

令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告 単球活性化試験法による新規発熱性物質試験法の開発*³

奥 輝明*¹, 菊池 裕*^{2, #}

A Novel Modified Monocyte Activation Test as an Alternative Method to the Pyrogen Test

Teruaki OKU*¹ and Yutaka KIKUCHI*^{2, #}

1 緒言

発熱性物質とは動物の体内で体温上昇を引き起こす物質の総称である。第十八改正日本薬局方（日局18）は一般試験法に発熱物質試験法¹⁾を収載しており、皮内、皮下及び筋肉内投与のみに用いるものを除いた注射剤が発熱性物質を含まず、微生物由来の発熱性物質に汚染されていないことや、発熱反応を惹起する溶出物が存在しないよう安全性評価や品質管理に用いられている。発熱性物質試験法は、ウサギの静脈内に被検試料を投与し、直腸の体温上昇により発熱性物質の有無を判定する。本試験法では、グラム陰性菌に由来する強力な発熱性物質のエンドトキシンのほか、グラム陽性菌のペプチドグリカンや外毒素、ウイルス、病原性真菌といった多くの外来性発熱性物質の検出が可能である。一方で、試験動物を用いる試験であることから、ウサギの個体差が生じること、ヒトとは感受性・感度が異なることなどが欠点として挙げられている。エンドトキシンはグラム陰性菌の外膜構成成分であるリポ多糖（Lipopolysaccharide, LPS）で、自然免疫を活性化させる様々な生物活性を有しているが、特に強力な発熱性物質として知られている²⁾。エンドトキシンの検出に特化した試験法として、原始生物であるカプトガニの血液凝固系のリムルス反応によるライセー

ト試薬を用いたエンドトキシン試験法が³⁾日局18一般試験法に収載されている。エンドトキシンは発熱中枢への直接作用の他に、単球や多形核白血球に作用しインターロイキン(IL)-1 β 、IL-6、インターフェロン(IFN)- α 、IFN- β 、TNF- α などの内因性発熱性物質を産生させることが知られている²⁾。

カプトガニの凝固系を利用したリムルス試験には①ゲル形成がエンドトキシン濃度に依存することに基づいたゲル化法、②ゲル化する際に生じる濁度変化を光学計にて測定する比濁法、及び③エンドトキシンによるライセート試薬の活性化を発色合成基質の切断にて検出する比色法があり、エンドトキシン試験法に記載されている³⁾。比濁法とゲル化法では0.25~0.015 EU/mL、比色法では0.02~0.0002 EU/mLのエンドトキシンが検出可能である。エンドトキシン試験法は高感度に発熱性物質のエンドトキシンを検出する有用な試験法であるが、他の発熱性物質を検出できない。

ウサギを用いた発熱性物質試験は、エンドトキシン以外の発熱性物質を検出可能だが、動物福祉などの観点から、欧州評議会欧州医薬品医療品質部門（European Directorate for the quality of medicines, EDQM）は、今後5年間で欧州薬局方（Ph.Eur）の59か所に記載されているウサギ発熱性物質試験法（Rabbit pyrogen test）を代替法に替える報道発表

*1 星薬科大学 東京都品川区荏原2-4-41 (〒142-8501)

Hoshi University, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

*2 千葉県立保健医療大学 千葉県千葉市美浜区若葉2-10-1 (〒261-0014)

Chiba Prefectural University of Health Sciences, 2-10-1 Wakaba, Mihama-ku, Chiba, Chiba 261-0014, Japan

*3 本研究は一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」事業により行ったものである。

責任著者 Corresponding author

(Press release) を2021年7月に発出した⁴⁾。エンドトキシン試験法やウサギを用いた発熱性物質試験法の欠点を補った代替法として、欧州薬局方は単球活性化試験法 (Monocyte activation test, MAT) を収載している⁵⁾。ヒト全血を用いるMATはエンドトキシン以外の発熱性物質を検出する手法として評価されており⁶⁾、Merck社は2010年に発熱性物質の刺激で全血のヒト末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) が産生するIL-1 β を測定するPyroDetectを上市している。同様にヒト単球系細胞株を用いたMATの有用性も報告され⁷⁾、2018年にヒト単球系細胞株Mono-Mac-6が産生するIL-6を測定するPyroMATがMerck社から上市された。現在は欧米でヒトPBMCやヒト単球系細胞株からなる複数のMAT測定キットが入手可能で、欧州薬局方に適合した発熱性物質試験の代替法として利用されている。最近、MATで測定した11種類の精製LPSと1種類のLipid Aを測定したエンドトキシン活性は、ライセート試薬を用いて測定した活性とよく相関していることが報告された⁸⁾。医薬品規制に関するガイドラインを調和する観点からも、欧州薬局方に収載されたMATを検証し、国内で適用可能な代替法として研究する意義は高い。本研究では、MATの有用性を評価し、医薬品、医療機器の品質管理や安全性評価に重要である発熱性物質試験法やエンドトキシン試験法の欠点を補い、高感度で迅速かつ簡便な新規試験法を開発することを目的とした。

2 実験方法

2.1 試薬

RPMI 1640培地、メルカプトエタノール (2-ME)、Phorbol 12-myristate 13-acetate、ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB懸濁液 (x100溶液、PSA)、ウシ血清アルブミン (BSA) は富士フイルム和光純薬株式会社より購入した。1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ (VtD3)、Tween 20はSigma-Aldrichより購入した。SureBlue TMB 1-component microwell peroxidase substrateはSeraCare Life Sciencesより購入した。ウシ胎児血清 (FCS) はLife Technologiesより購入した。

2.2 実験器具

全てのガラス器具は乾熱処理 (250°C, 2時間) し、脱パイロジェン化したものを用いた。プラスチック器具は、エンドトキシンフリー又はパイロジェンフリーの製品を用いた。エンドトキシン試験用水には、日本薬局方注射用水を用いた。

2.3 エンドトキシン

エンドトキシン (*Escherichia coli* ATCC 23501 [O3:K2a,2b(L):H2] 由来LPS) は、国立医薬品食品衛生研究所医療機器部長齋島由二博士から御供与いただいた。エンドトキシンの濃度は、日本薬局方エンドトキシン標準品 (JP-RSE, *E. coli* O113:H10:K negative由来; (一財) 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団) 及びEndospecy ES-50M Set (生化学工業株式会社) を用いて測定した。

2.4 細胞培養

ヒト単球株であるTHP-1細胞はJCRB細胞バンクより、Mono-Mac-6 (MM6) 細胞はDSMZ (ドイツ細胞バンク) より入手し、RPMI 1640培地 (10% FCS, 50 nM 2-ME, PSAを含む) にて培養した。また、THP-1細胞をPMA (5 nM) にて2日間刺激したものをdTHP-1細胞、MM6細胞をVtD3 (10 ng/mL) にて3日間刺激したものをdMM6細胞とした。

2.5 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

ELISAは、BioLegend社のELISAキット (human TNF- α 及びIL-6) を使用し、推奨プロトコールに準じて行った。96穴プレートに各細胞 (1 \times 10⁵ cells/well) を播種し、LPS (最終濃度0.1~10 EU/mL) を加え培養した (0~24時間)。その後上清を回収し、培養液中に含まれるTNF- α 又はIL-6の濃度をELISA法により測定した。また、健常人新鮮末梢血はヘパリン加血を回収後、RPMI 1640培地で5倍希釈して使用した。人体から取得された試料 (健常人新鮮末梢血) は、星薬科大学研究倫理委員会の承認を得て研究に用いた (研究倫理承認番号: H26-2)。

2.6 ルシフェラーゼ試験

pNL3.2.NK- κ B-REベクター (Promega) より, NK- κ B応答性配列及び最小プロモーター領域, NlucPを含む配列を切り出し, pLVSIN-CMV-purベクター (タカラバイオ) よりCMVプロモーター及びマルチクロニングサイトを除いたベクターに組込んだ (pLVSIN- NK- κ B-NL). HEK293FT細胞 (Invitrogen) に, pLVSIN-NK- κ B-NL及びViraPower Lentiviral Packaging Mix (Thermo Fisher Scientific) を導入し, 培養上清から回収したウイルス粒子をMM6細胞に感染させた. 細胞の選択にはPuromycin (2.5 μ g/mL) を使用し, 生存した細胞をMM6/NF- κ B-NL細胞とした. MM6/NF- κ B-NL細胞はVtD3を含む培地で3日間培養した後, 前述 (2.5) と同様にLPSにて刺激を行った. その後, Nano-Glo Luciferase Assay System (Promega) にて測定を行った. 測定には, マルチモードプレートリーダー (ARVO X2, PerkinElmer) を利用した.

3 利益相反

本研究に関連して開示すべき利益相反関係にある企業等はない.

4 結果

4.1 THP-1細胞及びMM6細胞のLPS刺激によるサイトカイン産生

THP-1細胞及びMM6細胞のLPS刺激 (3時間又は24時間) によるサイトカイン産生量をELISA法により測定した. 最終濃度10 EU/mLのLPSで刺激した場合, TNF- α は, 刺激3時間後のdMM6細胞の培養上清から最も多く (約450 pg/mL) 検出された (Fig. 1A). MM6細胞においても僅かに認められたが, THP-1細胞やdTHP-1細胞では検出されなかった. また, 刺激24時間後には, どの細胞においてもほとんど検出できなくなっていた. 次にIL-6のELISAの結果をFig. 1Bに示した. 刺激24時間後のdMM6細胞の培養上清より, 最も多く (約5000 pg/mL) 検出された. 刺激3時間後のdMM6細胞及び刺激24時間後のMM6細胞の培養上清より, 約1000 pg/mLのIL-6が検出されたが, THP-1細胞やdTHP-1細胞ではほとんど検出されなかった.

4.2 dMM6細胞の経時的なサイトカイン産生

次に, dMM6細胞を用いて, サイトカイン測定に適したLPS刺激時間を調べるために, 経時的 (0, 1, 3, 6, 12, 24時間) に培養上清を回収し, 同様にTNF- α 及びIL-6の産生量を測定した. LPSは,

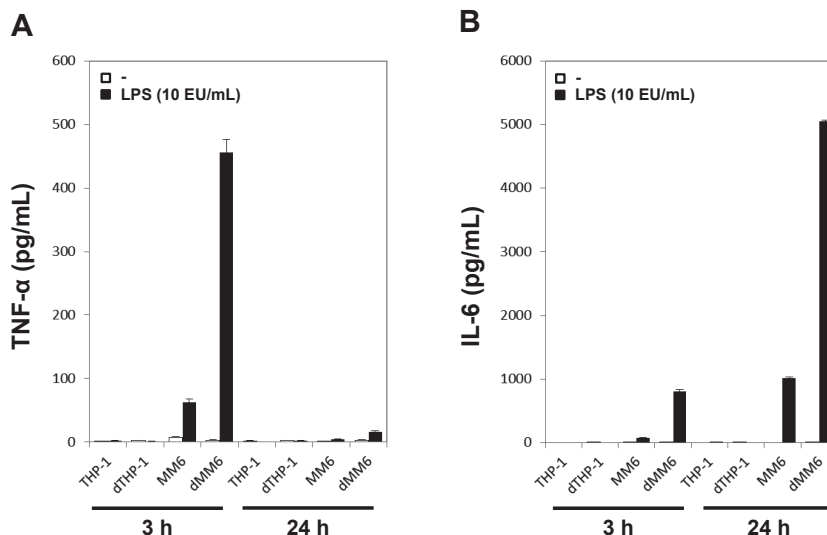


Fig. 1 LPS刺激した各種細胞におけるTNF- α とIL-6の産生

MM6細胞, dMM6細胞, THP-1細胞及びdTHP-1細胞を精製LPS (■) とエンドトキシン試験用水 (□) で刺激し, 培地中に産生されたTNF- α (A) とIL-6 (B) を3時間後及び24時間後に採取してELISAで測定した. 横軸に各種培養細胞を, 縦軸に産生量 (pg/mL) を平均値 \pm 標準誤差で示した.

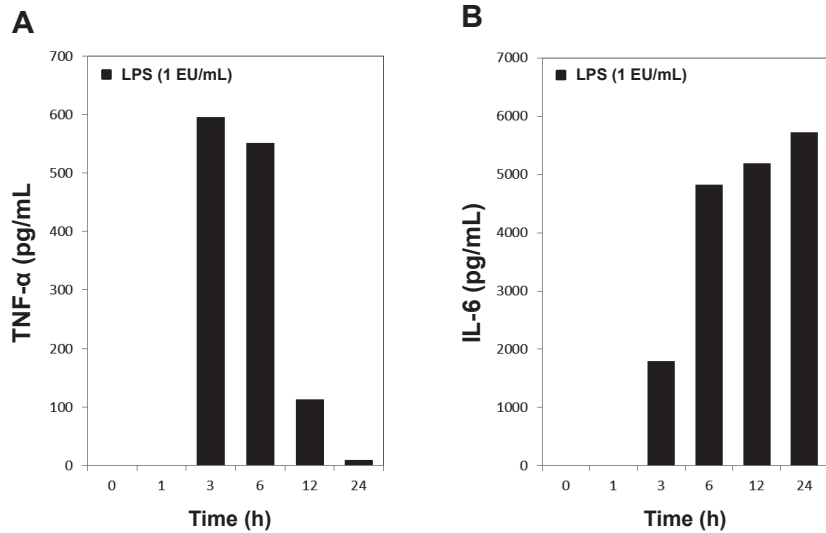


Fig. 2 LPS刺激したdMM6細胞の経時的なTNF- α 産生とIL-6の産生

dMM6細胞を精製LPS (■)で刺激し、培地中に産生されたTNF- α (A)とIL-6 (B)を経時的に採取してELISAで測定した。横軸に採取時間を、縦軸に産生量 (pg/mL)を平均値 \pm 標準誤差で示した。

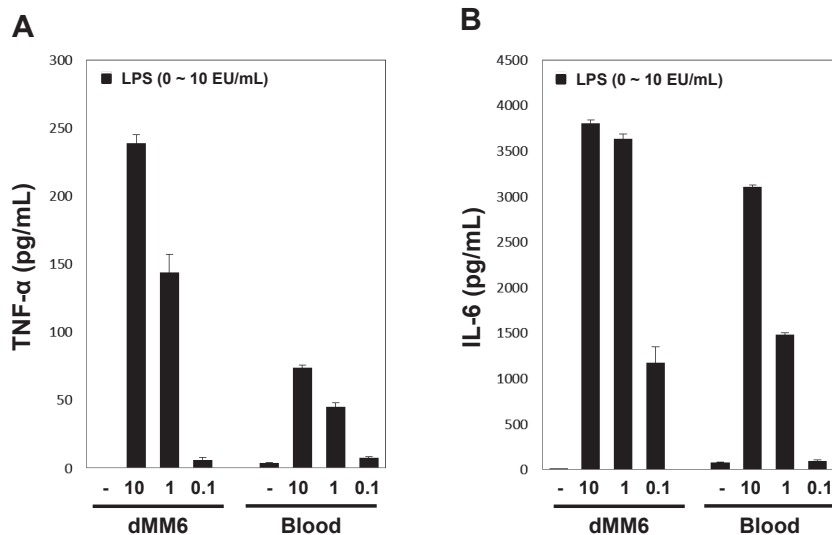


Fig. 3 LPS刺激したdMM6細胞及び健常人新鮮末梢血のTNF- α 産生とIL-6の産生

dMM6細胞と健常人新鮮末梢血を各種濃度の精製LPS (■)で刺激し、培地中に3時間後に産生されたTNF- α (A)と24時間後に産生されたIL-6 (B)を採取してELISAで測定した。横軸に精製LPSの濃度を、縦軸に産生量 (pg/mL)を平均値 \pm 標準誤差で示した。

最終濃度1EU/mLを用いた。その結果、TNF- α は刺激3時間後をピークとして、その後減少した (Fig. 2A)。一方、IL-6は、刺激3時間後から検出され経時的に増加した (Fig. 2B)。

4.3 dMM6細胞とヒト新鮮末梢血の比較

dMM6細胞及び5倍希釈健常人新鮮末梢血を用いて、LPS刺激 (0.1, 1, 10EU/mL)におけるTNF-

α (3時間)及びIL-6 (24時間)の産生量をELISA法にて測定した。その結果、dMM6細胞及び健常人新鮮末梢血は、LPS濃度依存的にTNF- α 及びIL-6の産生を誘導した (Fig. 3A, B)。また、dMM6細胞のサイトカイン産生量は健常人新鮮末梢血に比較して高かった。

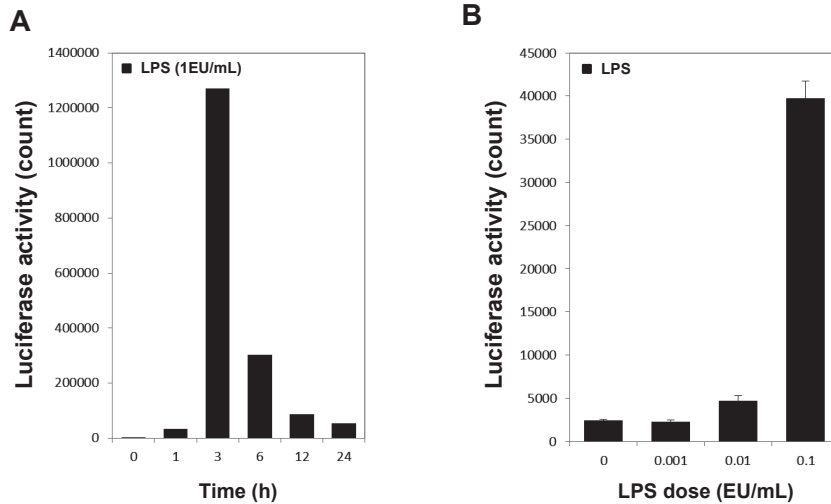


Fig. 4 LPS刺激したMM6/NF- κ B-NL細胞のルシフェラーゼアッセイ

A. MM6/NF- κ B-NL細胞を精製LPSで刺激し、経時的に細胞を回収してルシフェラーゼアッセイを行なった。横軸に細胞を回収した時間を、縦軸にルシフェラーゼ活性を平均値 \pm 標準誤差で示した。B. MM6/NF- κ B-NL細胞を各種濃度の精製LPSで刺激し、3時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。横軸に精製LPSの濃度を、縦軸にルシフェラーゼ活性を平均値 \pm 標準誤差で示した。

4.4 ルシフェラーゼアッセイによるLPSの検出

MM6/NF- κ B-NL細胞をVtD3にて培養した後、LPS (1 EU/mL)にて刺激し、経時的に細胞を回収してルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、LPS刺激3時間後にルシフェラーゼ活性は最大値を示し、その後消失した (Fig. 4A)。次に、本細胞のLPSの感受性について調べるために、LPS濃度希釈系列を作製し刺激時間3時間に測定を行った。その結果、LPS濃度0.01 EU/mLまで検出でき、無刺激又はLPS濃度0.001 EU/mLの約2倍のルシフェラーゼ活性であることが明らかになった (Fig. 4B)。

5 考察

発熱性物質であるLPSに起因する単球系白血病細胞株THP-1細胞及びMM6細胞のサイトカイン (TNF- α 及びIL-6)産生を測定したところ、MM6細胞の反応性が良いことが分かった。また、活性型ビタミンD3にてプレ刺激をすることでMM6細胞の反応性が増大することが示された (Fig. 1)。LPS刺激により産生されたTNF- α は刺激後3時間で最大値を示し、その後は時間経過と共に減少した。分泌されたTNF- α は培養液中で分解されていると考えられた。一方で、IL-6は培養液中に蓄積されると考えられ、サンプル回収の終点である刺激24時

間後が最大であった (Fig. 2)。活性型ビタミンD3で刺激したMM6細胞の反応性は、5倍希釈ヒト末梢血 (PyroDetectに相当)より高感度であり、0.1 EU/mLのLPSを用いた場合でもIL-6を十分に測定することができた (Fig. 3)。これは、2018年12月にMerck社よりPyroDetectの改良法として発表されたPyroMATと同様の方法であり、その検出感度も同程度であることが示された。そこで本法を、更に高感度で迅速・簡便・高感度へと改良するために、MM6細胞にNF- κ B応答配列とその下流にトゲオキヒオドシエビ (*Oplophorus gracilirostris*)由来のルシフェラーゼ遺伝子 (NlucP)を配置した遺伝子を導入した⁹⁾。本細胞を用いたルシフェラーゼアッセイより、LPS刺激3時間後にルシフェラーゼ活性の最大値を認めた (Fig. 4A)。次に、LPS濃度の検出限界を調べた。その結果、0.01 EU/mLのLPSが検出できることが明らかになった (Fig. 4B)。

ウサギを用いた発熱性物質試験の正確性及び簡便性を改善すると共に、試験動物を最小限に減らすことが望まれており、代替法の開発が進められている。本研究では、高感度で迅速かつ簡便な発熱性物質試験の開発を試みた。発熱性物質への感受性や応答パターンを考慮しヒト由来細胞を利用することを前提としたが、ヒト末梢血を用いた測定には、血液の供給源や安全性に配慮が必要であり、現実的には

困難であると考えられた。そこで本研究では、ヒト末梢血に代わる細胞の探索を行いMM6細胞が有用であることを示した。更に、このMM6細胞の応答性の解析にルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイ法を組み合わせることで、ELISAによる測定の必要がない、簡便で迅速な発熱性物質試験を考案した。本法は、測定の熟練度やプレート遠心機などの設備が不要であること、刺激終了後に即時に結果が得られることなど多くの利点が挙げられた。また、PyroMATでは、0.05 EU/mLのLPSを検出限界としているのに対して、本法では、0.01 EU/mLのLPSを検出することができた。以上より、本研究では、高感度かつ迅速・簡便な新たな発熱性物質試験の代替法が提案できた。

本研究では、発熱性物質のうちLPSに特化して解析を行ったが、本法はエンドトキシン試験とは異なり、ヒト単球系細胞を利用しているため、Toll様受容体 (TLR) などのパターン認識受容体を介して様々な病原体関連分子を認識することが可能であり^{10, 11)}、細菌のペプチドグリカンやウイルス核酸、真菌成分に対しても応答する。今後はLPS-TLR4以外のシグナル伝達経路を介する炎症性物質に対する詳細な解析を行い、より優れた炎症性物質試験であることを示す必要がある。

謝 辞

レポーターアッセイによる測定に御協力くださいました星薬科大学衛生化学研究室長谷川晋也博士に深く感謝いたします。エンドトキシン (*E. coli* ATCC 23501 [O3 : K2a, 2b (L) : H2] 由来LPS)を御供与くださいました国立医薬品食品衛生研究所医療機器部長配島由二博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省. 4.04 発熱性物質試験法. 第十八改正日本薬局方. 2021. p.121-122.
- 2) 棚元憲一. エンドトキシンと医薬品の品質管理. 国立医薬品食品衛生研究所報告. 2008, 126, p.19-33.

- 3) 厚生労働省. 4.01 エンドトキシン試験法. 第十八改正日本薬局方. 2021. p.112-115.
- 4) European Directorate for the quality of medicines. Outcome of the 170th session of the European Pharmacopoeia Commission, June 2021. https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/PressRelease/press-release-ph-eur-170th-ph-eur-commission-outcomes-june_2021.pdf.
- 5) European Pharmacopoeia. 2.6.3. Monocyte activation test. 2017, 9.2, p.4299-4304.
- 6) Hasiwa, N.; Daneshian, M.; Bruegger, P.; Fennrich, S.; Hochadel, A.; Hoffmann, S.; Rivera-Mariani, F.E.; Rockel, C.; Schindler, S.; Spreitzer, I.; Stoppelkamp, S.; Vysyaraju, K.; Hartung, T. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEX*. 2013, 30, p.169-208.
- 7) Nakagawa, Y.; Maeda, H.; Murai, T. Evaluation of the *in-vitro* pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytic cells; comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, 9, p.588-597.
- 8) Abate, W.; Sattar, A.A.; Liu, J.; Conway, M.E.; Jackson, S.K. Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with *Limulus* amoebocyte lysate based assays and a human monocyte activity assay. *J. Med. Microbiol.* 2017, 66, p.888-897.
- 9) Hall, M.P.; Unch, J.; Binkowski, B.F.; Valley, M.P.; Butler, B.L.; Wood, M.G.; Otto, P.; Zimmerman, K.; Vidugiris, G.; Machleidt, T.; Robers, T.M.; Benink, H.A.; Eggers, C.T.; Slater, M.R.; Meisenheimer, P.L.; Klaubert, D.H.; Fan, F.; Encell, L.P.; Wood, K.V. Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate. *ACS Chem. Biol.* 2012, 7, p.1848-1857.
- 10) Kawasaki, T.; Kawai, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* 2014, 5, 461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
- 11) Takeuchi, O.; Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation, *Cell*, 2010, 140, p.805-820.