

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

# 目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

## 培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発 に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 生物試験部  
研究者 村井 敏美

### 分担研究者

- |                       |       |
|-----------------------|-------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所生物試験部 | 中川ゆかり |
| (2) 昭和薬科大学薬学部         | 田中 彰  |
| (3) 生化学工業(株)機能化学品事業部  | 田中 重則 |
| (4) 日本油脂(株)油化学研究所     | 徳山 悟  |
| (5) 和光純薬工業(株)大阪研究所    | 高岡 文  |

### 要 旨

本研究で開発した新規インビトロ発熱性物質試験法は、諸種の発熱性物質のヒトに対する発熱性を的確に評価できるのみならず、複数の発熱性物質の複合汚染により生じる発熱相乗効果をも検出、評価できる可能性が示唆された。

#### 1. 研究目的

近年、ウサギを用いる発熱性物質試験法のインビトロ代替法として、カプトガニの血球凝固を基本原理とするエンドトキシン試験法が公定試験法に採用され、医薬品等の安全性評価法の一つとして普及、定着してきている。しかし、発熱を引き起こす物質はエンドトキシンのみではなく、ペプチドグリカン (PG) や細菌外毒素、ウイルス、ポリヌクレオチドなど、多種多様な発熱性物質が存在する。また、ウサギに対する発熱性は低くても、ヒトでは高い発熱を起こすような発熱性物質の存在も想定される。事実、エンドトキシン試験陰性でしかもウサギ発熱性物質試験でも陰性であったヒト成長ホルモン製剤が、ヒトで発熱を起こした事例がある(米国、原因物質は不明)。にもかかわらず、ヒトに対する発熱性を的確に評価できるようなインビトロ試験法の開発研究は、国内はもちろん欧米でもほとんど進んでいない。そこで本研究では、諸種の発熱性物質を漏れなく検出し、しかもヒトに対する発熱性を的確に評価できるようなインビトロ試験法を開発することを目的とした。新規試験法の開発に際し、試験原理が発熱という生体反応に立脚していることを必須の要件と考え、生体内での発熱性物質の一次標的細胞であるマクロファージ系の細胞を用い、この細胞から産生される発熱の一次メディエーター、すなわち発熱性(炎症性)サイトカインを測定指標とする試験法を構築することにした。初年度にはまず、試験用細胞株としてヒト単球様細胞株 MM6-CA8 を作出した。更に第2年度には、MM6-CA8 細胞の指標細胞としての有意性、有用性を検討する目的で、健康人末梢血の各種発熱性物質に対する *ex vivo* での応答性とこの細胞の応答性を比較検討した。その結果、両者の応答性が良く相関したことから、MM6-CA8 細胞はヒト体内における発熱性サイトカインの産生応答をシミュレートできる有意性の高い指標細胞であることが明らかとなった。この成績から、本細胞を用いることにより、各種の発熱性物質を広く検出でき、かつヒトに対する発熱性を的確に評価し得る新規試験法が構築できると考えられた。最終年度に当たる本年度には、この細胞を用いて構築した新規試験法につき、複数の発熱性物質が共存した場合の発熱相乗効果が検出できるか否かについて検討した。すなわち、微生物細胞壁に由来する PG や  $\beta$  グルカン ( $\beta$ G) は、同じく微生物細胞壁に由来するエンドトキシンと複合的に汚染する可能性が想定され、しかもその際には発熱を始めとする種々の毒性が相乗的に増強される危険性が以前より指摘されている。そのような相乗効果は、エンドトキシン試験法では捉えることができないため、試験法切換えに際して懸念される問題点の一つとなっている。そこで本研究では、そのようなエンドトキシンと他の発熱性物質の複合汚染による相乗効果の発現をまずウサギ発熱性物質試験で正確に把握し、更にその相乗効果が MM6-CA8 細胞を用いた新規試験法で検出できるか否かについて検討した。これらと同時に、新規試験法の開発を支援する研究として、PG および  $\beta$ G それぞれの特異的定量法確立に向けての基礎的な検討や、脂質系製剤材料に対するエンドトキシン試験法の適用性について検討した。

## 2. 研究方法

### (I) エンドトキシンと他の発熱性物質の共存による発熱活性の相乗効果

エンドトキシンと他の発熱性物質が共存したときに相乗効果が発現するか否かについて、ウサギ発熱性物質試験法、ヒト全血培養系および新規試験法（MM6-CA8 細胞培養系）で検討した。

発熱性物質：発熱性物質として、i) エンドトキシン：*E. coli* O55:B5 由来, Sigma、ii) Peptidoglycan (PG)：*Staph. aureus* 菌体より抽出精製、iii) Muramyl dipeptide (MDP)：Sigma、iv) *Staph. aureus* Cowan 1 ホルマリン処理菌体 (SAC)：Pansorbin, Calbiochem、v) poly I:C：Pharmacia、vi) CM-curdlan： $\beta$ -1,3-glucan ( $\beta$ G), 和光純薬工業、を用いた。

ウサギに対する発熱活性の測定：生理食塩液に溶解した各種発熱性物質を単独で、あるいはエンドトキシン溶液と混合したのち、ウサギに体重 1 kg 当たり 1 ml 投与し、体温自動測定装置を用いて投与後 5 時間まで体温（直腸温）を連続的に測定記録した。

ヒト全血培養系における IL-6 産生誘導活性の測定：健常人（実験者）より採血した新鮮末梢血を滅菌試験管に 225  $\mu$ l 分注し、各種発熱性物質溶液を 50  $\mu$ l 添加して 37°C で 4 時間培養した。培養後、生理食塩液を 725  $\mu$ l 加えて遠心し、得られた上清中のインターロイキン 6（IL-6）の濃度を ELISA で測定した。

MM6-CA8 細胞培養系における IL-6 産生誘導活性の測定：MM6-CA8 細胞を calcitriol（10 ng/ml）で 72 時間刺激してプライミングした後、 $1 \times 10^6$  cells/0.8 ml/well となるように 24-well プレートに播き、発熱性物質溶液を 0.2 ml 添加して 17 時間培養した。培養後、培養上清中の IL-6 の濃度を ELISA で測定した。

### (II) 新規試験法の開発を支援する研究

#### 1) 中枢神経系細胞に対する IL-6 のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成誘導能の検討

前年度の研究において、3 種の発熱性サイトカイン（IL-6, IL-1, TNF）のうち、新規試験法の測定指標としては IL-6 が最適であるとの結論を得た。これらのサイトカインは、中枢で血液-脳関門の欠如した OVLT 付近に作用し、発熱の最終メディエーターであるプロスタグランジン E<sub>2</sub>（PGE<sub>2</sub>）の合成を誘導すると考えられているがその詳細はなお明らかではない。そこで本年度においては、IL-6 の発熱活性測定指標としての意義をより明確にする目的で、IL-6 が中枢神経系細胞に対して果たして PGE<sub>2</sub> の合成を誘導するか否かについて検討した。中枢神経系細胞としてはヒト由来のグリア系細胞株である A-172 細胞（human brain glioblastoma, ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入、JCRB0228）を用い、IL-6 を培養液に添加して一定時間培養した後、細胞中および培養上清中の PGE<sub>2</sub> 濃度を EIA キットを用いて測定した。

#### 2) 病原性真菌細胞壁から調製した $\beta$ -グルカンの生物活性の解析

真菌の細胞壁にはエンドトキシンや PG は存在しない代わりに、発熱活性が疑われる物質として  $\beta$ -グルカンが存在する。この  $\beta$ -グルカンには様々な生物活性が報告されており、種々の局面で制御する必要性が指摘されている。近年、 $\beta$ -グルカンを特異的に検出できるリムルス試薬（リムルス G 因子活性化能測定試薬、ファンギテック G テスト MK：生化学工業）が開発され、精密な測定が可能となってきたが、リムルス活性と発熱などの生物活性との相関性についてはなお不明な点が多い。また天然には様々な構造の  $\beta$ -グルカンが存在し、その分岐の仕方や分子量が活性に影響を与えることがわかっているが、そのような構造-活性相関に関するシステムティックな検討はなされていない。本研究では、そのような検討にはしかるべき標準品の設定が不可欠であると考え、初年度には標準品候補物質として病原性真菌であるカンジダ（*Candida albicans*）から可溶性の  $\beta$ -グルカンを調製し、構造解析を行った。第 2 年度には、その生物活性の解析として、リムルス G 因子活性力価やマクロファージに対する IL-6 産生誘導活性などの *in vitro* における免疫賦活活性を調べた。本年度は、*in vivo* における免疫賦活活性として、白血球減少症モデルマウスにおける白血球数回復促進効果、担瘤マウスに対する延命効果、固形癌に対する抗腫瘍効果、アジュバント効果などについて検討した。

#### 3) ペプチドグリカン (PG) の SLP 試薬反応性と発熱性サイトカイン産生誘導活性の相関性の検討

エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁にのみ存在するが、PG はグラム陰性菌、陽性菌、いずれの細胞壁にも存在する発熱性物質である。エンドトキシンと比較すると PG の発熱活性は弱いが、エンドトキシンと共存するとエンドトキシンの発熱活性を増強することが報告されている。實際上、この両者が共存する可能性は少なくないことを考慮すると、PG の特異的検出法の確立は注射剤の安全性を確保する上で重要であ

る。既に、PGの定量試薬としてカイコ体液成分を利用したSLP試薬（和光純薬工業）が開発、実用化されているが、試薬に対する反応性と発熱活性との相関性はなお明らかではない。そこで、この相関性およびエンドトキシンに対する発熱活性増強作用を詳細に検討する目的で、各種細菌の細胞壁からPGを調製し、SLP試薬に対する反応性を調べた（初年度および第2年度）。本年度は、*Enterococcus faecalis*から抽出精製したPGをモデルとして選び、SLP試薬に対する反応性とヒト全血培養系における発熱性サイトカイン（IL-6, IL-1, TNF）産生誘導活性との相関関係を詳細に検討した。

#### 4) 脂質系製剤原料に対する発熱性物質試験法の適用性の検討

近年、最終製剤のみならず製剤原料や医薬品添加物についても安全性確保の面から高度の品質管理技術が求められつつあり、特に注射用途の場合、発熱性物質に対する管理が極めて重要となってきた。新剤形として注目を集めているリポソームやエマルジョンなどは、注射用製剤としての開発が活発化しているが、それらの主成分であるリン脂質や脂肪酸誘導体などの脂質系物質に対する発熱性物質試験法は未だ確立されていない。脂質系物質は両親媒性であり、水溶液中で複雑な挙動を示すことから、通常のエンドトキシン試験法では精度良く定量することができない。そこで本研究の初年度と第2年度においては、脂質系物質中のエンドトキシンの定量性を種々の角度から検討し、その解析結果から、分散剤としてポリアクリル酸ナトリウム（PANa）を添加することにより、エンドトキシンが極めて精度良く定量できることを見出した。本年度は、このPANaの有用性について、アシル鎖と塩基部分の異なる各種のリン脂質（ジミリスチルホスファチジルコリン：DMPC、ジミリスチルホスファチジルエタノールアミン：DMPE、ジミリスチルホスファチジン酸：DMPA、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン：DPPE、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン：DSPE、ジパルミトイルホスファチジン酸：DPPA、ジステアロイルホスファチジン酸：DSPA、卵黄ホスファチジルコリン：EPC、水添卵黄ホスファチジルコリン：HEPC、水添卵黄ホスファチジレリン：HEPS）をモデル検体とすることにより幅広く検討した。

### 3. 研究成果

#### 1) エンドトキシンと他の発熱性物質の共存による発熱活性の相乗効果

本研究で検討した各種の発熱性物質単独でのウサギに対する発熱活性をFig. 1に示した。エンドトキシン、ペプチドグリカン（PG）、MDPおよびpoly I:Cはいずれも高用量で2峰性の発熱を惹起したが、SACによる発熱は用量にかかわらず1峰性であった。合成β-グルカンであるCM-curdlanは発熱活性を示さなかった。次に、エンドトキシンとPGを同時投与したときの発熱相乗効果を検討した。エンドトキシン、PG共にほぼ最小発熱量となる組合せ（エンドトキシン0.001 μg/kg、PG 10 μg/kg）では、併用による発熱活性の増強は認められなかった（Fig. 2A）。PGの投与量を10倍量（100 μg/kg）とした場合も発熱増強効果は認められなかった（Fig. 2B）。そこでエンドトキシンの投与量も10倍量とし、いずれも1℃前後の発熱を惹起する中用量同士の組合せ（エンドトキシン0.01 μg/kg、PG 100 μg/kg）で投与したところ、発熱相乗効果が発現し、エンドトキシンあるいはPGを約10倍量単独投与したときと同程度の発熱が惹起された（Fig. 2C）。エンドトキシンとMDPの併用効果についても同様であり、いずれも1℃前後の発熱を惹起する中用量同士の組合せ（エンドトキシン0.01 μg/kg、MDP 50 μg/kg）

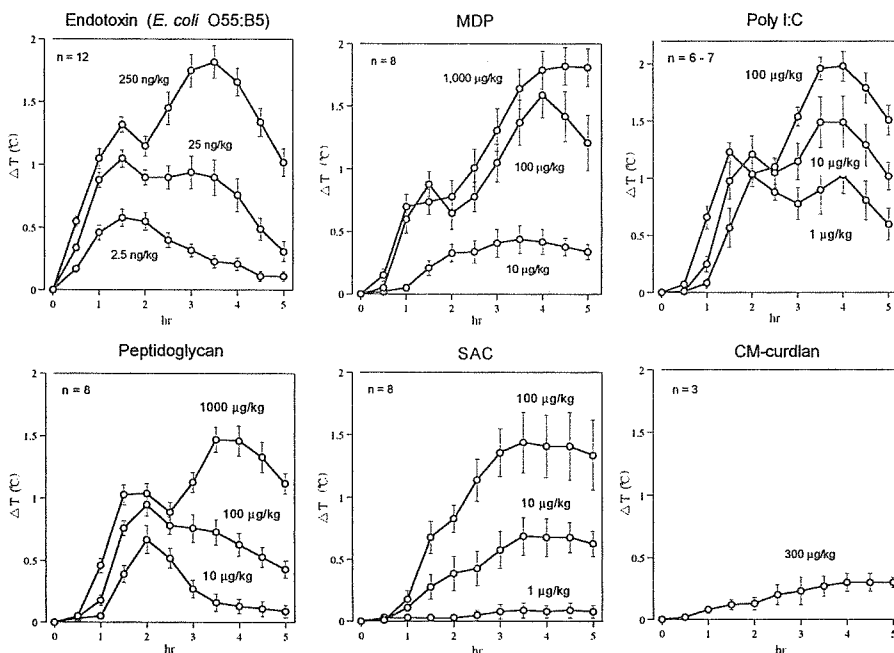


Fig. 1. Febrile responses of rabbits to various pyrogens.

れなかった（Fig. 2B）。そこでエンドトキシンの投与量も10倍量とし、いずれも1℃前後の発熱を惹起する中用量同士の組合せ（エンドトキシン0.01 μg/kg、PG 100 μg/kg）で投与したところ、発熱相乗効果が発現し、エンドトキシンあるいはPGを約10倍量単独投与したときと同程度の発熱が惹起された（Fig. 2C）。エンドトキシンとMDPの併用効果についても同様であり、いずれも1℃前後の発熱を惹起する中用量同士の組合せ（エンドトキシン0.01 μg/kg、MDP 50 μg/kg）

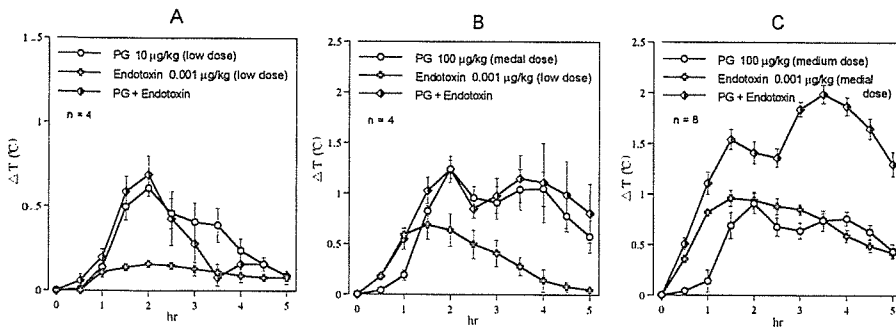


Fig. 2. Combined effects of various doses of peptidoglycan and endotoxin in rabbits.

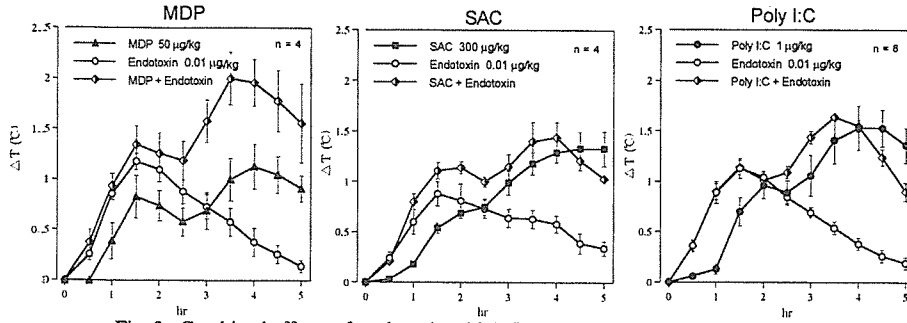


Fig. 3. Combined effects of endotoxin with MDP, SAC or Poly I:C in rabbits.

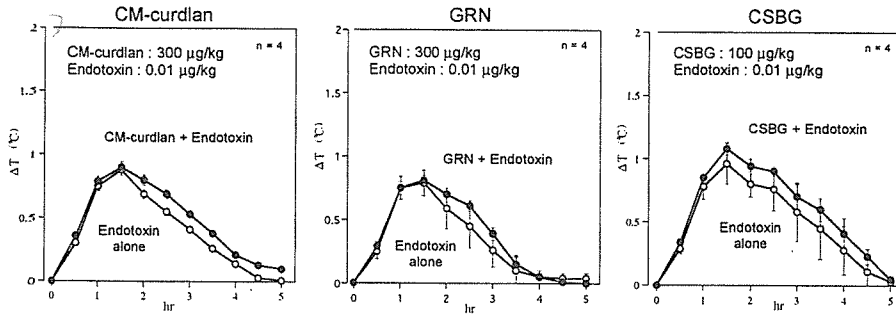


Fig. 4. Combined effects of endotoxin and three β-1,3-glycan preparations in rabbits.

で発熱相乗効果が発現したが<sup>8</sup> (Fig. 3 左)、いずれかの投与量を 1/10 (≒最小発熱量) とした場合には発熱相乗効果は認められなかった (データは省略した)。一方、SAC あるいは poly I:C とエンドトキシンを併用した場合には、組合せ用量にかかわらず発熱相乗効果は認められなかった

(Fig. 3 中、右)。次に β-グルカンとして、化学合成品である CM-curdlan、マイタケ由来の β-グルカン (GRN) およびカンジダ由来の β-グルカン (CSBG) を用い、これらとエンドトキシンの併用効果について検討した (後二者は著者らが調製した標品で、構造的にはいずれも β-1,6 結合を含む β-1,3-グルカンであることを確認した)。これらの β-グルカンは高用量 (100 μg ないし 300 μg/kg) でウサギに投与しても発熱を惹起せず (データは省略した)、また中用量のエンドトキシン (0.01 μg/kg) と併用してもエンドトキシンの発熱活性には全く影響を及ぼさなかった (Fig. 4)。

2) ヒト全血培養系および MM6-CA8 培養系におけるエンドトキシンと他の発熱性物質の併用効果  
上で確認されたエンドトキシンと PG、あるいはエンドトキシンと MDP の併用による発熱相乗効果が、ヒト全血培養系および MM6-CA8 培養系で、IL-6 の産生誘導を指標として捉えられるか否かについて検討した。Fig. 5 に示したように、ヒト全血 (HWB) 培養系においては、ウサギでの発熱と一致して、エンドトキシンと PG、およびエンドトキシンと MDP との組合せで相乗効果が認められ、それ以外の組合せでは相乗効果は認められなかった。一方、MM6-CA8 培養系では、エンドトキシンと MDP の併用による相乗効果は認められたが、エンドトキシンと PG の併用による相乗効果は発現せず、この点において発熱および HWB 培養系での成績とは

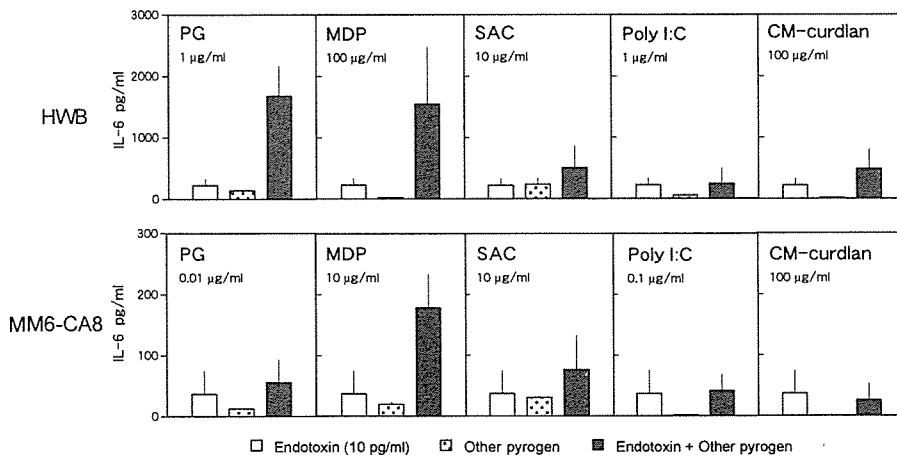


Fig. 5. Combined effects of endotoxin and other pyrogens in HWB and MM6-CA8 culture system.

完全に一致しないことが明らかとなった。

### 3) 中枢神経系細胞に対する IL-6 のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成誘導能

ヒト由来のグリア系細胞株 A-172 細胞を、各種濃度に IL-6 を添加した培養液で 48 時間培養したときの細胞内および細胞外 (培養上清中) の PGE<sub>2</sub> 濃度を Fig. 6 に示した。

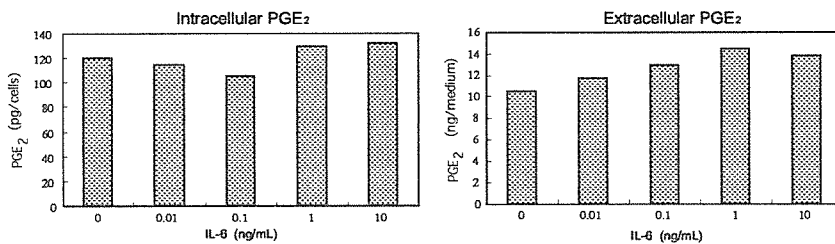


Fig. 6. PGE<sub>2</sub> production by A-172 cells in response to IL-6.

細胞内および細胞外 (培養上清中) の PGE<sub>2</sub> 濃度を Fig. 6 に示した。細胞内の PGE<sub>2</sub> 濃度には有意な変化は認められなかったが、培養上清中の PGE<sub>2</sub> 濃度は添加した IL-6 の濃度に依存して増加した。この成績から、IL-6 は内因性発熱物質として、ヒトグリア細胞に対して発熱の最終メディエーターである PGE<sub>2</sub> の合成を誘導することが強く示唆された。

### 4) 病原性真菌細胞壁から調製した β-グルカンの in vivo における免疫賦活活性

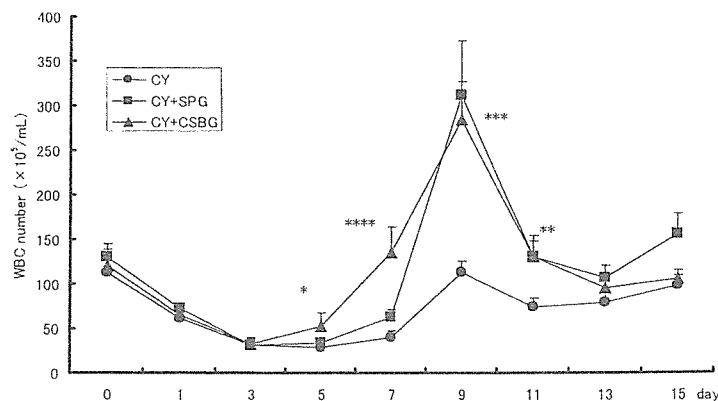


Fig. 7. Effect of SPG or CSBG Administration on White Blood Cell Number in Cyclophosphamide-Induced Leukopenic Mice.

Cy (200mg/kg) was administered i.p. to ICR mouse (male, 5weeks old) on day0. Immediately after Cy administration, SPG, CSBG (250 μg/mouse) was administered i.p. to these mice. White blood cell number was counted on days0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 and 15 by mixing blood (5 μL, tail vein) with Turk's solution (95 μL). Values represent mean ± SD. Significant difference from Cy. \*p<0.05. \*\*p<0.01. \*\*\*p<0.005. \*\*\*\*p<0.0005

●: Cy (200mg/kg) ■: Cy (200mg/kg) + SPG (250 μg/mouse) ▲: Cy (200mg/kg) + CSBG (250 μg/mouse)

シクロフォスファミド (200 mg/kg) をマウスに腹腔内投与することによる実験的な白血球減少症モデルにおいて、カンジダ細胞壁より調製した β-グルカン (CSBG, 250 μg/mouse) をシクロフォスファミドと同時に投与することにより、投与 7 日目以降における白血球数の回復が著明に促進された (Fig. 7)。またその効果は、スエヒロタケより調製した β-グルカン (SPG) 投与による効果と同程度であった。その他、データは省略するが、CSBG (250 μg/mouse) を腹腔内投与することにより、S-180 腹水癌マウスに対する延命効果や、S-180 固形癌に対する抗腫瘍効果、アジュバント効などが得られる

ことが確認された。

### 5) ペプチドグリカン (PG) の SLP 試薬反応性と発熱性サイトカイン産生誘導活性の相関性

先ず、溶液中での PG の分散状態が SLP 反応性に及ぼす影響を調べる目的で、*Enterococcus faecalis* 由来の PG を 1 mg/ml 濃度に懸濁し、

バス型超音波照射装置で超音波照射したときの SLP 反応性の変化を調べたところ、照射時間と共に PG の SLP 反応性は大きく上昇し、60 分間の照射では反応性は照射前の約 20 倍に達することが分かった。次に、このような超音波照射による

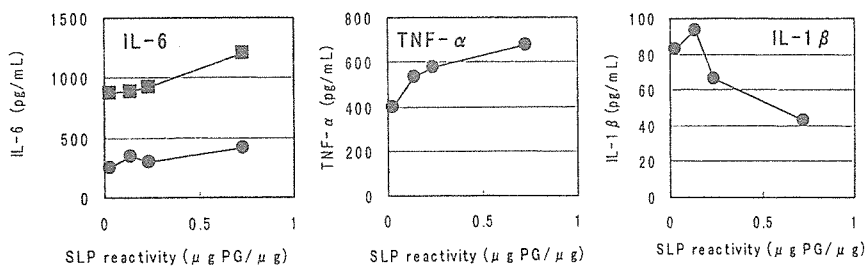


Fig. 8. Relationship between SLP reactivity and cytokine inducibility of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan.

SLP 反応性の上昇に相関して、PG の発熱性サイトカイン産生誘導活性が上昇するか否かについて、ヒト全血培養系で検討した。Fig. 8 に示したように、IL-6 および TNF-α の産生誘導活性は SLP 反応性の上昇と共に増加したが、その増加は僅かであり、SLP 反応性ほど大きくは上昇しなかった。IL-1 産生誘導活性については、SLP 反応性との相関は認められなかった。

### 6) リン脂質のエンドトキシン試験におけるポリアクリル酸ナトリウム (PANA) 添加の効果

各種のリン脂質を、(I) アルキル鎖長が同一 (C<sub>14:0</sub>) で塩基部分が異なるもの、(II) 塩基部分が同一

Table 1. Recovery rate of the added endotoxin to phospholipid dispersions.

Group	Phospholipids	Endotoxin recovery (%)	
		Distilled water	Saline containing PANa
I	DMPC	19.9	92.2
	DMPE	10.2	116.7
	DMPA	14.7	110.4
II	DMPE	10.2	116.7
	DPPE	8.8	101.3
	DSPE	17.1	111.2
III	DMPA	14.7	110.4
	DPPA	19.8	104.6
	DSPA	13.2	113.9
IV	EPC	14.8	104.9
	HEPC	5.2	97.1
	HEPS	49.6	112.2

(ホスファチドレタノール7ミン) でアルキル鎖長が異なるもの (C14:0、C16:0、C18:0)、(III) 塩基部分が同一 (ホスファチジン酸) でアルキル鎖長が異なるもの (C14:0、C16:0、C18:0)、(IV) 天然由来のリン脂質、の4群に分類し、それらを蒸留水に分散した場合と PANa 添加生理食塩水に分散した場合について、エンドトキシンの添加回収率をエンドトキシン試験法により検討した。その結果、Table 1 に示したように、リン脂質を蒸留水に分散した場合には、いずれの群においても添加したエンドトキシンの大部分が回収されず、回収率は20%以下の低い値にとどまった。一方、リン脂質を PANa 添加生理食塩水に分散すると、アルキル鎖長や塩基部分の種類に関係なく回収率は劇的に改善され、いずれの群においても添加したエンドトキシンのほぼ 100% が回収された。

#### 4. 考 察

本研究では、生体内での発熱性物質の主たる標的細胞であるマクロファージ系の株化細胞を用い、この細胞が産生する発熱の一次メディエーター (発熱性サイトカイン; IL-6, TNF, IL-1) の産生を指標とすることによって、ヒトに対する発熱性を的確に評価できるような有意性の高いインビトロ発熱性物質試験法を開発、標準化することを目的とした。開発に際しては、試験法の構成成分である細胞と測定指標の選定が重要なポイントとなるが、それ以上に、構築した試験法の有意性と有用性をどの様に検証するかが重要な課題となる。

初年度においては、指標細胞として MM6-CA8 細胞を開発し、この細胞が各種の発熱性物質に鋭敏に反応すること、特にエンドトキシンに関しては既存のエンドトキシン試験法 (リムルス試験法) にほぼ匹敵する高い検出感度を備えていることを明らかにした。更に第2年度においては、ヒト生体内でのサイトカイン産生応答をシミュレートできる系としてヒト全血培養系を構築し、この系の応答性と MM6-CA8 細胞培養系の応答性とを比較検討することにより、MM6-CA8 細胞はヒト生体内における炎症性サイトカインの産生を的確に評価できる有意性の高い指標細胞であることを明らかにした。なお測定指標としては、検出感度および定量精度において IL-6 が最も優れていることを示した。最終年度に当たる本年度は、新規試験法に期待される性能の一つとして、エンドトキシンと他の発熱性物質が共存した場合の発熱相乗効果が検出できるか否かを検討した。

エンドトキシンと各種の発熱性物質との組合せにおいて、実際にウサギで発熱相乗効果が認められたのはエンドトキシンと PG、およびエンドトキシンと MDP の組合せであった。こらら二つの組合せによる発熱相乗効果が、ヒト全血培養系および MM6-CA8 培養系で IL-6 の産生誘導を指標として捉えられるか否かを検討した結果、ヒト全血培養系ではこれらの相乗効果が両方とも捉えられたが、MM6-CA8 培養系ではエンドトキシンと PG の組合せによる相乗効果が捉えられないことが判明した。これら二つの組合せによる相乗効果の発現機序は今のところ明らかではないが、エンドトキシンと MDP の組合せによる相乗効果については、MM6-CA8 細胞単独培養系で捉えられることから、おそらく単球のレベルでエンドトキシンと MDP が相互作用することにより相乗効果がもたらされるものと考えられた。一方、エンドトキシンと PG の組合せによる相乗効果は、ヒト全血培養系で捉えられるにもかかわらず MM6-CA8 培養系では捉えられないことから、単球以外の細胞、例えば T リンパ球が直接、あるいはサイトカインネットワークを介して間接的に、相乗効果の発現にかかわっている可能性が考えられた。

以上のように、MM6-CA8 細胞を用いた新規試験法は、エンドトキシンと他の発熱性物質との混合汚染による発熱相乗効果の検出にも有用であるが、発熱性物質の種類によっては相乗効果を検知できない場合もあることが判明した。そのような検知できない相乗効果にもし単球以外の細胞成分が関わっているとすれば、その細胞を特定し、セルライン化して MM6-CA8 培養系に添加することによって相乗効果が検知可能となる



可能性は十分期待できる。そのような観点から、より完成度の高い *in vitro* 発熱性物質試験法の確立、更には試験法の標準化を目指して、今後更に検討を重ねる予定である。なお MM6-CA8 細胞については、本年度まで約 150 代の継代を重ねた結果、発熱性物質に対する応答性などの細胞性状が非常に安定していることが確認された。したがって将来的には、本細胞を当該試験法の標準指標細胞として公的な細胞バンクに登録し、国内外に広く供給したいと考えている。

以下に、新規試験法の開発支援に関する研究成果について考察する。

本研究において、MM6-CA8 細胞を用いた新規試験法の測定指標として選んだ IL-6 は、内因性発熱物質として、ヒトグリア細胞に対して発熱の最終メディエーターである PGE<sub>2</sub> の合成を誘導することが強く示唆された。この成績は、IL-6 の本試験法における測定指標としての意義をより明確にするもとの考えられた。

カンジダ細胞壁由来の  $\beta$ -グルカン (CSBG) は、*in vitro* のみならず *in vivo* においても各種の免疫賦活性を発揮することが本年度の研究により明らかとなった。このような免疫賦活活性はマイタケなどのキノコ類から抽出した  $\beta$ -グルカン ( $\beta$ -1,3-glucan) にも共通するものであり、病原性真菌由来であるが故の特性は本研究の範囲内では認められなかった。しかし、今後新たな特性あるいは毒性が見いだされる可能性は十分考えられることから、医薬品の安全性確保の一環として、CSBG のような病原性真菌由来の  $\beta$ -グルカンを標準品として設定し、試験法を確立する意義は大きいと考える。更に本研究では、従来懸念されていた  $\beta$ -グルカン自体の発熱活性、あるいは  $\beta$ -グルカンによるエンドトキシンの発熱活性の増強はいずれも否定された。しかし、強い免疫賦活活性を有する以上、発熱は惹起しなくても、患者の病態によっては有害な活性を発揮する可能性は十分考えられる。したがって、各種の注射剤について、 $\beta$ -グルカンの混入を制御することの是非については、今後更に慎重に検討を重ねる必要がある。

一方 PG に関しては、それ自身発熱活性を有するのみならず、エンドトキシンと共存することにより発熱相乗効果が発現することが確認された。したがって PG については特異的な定量法を早急に確立する必要がある。本研究では、その定量法としてカイコ体液成分を利用した SLP 試薬の適用性を検討した。その結果、PG の分散状態によって SLP 反応性は大きく影響されるが、サイトカイン産生誘導活性はそれほど影響されないことが判明した。この成績から、SLP 反応性を PG の生物活性の指標として測定する場合には、超音波処理等により PG を十分に分散させた状態で測定する必要があることが示唆された。今後 PG の特異的定量法の確立に向けて、更に検討を重ねる予定である。

最後に、発熱性物質試験法の確立が緊急に求められている脂質系製剤原料の一つ、リン脂質についてのエンドトキシン試験法を本研究において確立した。両親媒性であるリン脂質は超音波照射により分子会合体であるリポソームを形成するが、一方、エンドトキシン分子も両親媒性のリポ多糖であり、水中ではリン脂質分子と同様に分子会合状態にあると考えられる。したがって、リン脂質とエンドトキシンが共存する場合、両分子間に相互作用が起り、エンドトキシンの検出効果が著しく低下すると推測される。事実、本年度においてアシル鎖と塩基部分の異なる各種のリン脂質について広く検討した結果、リン脂質を蒸留水に分散した場合には、いずれのリン脂質についても添加したエンドトキシンの 20% 程度しか検出できなかった。しかし、初年度に見出した方法として、リン脂質の分散媒として生理食塩水を用い、更に分散剤として PANa を加えることにより、どのリン脂質についても、添加したエンドトキシンのほぼ 100% が検出可能となることが確認された。この成果は、脂質系製剤および油性原料へのエンドトキシン試験法の適用の道を拓くものであり、リポソームなど今後の医療において重要な製剤の安全性確保に大きく貢献するものと考えられる。

## 5. 結 論

ヒト単球様細胞株 MM6-CA8 を用いた新規 *in vitro* 発熱性物質試験法は、諸種の発熱性物質のヒトに対する発熱性を的確に評価できるのみならず、複数の発熱性物質の複合汚染により生じる発熱相乗効果をも検出、評価できる可能性が示唆された。MM6-CA8 細胞については、約 2 年間にわたり 150 代以上の継代を重ねた結果、発熱性物質に対する応答性などの細胞性状が非常に安定していることが確認された。将来的には、本細胞を当該試験法の標準指標細胞として公的な細胞バンクに登録し、国内外に広く供給したいと考えている。本試験法のように、製剤中のあらゆる発熱性物質を総量として検出、評価する方法の開発に加えて、

細菌細胞壁由来の発熱性物質ペプチドグリカンの特異的な定量法の開発や、強い免疫賦活作用を有する真菌由来の $\beta$ -グルカンの特異的定量法確立に関しても一定の成果を得ることができた。更には、発熱性物質試験法の確立が緊急に求められている脂質系製剤原料について、エンドトキシン試験法を適用可能とする方法を見出した。これらの成果は、今後の新規医薬品の開発、新しい剤形の出現、新素材による医療用具の開発などに対応し、それらの安全性を確保する上で少なからず貢献するものと期待される。

## 6. 研究発表

該当なし。

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社