass pollen extracts were standardized by intradermal skin tests using intradermal injections of extracts in subjects with allergy to these pollen species. The technique was developed by scientists at the FDA and Johns Hopkins University.⁷ Allergen extracts in buffered saline with 50% glycerol and at 4C to 8 C maintain their potencies for 3 years.⁸ The first purified protein fraction of a ubiquitous outdoor mold *Alternaria alternata*, previously called *Alternaria tenuis*, was quantitated by a radioallergosorbent test (RAST) inhibition assay using sera from 16 allergic subjects having rhinitis and/or asthma coincidental with the *Alternaria* season.⁹ The serum donors were qualified by a positive skin test, IgE antibody measurement, bronchiolar inhalation tests, and leukocyte histamine release analyses. The RAST inhibition assay has become a model assay for comparing the potency of allergens in the United States. Major and minor allergens of chicken egg white have been determined by similar methods that showed strong reactivity for ovalbumin and ovomucoid and much lower reactivity for lysozyme and conalbumin.¹⁰

特定の抽出物中のアレルゲン

40 年以上にわたって、研究者は、ヒト IgE に結合し、場合によっては好塩基球または皮膚肥満細胞の脱顆粒を引き起こす何百ものタンパク質を特定し、特徴づけてきた。ただし、抽出物中のさまざまなアレルゲンタンパク質の量と効力は、ほとんどのアレルゲン抽出物について公表化されていない。原則として、診断用アレルゲン抽出物の効力は、アレルギー患者の皮膚肥満細胞の脱顆粒を誘発する能力を反映しているはずである。アレルゲン抽出物は不均一な複合体であり、影響を受けた個人によって認識されるアレルゲンは異なる可能性があるため、抽出物で測定する必要がある関連するアレルゲンは単純ではない。米国食品医薬品局 (FDA) によって標準化されていると承認されているいくつかのアレルゲン抽出物について、関連するアレルゲンまたはアレルゲン活性が測定されている。

ブタクサ花粉およびペレニアルライグラス花粉抽出物は、これらの花粉種にアレルギーのある被験者に抽出物の皮内皮膚試験によって標準化された。この技術は、FDA とジョンズホプキンス大学の科学者によって開発された。⁷ 50%グリセロールを含む緩衝生理食塩水中の 4°C から 8°C のアレルゲン抽出物は、3 年間その効力を維

持する 8。

以前は *Alternaria tenuis* と呼ばれていた遍在する屋外のカビ *Alternaria alternata* は、*Alternaria* シーズンと同時期に鼻炎および/または喘息を患っている 16 人のアレルギー患者の血清を使用した放射性アレルギー吸着試験 (RAST) 阻害アッセイによって定量化された 9。 テスト、IgE 抗体測定、気管支吸入テスト、および白血球ヒスタミン放出分析。 RAST 阻害アッセイは、米国におけるアレルゲンの効力を比較するためのモデルアッセイになった。鶏卵白の主要およびマイナーアレルゲンは、オバルブミンおよびオボムコイドに対して強い反応性を示し、リゾチームおよびコンアルブミンに対してはるかに低い反応性を示した同様の方法によって決定された。

NONSTANDARDIZED EXTRACTS

Most extracts used for allergy diagnosis and immunotherapy in the United States are not standardized and do not have potency assignments similar to standardized products. Extracts from common grass pollens, weed pollens, and tree pollens, although nonstandardized, have been licensed and used successfully in skin tests to identify allergic sensitization. Likewise, food extracts have not been standardized. However, cashew nut extracts have been characterized for potency. In clinically defined study subjects, positive SPTs with characterized cashew extract with confirmatory specific IgE determinations were predictive of positive food challenges.¹¹ Tree nut extraction must be optimized for individual species as protein solubility varies especially for walnut and possibly other nuts.

標準化されていない抽出物

米国でアレルギー診断と免疫療法に使用されるほとんどの抽出物は標準化されておらず、標準化された製品と同様の効力はない。一般的な草花粉、雑草花粉、および樹木花粉からの抽出物は、標準化されていないが、認可されており、アレルギー感作を特定するための皮膚テストで普通に使用されている。同様に、食品抽出物も標準化されていない。ただし、カシューナッツ抽出物は効力がある。臨床的に定義された研究対象では、確認用の特定の IgE 測定値で特性化されたカシューナッツ抽出物を含む陽性 SPT は、陽性の食物チャレンジを予測できる。タンパク質の溶解度は特にクルミや他のナッツによって異なるため、木の実の抽出は個々の種に合わせて最適化する必要がある。

INFLUENCE OF CLIMATE CHANGE ON ALLERGENS USE IN DIAGNOSIS

Changing weather patterns involving climate change can modify the expression of some allergenic proteins in pollen. Increasing carbon dioxide and nitric oxide in the atmosphere can increase the expression and abundance of some allergens including Amb a 1 by 1.5% or more and some other allergens in ragweed pollen in controlled studies as well as increased global distribution of the plant itself from North America to Europe and much of Asia.¹²⁻¹⁴ Changing weather and NO in the atmosphere may play important roles in the geographic prevalence of environmental allergies to certain pollens and fungi. Correct diagnosis requires the availability of well-characterized extracts, whether standardized or nonstandardized, and an assessment of the geographical distribution of the allergen species relative to the patient's domicile.¹⁵ The geographical location and movement of people exposes them to different aeroallergens. Thus, the allergist should investigate the history of their patients. For instance, people who live or once lived in areas where birch pollen or alder pollen are common can produce IgE antibodies that can bind to the homologous Gly m 4 protein in soybean, making the diagnosis of soy allergies problematic.¹⁶

アレルギーに対する気候変動の影響

診断での使用

気候変動を伴う気象パターンの変化は、花粉中のいくつかのアレルゲンタンパク質の発現を変化させる可能性がある。大気中の二酸化炭素と一酸化窒素が増えると、一部のアレルゲンの発現と量が増える。対照研究におけるブタクサ花粉中の Amba 1 x 1.5%以上および他のいくつかのアレルゲンは、北米からヨーロッパおよびアジアの大部分への植物の世界的な分布の増加と同様に増加する。12-14 天候の変化および大気中の NO は特定の花粉や菌類に対する環境アレルギーの地理的蔓延において重要な役割を果たす。正しい診断には、標準化されているかどうかにかかわらず、十分に特徴付けられた抽出物の入手可能性、および患者の居住地に対するアレルゲン種の地理的分布の評価が必要である 15。人々の地理的位置と動きは、それらをさまざまな空気アレルゲンにさらす。したがって、アレルギー専門医は患者の病歴を調査する必要がある。たとえば、白樺の花粉やハンノキの花粉が一般的な地域に住んでいる、またはかつて住んでいた人々は、Gly m 4 大豆の相同タンパク質に結合できる IgE 抗体を産生する可能性があり、大豆アレルギーの問題が生じる 16。

How allergen extracts are made

The manufacture of allergen extracts has 3 essential components: source material selection and collection, extraction, and filtration and storage.

アレルギー抽出物の作り方

アレルギー抽出物の製造には、原料の選択と収集、抽出、ろ過と保管という 3 つの重要な要素がある。

Source material selection and collection. Because allergen extracts are essentially unselective aqueous extraction products, the choice and handling of the allergen source material is the single most important step in manufacturing. Source material selection and handling is especially critical for US allergen extracts that are nonstandardized (see below). Important criteria to consider in the selection of source materials include:

ソースマテリアルの選択と収集 アレルギー抽出物は本質的に非選択的な水性抽出製品であるため、アレルギー原料の選択と取り扱いは、製造において最も重要な単一のステップである。標準化されていない米国のアレルギー抽出物では、原料の選択と取り扱いが特に重要である（以下を参照）。ソース資料を選択する際に考慮すべき重要な基準は次のとおりである

Speciation: For some materials (animals, pollens, mites, molds, insects, most foods) speciation is straightforward. For others (wild-caught insects, store-bought fish, and seafood) speciation can be challenging and manufacturers will need appropriate expertise to do so with confidence.

スペシエーション(種分化): 一部の材料（動物、花粉、ダニ、カビ、昆虫、ほとんどの食品）の場合、スペシエーションは簡単である。他の人（野生の昆虫、店で購入した魚、シーフード）の種分化は困難な場合があり、製造業者は自信を持ってそれを行うための適切な専門知識を必要とする。

Part selection: Species identification is not the only feature of a source material that requires identification and control. An organism has many distinct anatomical parts. For some allergen extracts (pollens, animal danders and pelts, Hymenoptera venoms), those parts are named with specificity. However, other extracts are named without part designation, even though allergen content may be significantly affected by parts

included in the extraction. Examples include dust mites and cockroaches, where feces and, for cockroaches, egg casings are enriched for allergens not otherwise present in the whole bodies. Product consistency can only be assured if proportional part content is maintained.

部品の選択: 種の識別は、識別と制御を必要とするソースマテリアルの唯一の機能ではない。生物には多くの異なる解剖学的部分がある。一部のアレルギー抽出物（花粉、動物の皮膚や毛皮、膜翅目毒）については、これらの部分に特定の名前が付けられている。ただし、他の抽出物は、アレルギー含有量が抽出物に含まれる部分によって大きく影響を受ける可能性がある場合でも、部分指定なしで名前が付けられている。例としては、ダニやゴキブリがあり、糞便の場合やゴキブリでは、全身に存在しないアレルギーが卵のケーシングに豊富に含まれている。製品の一貫性は、比例した部品含有量が維持されている場合にのみ保証されます。

Environmental factors: Other factors that warrant attention, if not control, are time and weather (pollen allergen content may vary by season) and other environmental factors (mold content varies by growth conditions and life cycle stage)

環境要因: 環境要因：制御できない場合でも注意が必要なその他の要因は、時間と天候（花粉アレルギー含有量は季節によって異なる場合がある）およびその他の環境要因（カビ含有量は成長条件とライフサイクルステージによって異なる）である。

Cleaning and initial preparation: Depending on the species, most source materials need to be washed and defatted before further processing. Pollens and animal danders are sieved and washed to reduce airborne contaminants; cultured mites are sieved and washed to remove culture media; mold cultures may be washed to remove culture media unless elemental media are used.¹⁷

洗浄と初期準備: 種によっては、ほとんどの原料は、さらに処理する前に洗浄して脱脂する必要がある。花粉と動物の皮膚は、空気中の汚染物質を減らすためにふるいにかけて、洗浄する。培養ダニをふるいにかけて、洗浄して培地を除去する。自然のままの媒質を使用しない限り、カビ培養物を洗浄して培地を除去することができる。

Defatting produces an allergen source material that is largely decolorized and easier to store, apportion, weigh, and extract. It has been assumed, erroneously, that the removed lipid-soluble components are largely nonallergenic, although even older protocols recognized that the fat-soluble residue could be retrieved and used for patch testing.¹⁸ Once selected, cleaned, and tested, manufacturers need to store source materials properly to preserve relevant allergen content, with attention to containers, temperature, and humidity.

Most allergenic proteins are rapidly soluble in water and well represented in aqueous extracts. However, for both standardized and nonstandardized allergenic extracts, the possibility exists that certain important allergen molecules will be missing from the extracted material. For example, the latex allergen Hev b 5 was missing from early glove extracts and Pru ar 5 was missing from some aqueous peach and apricot extracts, even though molecular diagnostics have shown these to be important allergens.¹

脱脂によって、大部分が脱色され、保管、配分、計量、および抽出が容易なアレルギー原料が生成される。除去された脂溶性成分は大部分が非アレルギー性であると誤って想定されていたが、古いプロトコルでも、脂溶性残留物を回収してパッチテストに使用されていた¹⁸。容器、温度、湿度に注意しながら、関連するアレルギー含有量を維持するために、原材料を適切に保管する必要がある。

ほとんどのアレルギータンパク質は水に急速に溶解し、水性抽出物によく表されます。ただし、標準化されたア

レルゲン抽出物と標準化されていないアレルゲン抽出物の両方について、特定の重要なアレルゲン分子が抽出された材料から欠落している可能性があります。たとえば、ラテックスアレルゲン **Hev b 5** は初期の手袋抽出物から欠落しており、**Pru ar 5** は一部の水性モモおよびアプリコット抽出物から欠落していますが、分子診断によりこれらが重要なアレルゲンであることが示されている。

Extraction and filtration. Allergen extracts are prepared from source materials by aqueous extraction in one of several buffered saline solutions. Extraction is performed at 4°C to 8°C for 24 to 72 hours under agitation. The extract is then separated

from the extracted source material by serial centrifugation and/or filtration; a “settling” step is sometimes needed to further clarify the extract. Aseptic filtration through a 0.2-µm filter precedes aseptic vial filling, typically into a sterile bulk container. Glycerol

and phenol, which function as preservatives and stabilizers, may be added to the extraction buffer before extraction or after; less often, human albumin (0.03%) is added as a stabilizer.²⁰

抽出とろ過。アレルゲン抽出物は、いくつかの緩衝食塩水のうちの1つで水抽出することにより、原料から調製される。抽出は4°C～8°Cで24～72時間攪拌しながら行う。次に、抽出物は、連続遠心分離および/または濾過によって抽出された原料から分離される。抽出物をさらに明確にするために、「沈降」ステップが必要になる場合がある。0.2 µm フィルターによる無菌ろ過は、無菌バイアルの充填に先立って行われ、通常は無菌のバルク容器に入れられる。防腐剤および安定剤として機能するグリセロールおよびフェノールは、抽出前または抽出後に抽出バッファーに添加することができる。それほど頻繁ではないが、安定剤としてヒトアルブミン（0.03%）が添加される²⁰。

Storage. Standardized allergen extracts undergo stability testing to define the optimal storage conditions and duration. Because the unitage for nonstandardized allergen extracts cannot support scientifically valid stability evaluations, the expiry for these products was established in the regulations (formerly 21 CFR 610.53) and incorporated into the respective biological license applications at 3 to 6 years from the date of manufacturing for glycerinated products.

ストレージ 標準化されたアレルゲン抽出物は、最適な保管条件と期間を定義するために安定性テストを受ける。標準化されていないアレルゲン抽出物の単位は科学的に有効な安定性評価をサポートできないため、これらの製品の有効期限は規制（以前の21 CFR 610.53）で確立され、グリセリン製品の製造日から3～6年でそれぞれの生物学的ライセンス申請に組み込まれている。

How the FDA regulates allergen extracts

Over 40 years, 2 aspects of the FDA regulatory program have had a significant impact on allergen manufacturers and have enhanced the safety of allergen extracts marketed to the American public.²¹ The first feature is the enforcement of current Good Manufacturing Practice (cGMP) standards (21 CFR 210, 211, and 680) on the manufacture of allergen products. cGMP standards are broad and comprehensive, and address organization and personnel, buildings and facilities, equipment, control of components and drug product containers and closures, production and process controls, holding and distribution, quality control, laboratory controls, and records and reports.

The second feature is the standardization of allergenic extracts. Standardization is the process by which a

reference extract is selected, and methods and procedures are developed to quantitatively compare a test extract with a reference extract to establish equivalence.²¹⁻²⁴ Allergen standardization became a reality in the United States in the late 1970s when the first allergen extracts were produced to meet FDA criteria for potency and composition. Standardization ensures that the assayed property of the extract is clinically relevant for defining potency and safety and that test methods for estimating the clinically relevant property are accurate and precise.²⁵ The FDA standardized allergenic extracts for in vivo human use are assessed for biological potency by quantitative intradermal skin testing, together with in vitro IgE testing and biochemical evaluation of the extract composition. Biological testing is important because the extracts are for in vivo use. Extracts that have been validated by biological testing are often incorporated into in vitro tests. However, in vitro IgE tests do not require GMP manufactured allergens and are validated for performance parameters using clinical laboratory practices to assess allergic sensitization.^{23,24}

Unitage for the standardized allergen extracts is assigned based on the nature of the allergens and the immunodominant immune response. The specific allergen content of certain allergen extracts is the basis for unitage for 2 standardized allergenic extracts, short ragweed pollen and cat hair/pelt, for which the immunodominant allergens (Amb a 1 and Fel d 1, respectively) have been identified and defined. For those standardized extracts where no immunodominant allergen has been identified (mites and grass pollens), overall IgE binding forms the basis for unitage. Finally, the Hymenoptera venoms are labeled based on mass unitage of venom or venom protein.

In contrast, nonstandardized allergen extracts have no US standard of potency and are manufactured and labeled based on protein nitrogen unit (PNU) or on the weight of the source material extracted with a given volume of extracting fluid (w/ v).²⁶ The PNU or w/v units for these extracts have no direct correlation to biological potency, and, unlike standardized allergen extracts, no formal assessments of nonstandardized allergen extract efficacy have been performed. The level of detailed knowledge needed across-allergic populations and variation in allergic responses in individuals and populations provides enormous challenges for selecting and verifying standards. In many cases, multiple allergens have been identified within 1 source material with IgE binding from some population of allergic subjects. The variation of the concentration of allergens has been noticed in various similar sources that may represent genomic differences or environmental differences. Standardization based on a fixed concentration of 1 or 2 proteins under the reality of such variation would likely not benefit the majority of the allergic population. The value of the nonstandardized extracts for diagnosis depends to a great degree on the source material identity and quality, extraction efficiency, and preservation of proteins as controlled by the individual manufacturer.²⁷ The responsibility of the FDA then is to inspect the facilities and procedures and ensure that the extracts are safe and correctly identified as to product labels.

FDA がアレルギー抽出物を規制する方法

40 年以上にわたり、FDA 規制プログラムの 2 つの側面がアレルギー製造業者に大きな影響を与え、アメリカ国民に販売されるアレルギー抽出物の安全性を高めてきた²¹。最初の特徴は、アレルギー製品の製造に関する現在の適正製造基準 (cGMP) の施行である (21 CFR 210、211、および 680)。cGMP 基準は広範かつ包括的であり、組織と人員、建物と施設、設備、コンポーネントと医薬品の容器とクロージャーの管理、生産とプロセスの管理、保管と流通、品質管理、実験室の管理、記録と報告に対応している。

2 番目の特徴は、アレルギー抽出物の標準化である。標準化とは、参照抽出物を選択するプロセスであり、テスト抽出物と参照抽出物を定量的に比較して同等性を確立する方法と手順が開発されている。²¹⁻²⁴ アレルギーの標準化は、1970 年代後半に米国で実現した。最初のアレルギー抽出物は、効力と組成に関する FDA の基準を

満たすために製造された。標準化により、抽出物の分析された特性が効力と安全性の定義に臨床的に関連し、臨床的に関連する特性を推定するための試験方法が正確であることが保証される 25。FDA で標準化された *in vivo* ヒト使用のアレルギー性抽出物は、生物学的効力について定量的に評価される。皮内皮膚試験、*invitro* IgE 試験および抽出物組成の生化学的評価。抽出物は *in vivo* で使用するため、生物学的試験は重要である。生物学的試験によって検証された抽出物は、多くの場合、*invitro* 試験に組み込まれる。ただし、*in vitro* IgE テストでは、GMP で製造されたアレルゲンは必要なく、アレルギー感作を評価するための臨床検査の実践を使用して、パフォーマンスパラメーターが検証されます。23,24

標準化されたアレルゲン抽出物の単位は、アレルゲンの性質と免疫優勢免疫反応に基づいて割り当てられる。特定のアレルゲン抽出物の特定のアレルゲン含有量は、免疫優勢アレルゲン（それぞれ、Amb a1 および Feld 1）が特定および定義されている、2 つの標準化されたアレルゲン抽出物、短いブタクサ花粉および猫の毛/毛皮の統一の基礎です。免疫優勢のアレルゲンが同定されていない標準化された抽出物（ダニおよび草花粉）の場合、全体的な IgE 結合が単一化の基礎を形成します。最後に、膜翅目毒は、毒または毒タンパク質の質量単位に基づいてラベル付けされます。

対照的に、標準化されていないアレルゲン抽出物には米国の効力基準がなく、タンパク質窒素単位 (PNU) または所定の量の抽出液で抽出された原料の重量 (w/v) に基づいて製造およびラベル付けされます。26PNU またはこれらの抽出物の w/v 単位は生物学的効力と直接の相関関係がなく、標準化されたアレルゲン抽出物とは異なり、標準化されていないアレルゲン抽出物の有効性の正式な評価は行われていません。アレルギー集団全体で必要とされる詳細な知識のレベルと、個人および集団におけるアレルギー反応の変動は、基準を選択および検証するための大きな課題を提供します。多くの場合、複数のアレルゲンが 1 つのソース資料内で特定されており、アレルギー患者の一部の集団から IgE が結合しています。アレルゲンの濃度の変動は、ゲノムの違いや環境の違いを表す可能性のあるさまざまな同様の情報源で注目されています。そのような変動の現実の下での 1 つまたは 2 つのタンパク質の固定濃度に基づく標準化は、アレルギー集団の大多数に利益をもたらさない可能性があります。診断のための標準化されていない抽出物の価値は、原料の同一性と品質、抽出効率、および個々の製造業者によって管理されているタンパク質の保存に大きく依存します 27。FDA の責任は、施設と手順を検査し、抽出物が安全であり、製品ラベルに関して正しく識別されていることを確認してください。

Efficacy review activities (1972D) and conclusions

When regulation of allergen extracts transferred from the National Institutes of Health to the FDA in 1972, the Agency initiated a broad review of the efficacy and safety of these important products.²⁸ As previously noted, “the transfer of allergenics to the FDA had 2 major implications for manufacturers and their products. First, allergen extracts were now under the jurisdiction of a regulatory agency with an unambiguous and mature compliance-based apparatus. Second, allergenics were now subject to the 1962 Kefauver-Harris amendments, which require manufacturers to submit evidence of effectiveness and not just safety before marketing approval.” That review was achieved in multiple stages, involving external experts and internal scientific and medical staff. Notable features of the review, in all stages, included an exclusive dependence on published literature and an acceptance of well-described case reports and certain cross-reactivity data as supportive of effectiveness. Applying these standards, only half of reviewed licensed allergen extracts had literature that supported effectiveness.

IMPLICATIONS FOR PRACTITIONERS AND PRACTICE GUIDELINES^{29,30}

Allergen extracts are potent and stable: Standardized allergen extract potency is based on the measurement of biologically relevant allergens or immune response (Table I). For the nonstandardized allergen extracts this cannot be done—assurance of potency relies on consistency of the source materials and manufacture processes. FDA regulations and inspections increase the likelihood of maintaining this consistency, but there are limitations imposed by this reliance, notably the inability to make lot-to-lot comparisons and assess stability over time.

Standardized extracts are more clinically reliable than nonstandardized extracts, but nonstandardized extracts may be useful nonetheless: based on the FDA's efficacy review of nonstandardized allergen extracts, only half of these products had literature that supported their effectiveness.²⁸ These are licensed products, but their licenses were issued long before the current clinical standards were in place. As noted in an Advisory Committee discussion at the time (Allergenic Products Advisory Committee meeting, 2011),³⁴ FDA staff relied on published data alone to support their conclusions. Clinicians and researchers alike should be aware of the limitations of these products and take this into account when using them.

Clinical utility of fruit/vegetable extracts: All food allergen extracts in the United States are nonstandardized. As with all nonstandardized allergen extracts, no valid potency measure exists for these extracts. In practice guidelines,²⁹ based on a study of individuals with oral allergy syndrome,³⁵ it is suggested that skin testing with fresh fruits/vegetables may be necessary to diagnose these allergies, even though the risk of a generalized reaction to fresh food testing may be higher in young children.

Clinical utility of dog extracts: Nonstandardized dog allergen extracts exist in the United States in 2 formulations, conventional and “acetone-precipitated.” As with all nonstandardized allergen extracts, no valid potency measure exists for these dog extracts. In spite of this, authoritative literature reports³⁶ and practice parameters³⁰ suggest that the use of the acetone-precipitated product will yield better clinical results associated with their higher Can f 1 levels. These recommendations are not based on clinical studies, and a recent report suggests that the immune response to the dog is more complex than previously thought.³⁷

In general, the standardized allergen extracts were licensed more recently, and under more stringent regulatory requirements, than the nonstandardized extracts.³⁸ Other recent allergen product approvals (Prescribing information—GRASTEK grass tablet; PALFORZIA, peanut powder; RAGWITEK, ragweed extract inclusion for dysphonia; ORALAIR, 5 grass extract; ODACTRA, house dust mite extract)^{31,33,39-41} were conducted under a modern, rigorous review program that requires affirmative evidence of clinical effectiveness and safety in addition to consistent safe manufacture under cGMP, and labeling that expresses meaningful biological potency. A challenge for clinicians, manufacturers, and regulators is the fact that patients are exposed to a variety of allergenic sources, and the immune responses in a population to these materials may be heterogeneous. For example, the major peanut allergens are Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, and Ara h 6. Yet in northern Europe where people are often sensitized to birch pollen, the Bet v 1 homolog Ara h 8 can be an important allergen for a small number of patients.⁴² People in Spain and Italy may be sensitized to lipid transfer proteins and be sensitive to Ara h 9.⁴³ If peanut extract is standardized by the concentrations Ara h 1, 2, 3, or 6, levels of Ara h 8 and Ara h 9 will not be adequately controlled.

有効性レビュー活動（1972D）と結論

1972年に国立衛生研究所からFDAにアレルゲン抽出物の規制が移管されたとき、当局はこれら重要な製品の有効性と安全性の広範なレビューを開始した²⁸。前述のように、「FDAへのアレルギー誘発物質の移転は、製造業者とその製品に2つの大きな影響を及ぼしました。まず、アレルゲン抽出物は現在、明確で成熟したコンプライアンススペースの装置を備えた規制当局の管轄下にあった。第二に、アレルギー誘発物質は現在、1962年のKefauver-Harris改正の対象であり、製造業者は販売承認の前に安全性だけでなく有効性の証拠を提出する必要がある。」そのレビューは、外部の専門家と内部の科学および医療スタッフを含む複数の段階で達成された。レビューの注目すべき特徴は、すべての段階で、公開された文献への独占的な依存と、有効性を裏付けるものとして十分に説明された症例報告と特定の交差反応性データの受け入れを含んだ。これらの基準を適用すると、レビューされた認可されたアレルゲン抽出物の半分だけが有効性を支持する文献を持っていた。

開業医と実践ガイドラインへの影響^{29,30}

アレルゲン抽出物は強力で安定している。標準化されたアレルゲン抽出物の効力は、生物学的に関連するアレルゲンまたは免疫応答の測定に基づいています(表I)。標準化されていないアレルゲン抽出物の場合、これを行うことはできない。効力の保証は、原料と製造プロセスの一貫性に依存する。FDAの規制と検査により、この一貫性を維持する可能性が高まるが、この依存性によって課せられる制限がある。特に、ロット間の比較を行い、長期にわたる安定性を評価することができない。

標準化された抽出物は、標準化されていない抽出物よりも臨床的に信頼性がありますが、それでも標準化されていない抽出物は有用である可能性がある。標準化されていないアレルゲン抽出物に関するFDAの有効性レビューに基づく、これらの製品の半分だけがその有効性を裏付ける文献があった²⁸。これらはライセンス製品であるが、現在のライセンス臨床基準が実施されるずっと前に発売された。当時の諮問委員会の議論(2011年のアレルゲン製品諮問委員会会議)に記載されているように³⁴、FDAのスタッフは、結論を裏付けるために公開されたデータのみ依存していた。臨床医と研究者は同様に、これらの製品の制限を認識し、それらを使用する際にこれを考慮に入れる必要があります。

果物/野菜抽出物の臨床的有用性：米国のすべての食品アレルゲン抽出物は標準化されていない。すべての標準化されていないアレルゲン抽出物と同様に、これらの抽出物の有効な効力測定値は存在しない。口腔アレルギー症候群の個人の研究に基づく実践ガイドライン²⁹では、生鮮食品検査に対する一般的な反応のリスクが幼児の方が高いとしても、これらのアレルギーを診断するために新鮮な果物/野菜を用いた皮膚検査が必要であることが示唆されている。

犬の抽出物の臨床的有用性：標準化されていない犬のアレルゲン抽出物は、従来型と「アセトン沈殿」の2つの製剤で米国に存在する。標準化されていないすべてのアレルゲン抽出物と同様に、これらの犬の抽出物には有効な効力測定値はない。にもかかわらず、権威ある文献報告³⁶および実践パラメータ³⁰は、アセトン沈殿生成物の使用が、それらのより高いCan f1レベルに関連するより良い臨床結果をもたらすことを示唆している。これらの推奨事項は臨床研究に基づくものではなく、最近の報告では、犬に対する免疫反応は以前考えられていたよりも複雑であることが示唆されている³⁷。

TABLE I. Standardized and licensed allergen extracts in the United States

Allergen extract	Current lot release tests	Labeled unitage
Dust mite (<i>Dermatophagoides farinae</i>)	Competition ELISA	AU/mL (equivalent to BAU/mL)
Dust mite (<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>)	Protein*	
Cat pelt (<i>Felis domesticus</i>)	Fel d 1 (RID)	BAU/mL
Cat hair (<i>Felis domesticus</i>)	IEF Protein	5-9.9 Fel d 1 U/mL = 5000 BAU/mL 10-19.9 Fel d 1 U/mL = 10,000 BAU/mL
Bermuda grass pollen (<i>Cynodon dactylon</i>)	Competition ELISA	BAU/mL
Red top grass pollen (<i>Agrostis alba</i>)	IEF	
June (Kentucky blue) grass pollen (<i>Poa pratensis</i>)	Protein*	
Perennial ryegrass pollen (<i>Lolium perenne</i>)		
Orchard grass pollen (<i>Dactylis glomerata</i>)		
Timothy grass pollen (<i>Phleum pratense</i>)		
Meadow fescue grass pollen (<i>Festuca elatior</i>)		
Sweet vernal grass pollen (<i>Anthoxanthum odoratum</i>)		
Short ragweed pollen (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>)	Amb a 1 (RID)	Amb a 1 units
Yellow hornet (<i>Vespa</i> species)	Hyaluronidase and	µg protein
Wasp (<i>Polistes</i> species)	phospholipase activity	
Honey bee (<i>Apis mellifera</i>)		
White faced hornet (<i>Vespa</i> species)		
Yellow jacket (<i>Vespula</i> species)		
Mixed vespid (<i>Vespa</i> + <i>Vespula</i> species)		

	Product	Manufacturer	Unit	Basis
Parenteral	Nonstandardized	Several companies	PNU/mL w/v	Measured protein or mass/volume
Sublingual tablets	Short ragweed pollen	ALK	Amb a 1 units	Based on skin prick test size. 100 IR has same geometrical mean diameter wheal size as codeine phosphate control ^{31,32}
	Timothy grass pollen	ALK	BAU	
	Sweet vernal, orchard, perennial rye, timothy, and Kentucky blue grass pollens	Stallergenes/Greer	IR	
	Mites	ALK	SQ-HDM	Based on biologic potency, major allergen content and complexity of the allergen extract ³³

AU, Allergy units; BAU, bioequivalent allergy units; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IEF, isoelectric focusing; RID, radial immunodiffusion.

The table was reformatted with permission from Elsevier from Chapter 29 of *Middelton's Allergy: Principles and Practice*. 9th ed. (authors: Bridgewater, Slater, and Rabin).

*Test for informational purposes only.

一般に、標準化されたアレルゲン抽出物は、標準化されていない抽出物よりも最近、より厳しい規制要件の下で認可された 38。その他の最近のアレルゲン製品の承認（処方情報-GRASSTEK グラスタブレット; PALFORZIA、ピーナッツパウダー; RAGWITEK、ブタクサ抽出物の異音症; ORALAIR、5 草抽出物; ODACTRA、ハウスダストマイト抽出物）31,33,39-41 は、cGMP の下での一貫した安全な製造、およびラベリングに加えて、臨床的有効性と安全性の肯定的なエビデンスを必要とする最新の厳密なレビュープログラムの下で実施され、それは意味のある生物学的効力を示した。臨床医、製造業者、および規制当局にとっての課題は、患者がさまざまなアレルゲン源にさらされており、これらの物質に対する集団の免疫反応が不均一である可能性があるという事実です。たとえば、主要なピーナッツアレルゲンは、Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3、および Ara h 6 である。しかし、人々が白樺の花粉に感作されることが多い北ヨーロッパでは、Bet v1 ホモログ Ara h 8 が少数の患者にとってのアレルゲンとして重要である可能性がある。42。スペインとイタリアの人々は脂質転移タンパク質に感作され、Ara h 9 に敏感である可能性がある。43 ピーナッツ抽出物が Ara h 1、2、3、または 6 の濃度で標準化されている場合 Ara h 8 と Ara h 9 は適切にコントロールされない。

ALLERGEN MOLECULES—THE ESSENTIAL COMPONENTS OF MOLECULAR DIAGNOSTICS

Allergens are among the most well-defined groups of molecules in biomedical research in terms of their structure, biologic effects, and function. The WHO/IUIS Allergen Nomenclature website lists 979 allergens included in the systematic nomenclature.⁴⁴ More than 500 allergens have been sequenced and expressed, and, remarkably, more than 100 structures of allergens and allergen antibody complexes are listed in the Protein Database (Table II).^{5,45} Allergens belong to a diverse group of 180 protein families and include, among others, enzymes, ligand binding proteins, seed storage, and pathogenesis-related proteins.^{3,4,46} The tremendous progress in allergen proteomics has improved the manufacture of conventional diagnostic and therapeutic allergenic products, greatly facilitated allergen standardization worldwide, and has underpinned the development of component-resolved or molecular diagnostics, ushering in a new era of personalized medicine in allergy.²⁴ Several technological advances have fueled this progress:

アレルゲン分子-分子診断の必須コンポーネント

アレルゲンは、その構造、生物学的効果、および機能の観点から、生物医学研究で最も明確に定義された分子のグループの 1 つである。WHO/IUIS アレルゲン命名法の Web サイトには、体系的な命名法に含まれる 979 個のアレルゲンがリストされている 44。500 を超えるアレルゲンが配列決定および発現されており、驚くべきことに、100 を超えるアレルゲンおよびアレルゲン抗体複合体の構造がタンパク質データベースにリストされている (表 II)。^{5,45} アレルゲンは、180 のタンパク質ファミリーの多様なグループに属しており、とりわけ、酵素、リガンド結合タンパク質、種子貯蔵、および病因関連タンパク質が含まれる。^{3,4,46}

アレルゲンプロテオミクスの目覚ましい進歩により、従来の診断および治療用アレルゲン製品の製造が改善され、世界中でアレルゲンの標準化が大幅に促進され、成分分解または分子診断の開発が支えられ、アレルギーにおける個別化医療の新時代が到来した 24。技術の進歩がこの進歩を後押しした。

TABLE II. Allergen molecules—at a glance

- 979 allergen molecules in the systematic WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database (www.allergen.org)
- >500 allergens cloned, sequenced, and expressed as recombinant proteins
- ~108 three-dimensional allergen structures in the Protein Database (PDB), www.rcsb.org. An additional 20+ structures of allergen-antibody complexes are in the PDB
- Occur in approximately 180 families in the Protein Family database (Pfam); have diverse structures and biologic functions (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam)
- Can be manufactured at 95% to 99% purity and validated using monoclonal antibodies, IgE antibodies, and mass spectrometry

IUIS, International Union of Immunological Societies; *WHO*, World Health Organization.

Monoclonal immunoassays are used for precise quantification of major allergens in allergenic products used in clinical practice. Allergen measurement is required by regulatory authorities in Europe and has enabled manufacturers to improve the lot-to-lot consistency and reproducibility of their skin test and therapeutic extract products.^{26,47} In the United States, measurements of Amb a 1 and Fel d 1 are required by the FDA for

potency assessment of short ragweed pollen and cat allergen extracts. Thus, cat extracts with a potency of 10,000 BAU/mL contain 10-19.9 FDA units/mL Fel d 1 and can be used to determine doses of allergen administered over the course of immunotherapy.⁴⁸ The European Directorate for Quality of Medicines and Healthcare (EDQM), together with the Paul Ehrlich Institute (Langen, Germany) and researchers in academia and industry, has developed a certified enzymelinked immunosorbent assay for birch pollen allergen, Bet v 1, as part of the BSP 090 allergen standardization project.⁴⁹ This assay is expected to be included in the European Pharmacopoeia in 2020. In both cases, the outcome for allergists is greater comparability of cat and birch pollen extracts between manufacturers and more reliable and consistent dosing to increase the safety and efficacy of immunotherapy.

Recombinant allergens are manufactured in high-level expression vectors, including *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. Recombinant or purified natural allergens are the molecular targets for IgE antibodies and are being used to develop the next generation of in vitro tests for allergy diagnosis. Purified allergens are being developed as empirical standards for immunoassays and mass spectrometry (MS). As part of the BSP 090 project, the EDQM consortium has produced and validated recombinant allergen standards for Bet v 1 and Phl p 5 that are part of the European Pharmacopoeia.⁵⁰

モノクローナルイムノアッセイは、臨床現場で使用されるアレルギー製品中の主要なアレルギーを正確に定量化

するために使用される。アレルゲン測定はヨーロッパの規制当局によって要求されており、製造業者は皮膚検査および治療用抽出物製品のロット間一貫性と再現性を改善することができる 26,47。米国では、ブタクサの花粉と猫アレルゲン抽出物の効力評価のための Amb a1 および Fel d1 の測定が FDA によって要求される。したがって、効力が 10,000 BAU / mL の猫抽出物には、10~19.9FDA 単位/ mL の Fel d1 が含まれており、免疫療法の過程で投与されるアレルゲンの用量を決定するために使用できる。48 欧州医薬品局方 (EDQM) は、Paul Ehrlich Institute (ランゲン、ドイツ) および学界および産業界の研究者と協力して、BSP 090 アレルゲン標準化プロジェクトの一環として、白樺花粉アレルゲンの認定酵素結合免疫吸着アッセイ Bet v1 を開発した 49。どちらの場合も、アレルギー専門医の結果は、メーカー間での猫と白樺の花粉抽出物の比較可能性が高まり、免疫療法の安全性と有効性を高めるためのより信頼性が高く一貫した投与量になる。

組換えアレルゲンは、Escherichiacoli や Pichiapastoris などの高レベルの発現ベクターで製造されている。組換えまたは精製された天然アレルゲンは IgE 抗体の分子標的であり、アレルギー診断のための次世代の体外試験の開発に使用されている。精製されたアレルゲンは、免疫アッセイおよび質量分析 (MS) の経験的標準として開発されている。BSP 090 プロジェクトの一環として、EDQM コンソーシアムは、ヨーロッパ薬局方の一部である Bet v1 および Phlp5 の組換えアレルゲン標準を作成および検証した 50。

X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance (NMR)

analyses of the 3-dimensional structure of allergens.⁵¹ Advances in the computation of X-ray diffractions patterns (eg, using HKL 3000 software) allow crystal structures to be resolved within days of obtaining allergen or antibody crystals.⁵² Structures can be resolved within months rather than years. Structural studies allow the precise location of amino acids involved as isoforms, variants, IgE, or monoclonal antibody binding and catalytic sites to be determined on or within the allergen molecule. They provide the molecular basis for allergenic cross-reactivity and allow further investigation of clinical significance.

MS is coming of age and being used for compositional analyses of allergenic extracts and to assess the purity of purified allergens for diagnostic use.⁵³⁻⁵⁶ The latest generation of “benchtop” Orbitrap instruments with multiplexing capabilities provide sophisticated analyses of protein identification, **post-translational modification**s, relative protein abundance, and absolute protein quantification.^{56,57} MS has multiple applications in allergen proteomics. Natural extracts, for example, cockroach, can be analyzed to determine the repertoire and concentration of allergens present in the sample using multiple reaction monitoring MS.⁵⁴ Milk caseins (Bos d 8) can be analyzed to determine the relative abundance of a-, b-, and k-caseins. Peanut flour products for use in preclinical and clinical trials as early intervention therapeutics are being formulated based on Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, and Ara h 6 compositions. MS is particularly useful when immunoassays are not available. Another key advantage of MS is the monitoring of allergenic products or foods that have been chemically modified or denatured (eg, allergoids) or processed by heat or other food processing methods. Finally, MS is a critical tool for analyzing the purity of allergens used in molecular diagnostics. For natural allergens, trace contamination with other allergens can be determined, and for recombinant allergens, contamination with host cell proteins can be assessed.⁵³ Accurate and absolute quantification of allergen proteins use in molecular diagnostics or as allergen reference materials can be achieved using isotope-labeled peptides in

MS.^{54,58,59}

X 線結晶学および核磁気共鳴 (NMR)

アレルゲンの 3 次元構造の分析 51。X 線回折パターンの計算の進歩 (たとえば、HKL 3000 ソフトウェアの使

用)により、結晶構造は次のようになる。アレルゲンまたは抗体の結晶を取得してから数日以内に決定される⁵²。構造は、数年ではなく数か月以内に決定できる。構造研究により、アイソフォーム、バリエーション、IgE、またはモノクローナル抗体の結合および触媒部位として関与するアミノ酸の正確な位置を、アレルゲン分子上またはアレルゲン分子内で決定することができる。それらは、アレルゲン交差反応性の分子基盤を提供し、臨床的重要性についてさらなる調査を可能にした。

MS (mass spectrometry 質量分析) はより進歩しており、アレルゲン抽出物の組成分析や診断用の精製アレルゲンの純度の評価に使用されている⁵³⁻⁵⁶。多重化機能を備えた最新世代の「ベンチトップ」Orbitrap 機器は、タンパク質同定の高度な分析ができる。**翻訳修飾**、相対的なタンパク質の存在量、および絶対的なタンパク質の定量化。^{56,57}MS には複数のアレルゲンプロテオミクスへの応用がある。ゴキブリなどの天然抽出物を分析して、複数の反応モニタリング MS を使用してサンプルに存在するアレルゲンのレパートリーと濃度を決定できる。⁵⁴ ミルクカゼイン (Bos d 8) を分析して、a-、b-、および k-カゼインの相対存在量を決定できる。早期介入療法として前臨床および臨床試験で使用するためのピーナッツ粉製品 Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3、および Ara h 6 の組成に基づいて処方されている。MS は、免疫アッセイが利用できない場合に特に役立つ。MS のもう 1 つの重要な利点は、化学的に修飾または変性された、または熱やその他の食品加工方法で加工されたアレルゲン製品または食品 (アレルゴイドなど) を監視できることです。最後に、MS は、分子診断で使用されるアレルゲンの純度を分析するための重要なツールである。天然アレルゲンの場合、他のアレルゲンによる微量汚染を測定でき、組換えアレルゲンの場合、宿主細胞タンパク質による汚染を評価できる⁵³。分子診断またはアレルゲン参照物質として使用されるアレルゲンタンパク質の正確かつ絶対的な定量化は、同位体の標識ペプチドを使用して行うことができる。

MS.54,58,59

訳注：**翻訳後修飾 (ほんやくごしゅうしょく、Post-translational modification、PTM)** は、翻訳後のタンパク質の化学的な修飾である。これは多くのタンパク質の生合成の後方のステップの 1 つである。

翻訳後、アミノ酸は、酢酸、リン酸、様々な脂質、炭水化物のような他の生化学官能基と結合し、化学的特性の変換 (例えばシトルリン)、またはジスルフィド結合の形成のような構造変換を受け、タンパク質の反応の幅を広げる。

また、酵素がタンパク質の N 末端からアミノ酸を輸送するか、中央からペプチド結合を切断することもある。例えば、ペプチドホルモンであるインスリンはジスルフィド結合が形成された後に 2 つに切断され、C-ペプチド (右図の桃色のポリペプチド鎖部分) は結合から切り離される。(最終的にジスルフィド結合で 2 つのポリペプチド鎖が結合したタンパク質が生じる。)

この他の修飾にリン酸化がある。この修飾はタンパク質酵素の作用の活発化と非活発化の調節機構においてよく起こる。

Together, monoclonal immunoassay, recombinant allergens, X-ray crystallography/NMR, and MS have transformed the field of allergen proteomics, which is essential for allergen-specific molecular diagnostics and new therapeutic strategies. There have been more than 15 clinical trials of allergen immunotherapy recombinant allergens.⁶⁰ Most of these trials have used Bet v 1 for the treatment of birch pollen allergy or several recombinants

for grass pollen allergy. In most cases, measurements of these major allergens, together with cGMP allergen manufacturing and purity assessments, similar to those described here, have been used to validate recombinant allergens for therapeutic use.

モノクローナル免疫アッセイ、組換えアレルゲン、X 線結晶学/NMR、および MS が一体となって、アレルゲ

ン特異的分子診断および新しい治療戦略に不可欠なアレルゲンプロテオミクスの分野を変革した。アレルゲン免疫療法組換えアレルゲンの15を超える臨床試験がある60。これらの試験のほとんどは、白樺花粉アレルギーの治療にBet v 1を使用したか、草花粉アレルギーのいくつかの組換え体を使用していた。ほとんどの場合、これらの主要なアレルゲンの測定値は、cGMPアレルゲンの製造および純度の評価とともに、ここで説明されているものと同様に、治療用途の組換えアレルゲンを検証するために使用されている。

PURIFIED ALLERGENS FOR MOLECULAR DIAGNOSIS OF ALLERGIC DISEASES

There would be several significant advantages of the use of purified, recombinant allergens for the skin test diagnosis of allergic diseases including manufacturing supply, product consistency, and, in principle, more accurate diagnosis and better immunotherapeutic options.⁶¹ Although regulatory pathways for the approval of such *in vivo* products are available, none are on the market anywhere at this time.

The situation regarding *in vitro* testing, however, is more promising. Assessments of IgE-mediated sensitization using purified allergens in *in vitro* tests have several advantages compared with use of allergen extracts: (i) monitoring of IgE responses to individual allergens from multiple sources; (ii) greater diagnostic precision and unambiguous determination of cross-reactivity; (iii) improved diagnostic efficacy and risk assessment; and (iv) association of IgE responses to specific allergens as predictors of disease progression and severity.^{46,62} Sensitization to birch pollen is a classic example of molecular diagnostics in action. Patients sensitized to Bet v 2 (profilin) frequently develop oral allergy syndrome as a result of cross-reactivity with soft fruits and vegetables, which also contain homologous cross-reactive profilin allergens. Patients sensitized to Bet v 1 may also have IgE antibodies to peanut allergen, Ara h 8, and show positive skin test responses to peanut. These reactions are caused by the structural and antigenic homology between Bet v 1 and similar pathogenesis-related proteins found in cherry (Pru av 1), celery (Api g 1), and peanut (Ara h 8) (Figure 1). However, patients with IgE to Ara h 8 are at low risk of developing severe reactions to peanut and, in most cases, can consume peanuts as part of their diet without adverse effects. In several cases, the measurement of IgE to specific allergens (eg, Fel d 1, Can f 1, Ara h 2, and Phl p 1) is a better predictor of clinical sensitivity than measuring IgE to allergen extracts.⁴⁶ Evidence is emerging that sensitization to 1 or more “initiator” molecules in early life

predicts progression to allergic rhinitis, asthma, or food allergy later in life. In the German Multicenter Allergy Study cohort, sensitization to Der p 1 and Der p 23 in the first 5 years of life was associated with asthma at age 12, whereas in the Manchester

Asthma and Allergy Study cohort, Der f 2 was also predictive. These studies also showed that “molecular spreading” of IgE responses to a larger number of allergens was associated with greater disease severity. Similar disease progressions have been associated with IgE responses to other major allergens (Table III).⁴⁶

アレルギー性疾患の分子診断のための精製アレルゲン

アレルギー性疾患の皮膚検査診断に精製された組換えアレルゲンを使用することには、製造供給、製品の一貫性、そして原則として、より正確な診断とより優れた免疫療法の選択肢を含むいくつかの重要な利点がある⁶¹。このような *in vivo* 製品の承認のための規制経路は利用可能であるが、現時点ではどこにも市場に出回っていない。しかし、体外検査に関する状況はより有望である。体外試験で精製アレルゲンを使用したIgE媒介感作の評価には、アレルゲン抽出物の使用と比較していくつかの利点がある。(i) 複数のソースからの個々のアレルゲンに対するIgE応答のモニタリング。(ii) より高い診断精度と交差反応性の明確な決定。(iii) 診断効果とリスク評価の改善。(iv) 疾患の進行と重症度の予測因子としての特定のアレルゲンに対するIgE応答の関連性。^{46,62}

白樺の花粉に対する感作は、実際の分子診断の典型的な例である。Bet v 2 (プロフィリン) に感作された患者は、同種の交差反応性プロフィリンアレルゲンも含む柔らかい果物や野菜との交差反応性の結果として、口腔アレルギー症候群を頻繁に発症する。Bet v 1 に感作された患者は、ピーナッツアレルゲン Ara h 8 に対する IgE 抗体も持っている可能性があり、ピーナッツに対して陽性の皮膚テスト反応を示す。これらの反応は、Bet v 1 と、チェリー (Pru av 1)、セロリ (Api g 1)、およびピーナッツ (Ara h 8) に見られる同様の病原性関連タンパク質との間の構造的および抗原的相同性によって引き起こされる (図 1)。

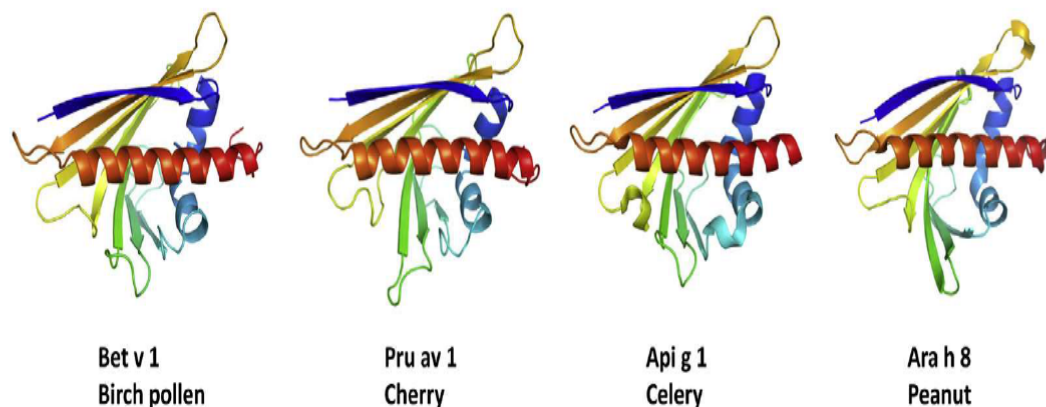


FIGURE 1. Structural homology between birch pollen and food allergens that are pathogenesis-related group 10 proteins. Patients who are primarily sensitized to Bet v 1 may also show cross-sensitization to cherry, celery, or peanut and may have oral allergy syndrome. In Central Europe, where consumption of celeriac is common, Api g 1 is the primary cause of sensitization and food allergy symptoms.

ただし、IgE Ara h 陽性の患者は、ピーナッツに対して重度の反応を起こすリスクが低く、ほとんどの場合、悪影響を与えることなく食事の一部としてピーナッツを摂取できます。いくつかのケースでは、特定のアレルゲン (Fel d 1、Can f 1、Ara h 2、Phl p 1 など) に対する IgE の測定は、アレルゲン抽出物に対する IgE の測定よりも臨床感度のより良い予測因子となる 46。幼少期の 1 つ以上の「イニシエーター」分子に対する感作は、後年のアレルギー性鼻炎、喘息、または食物アレルギーへの進行を予測できる。ドイツの多施設アレルギー研究コホートでは、生後 5 年間の Der p 1 および Der p 23 に対する感作は、12 歳の喘息と関連していたが、マンチェスター喘息およびアレルギー研究コホートでは、Der f2 も予測可能であった。これらの研究はまた、より多くのアレルゲンに対する IgE 応答の「分子拡散」が、より大きな疾患の重症度と関連していることを示した。同様の疾患の進行は、他の主要なアレルゲンに対する IgE 応答と関連している (表 III)。

TABLE III. Allergen molecules as predictors of disease severity

Allergen(s)	Disease severity
Der p 1, Der f 2, Der p 23	Asthma
Bet v 1	Allergic rhinitis, asthma
Fel d 1	Allergic rhinitis, asthma
Phl p 1, Phl p 7	Allergic rhinitis, asthma
Phl p 12	Oral allergy syndrome
Ara h 2	Anaphylaxis, severe food allergy

Multiplex technologies and “lab-on-a-chip” nanotechnology are used in microarrays for allergy diagnostics.^{63,64} The earliest and most widely used microarray has 112 allergens on a glass slide and can be used to test 4 sera.⁶⁵ Recently, under the European Union-funded project “Mechanisms for the Development of Allergies (MeDALL),” an array of 170 allergens has been developed (<http://medall-fp7.eu/>).⁶⁶ Most allergy diagnostics manufacturers have incorporated molecular diagnostics into their IgE test platforms, and several biotech start-ups are entering the

field to develop better, faster, patient-centered diagnostic technologies. The broad spectrum of allergens for which IgE determinations are being made prompted the European Academy of Allergy and Clinical Immunology to publish a 250-page molecular allergology user guide to aid allergists and other clinicians in result interpretation and clinical significance.³² The European Academy of Allergy and Clinical Immunology user

guide includes recommendations for the diagnostic workup of allergic patients using molecular diagnostics, together with the benefits and limitations of this approach using single or multiple allergen components.³² This issue of the journal also contains a detailed review of methods used for sIgE molecular diagnostic testing.⁶⁷ One downside, especially for large static arrays of 100p allergens, is that much of the IgE data generated may not be relevant to an individual patient. Efficient data processing could alleviate this problem, together with the development of flexible, focused arrays for allergen groups—foods, indoor allergens, pollens, venoms.⁶⁷ Yet, appropriate diagnosis always requires the clinician to consider the specific history of the patient and information related to exposure and symptoms because specific IgE alone only suggests plausible causes of allergy.³²

Manufacturers face several hurdles and challenges in developing new diagnostic devices.⁵⁶ Producing 100p purified natural activity requires significant investment in infrastructure, process development, and scientific expertise.

Some recombinant allergens are difficult to express (eg, pectate lyase allergens from weed and cedar pollens).⁶⁸ However, the most pressing challenge faced by manufacturers is sourcing sera from allergic patients for IgE binding validation studies, which typically involve 20 to 50 sera from patients with 0.35 to >100 kU/L IgE antibody to individual allergen molecules.⁶³ This is especially difficult for allergens that are more prevalent in children, such as food allergens. Help is on the way! Smith et al at Vanderbilt University have developed panels of human IgE monoclonal antibodies to dust mite, cat, dog, Aspergillus, and food allergens (peanut, milk, egg, cashew, and walnut). The IgE monoclonal antibodies (mAb) are derived from allergic patients

using proprietary technology and, as such, are natural antibodies, of high affinity, that can be produced in mg amounts in cell culture or by recombinant antibody technology.⁶⁹ This remarkable technological breakthrough will, for the first time, enable human IgE mAb to be used for allergen identification, for quantification of IgE antibody responses, for molecular reference standards, for epitope analysis, and in mast cell and basophil

activation assays. In addition to their use in research and allergy diagnostics, human IgE antibodies may have therapeutic applications through defining specific allergenic epitopes that can be modified to produce hypoallergens or to derive specific inhibitors

of IgE antibody binding.⁷⁰ Basic research on the IgE repertoire, IgE B-cell transcriptomes, and sequencing

of high-affinity allergen specific IgE antibodies will facilitate the development of further functional reagents for potential use in allergy diagnostics.71-75

マルチプレックステクノロジーと「ラボオンチップ」ナノテクノロジーは、アレルギー診断用のマイクロアレイで使用されている 63,64。最も初期の最も広く使用されているマイクロアレイは、ガラススライド上に 112 のアレルゲンを持ち、4 つの血清のテストに使用できる 65。欧州連合が資金提供したプロジェクト「アレルギー発症メカニズム (MeDALL)」の下で、170 のアレルゲンのアレイが開発された (<http://medall-fp7.eu/>) 66。ほとんどのアレルギー診断メーカーは、分子診断を IgE に組み込んでいる。テストプラットフォーム、およびいくつかのバイオテクノロジーの新興企業が、より優れた、より高速な、患者中心の診断技術を開発するためにこの分野に参入している。IgE の測定が行われている幅広いアレルゲンにより、欧州アレルギー臨床免疫学アカデミーは、結果の解釈と臨床的重要性においてアレルギー専門医や他の臨床医を支援する 250 ページの分子アレルギーユーザーガイドを公開するようになった。32 欧州アレルギーアカデミー臨床免疫学ユーザーガイドには、分子診断を使用したアレルギー患者の診断後処理に関する推奨事項と、単一または複数のアレルゲン成分を使用したこのアプローチの利点と制限が含まれている 32。ジャーナルのこの号には、sIgE に使用される方法の詳細なレビューも含まれている。分子診断テスト 67。特に 100 アレルゲンの大きな静的アレイの場合の 1 つの欠点は、生成された IgE データの多くが個々の患者に関連しない可能性があることである。効率的なデータ処理は、食品、屋内アレルゲン、花粉、毒などのアレルゲングループ向けの柔軟で焦点を絞ったアレイの開発とともに、この問題を軽減する可能性があります 67。しかし、適切な診断には、常に臨床医が患者の特定の暴露と症状の病歴と関連情報を考慮する必要があり、特定の IgE だけがアレルギーのもっともらしい原因を示唆する 32。

製造業者は、新しい診断デバイスの開発においていくつかのハードルと課題に直面している 56。100 倍の精製されたナチュラルまたはリコンビナントアレルゲンを生み出すには、インフラストラクチャ、プロセス開発、および科学的専門知識への多額の投資が必要である。

一部の組換えアレルゲンは発現が困難です (例、雑草や杉の花粉からのペクチン酸リアーゼアレルゲン) 68。しかし、メーカーが直面する最も差し迫った課題は、アレルギー患者からの血清を IgE 結合検証研究のために調達することである。これには、通常、20~50 の血清が含まれる。個々のアレルゲン分子に対する 0.35~> 100 kU /L の IgE 抗体を持つ患者 63。これは、食物アレルゲンなど、子供に多く見られるアレルゲンでは特に困難です。すぐ助けに行くからね！ ヴァンダービルト大学の Smith らは、ダニ、猫、犬、アスペルギルス、および食物アレルゲン (ピーナッツ、牛乳、卵、カシュー、クルミ) に対するヒト IgE モノクローナル抗体のパネルを開発した。IgE モノクローナル抗体 (mAb) はアレルギー患者に由来している。

独自の技術を使用しているため、親和性の高い天然抗体であり、細胞培養または組換え抗体技術によって mg 量で産生できる 69。この目覚ましい技術革新により、ヒト IgEmAb は初めてアレルゲンの同定、IgE 抗体応答の定量化、分子参照標準、エピトープ分析、肥満細胞および好塩基球の活性化アッセイに使用される。研究およびアレルギー診断での使用に加えて、ヒト IgE 抗体は、低アレルゲンを産生するため、または IgE 抗体結合の特異的阻害剤を誘導するために修飾できる特定のアレルギー誘発性エピトープを定義することにより治療用途を持つ可能性がある 70。IgE レパートリー、IgEB 細胞トランスクリプトームに関する基礎研究、および高親和性アレルゲン特異的 IgE 抗体の配列決定により、アレルギー診断で使用できる可能性のあるさらなる機能性試薬の開発が容易になる 71-75

CONCLUSIONS

This review discusses the current state of allergenic extracts in the United States for diagnosis and with licensed products, immunotherapy. The process of standardization is complex, and maintaining high-quality extracts requires extensive work by developers and approval by the FDA. The value and utility of extracts of nonstandardized products depends on the identity of the source material and care in production and storage.

Purified or recombinant allergens can be used to provide a more detailed understanding of the individual allergic subject and the proteins that are the dominant allergens for them. As our knowledge builds and with the refinement of methods, we can improve diagnostic accuracy. In the future, we may be able to provide immunotherapy to the specific proteins that are dominant for the individual rather than relying on natural extracts.

結論

このレビューでは、診断のための米国におけるアレルゲン抽出物の現状と、認可された製品である免疫療法について説明した。標準化のプロセスは複雑であり、高品質の抽出物を維持するには、開発者による広範な作業とFDAによる承認が必要である。標準化されていない製品の抽出物の価値と有用性は、原料の正体と製造および保管における注意に依存する。精製または組換えアレルゲンを使用して、個々のアレルギー対象およびそれらの主要なアレルゲンであるタンパク質のより詳細な理解を提供することができる。私たちの知識が蓄積され、方法が洗練されるにつれて、診断の精度を向上させることができる。将来的には、天然の抽出物に頼るのではなく、個人にとって優勢な特定のタンパク質に免疫療法を提供できるようになるかもしれない。