

In vitro 発熱性物質試験 —単球活性化試験(Monocyte Activation Test, MAT)—

成田和人

1. はじめに

発熱性物質は体内で体温上昇を引き起こす物質のことであり、主に細菌やウイルス、菌類等の微生物に由来する。医薬品や医療機器の発熱性物質汚染は深刻な健康被害につながるため、医薬品に発熱性物質が混入していないこと、また、医療機器などに発熱反応を起こすような溶出物が存在しないことを試験することは安全性評価項目として非常に重要である。

現在、発熱性物質試験はウサギを用いた試験法(Rabbit Pyrogen Test, RPT)が一般的に行われている。RPTは、試験液をウサギ3匹に静脈注射し、注射直前の直腸温と比べ3匹の体温上昇度の合計が2.5℃以上であった場合、試験液中に発熱性物質が存在すると評価する試験法である¹⁾。RPTはヒトとの種差を考慮する必要があるものの、生体の発熱反応を直接評価できるため信頼性の高い試験と考えられる。一方、実験動物の体温上昇を直接的に評価する試験であることから、動物および実験施設の高度な管理が必要であり、試験法として煩雑であることが課題として挙げられる。さらに、ウサギの個体差や動物福祉上の問題なども課題と考えられる。動物を直接用いない試験方法としてエンドトキシン試験(Bacterial Endotoxins Test, BET)が挙げられる。BETは、カプトガニの血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用い、エンドトキシンを高感度に検出可能な試験法である。BETは代表的な発熱性物質であるグラム陰性菌由来のエンドトキシンを検出することを目的とした試験法であるため²⁾、グラム陽性菌や真菌由来の発熱性物質などの非エンドトキシン性発熱性物質(Non-Endotoxin Pyrogen, NEP)を検出できない可能性が指摘されている³⁾。そのため、BETはエンドトキシンを

対象とした発熱性物質試験として位置づけられている。

単球活性化試験(Monocyte-activation test, MAT)は、生体の発熱反応における単球の役割に着目した試験法の総称である。MATはエンドトキシンだけでなくNEPの検出も可能なため、ヒトの発熱性を的確に検出できると考えられている³⁾。MATは2010年に欧州薬局方(European Pharmacopoeia, EP)に収載され、2012年には米国食品医薬品局(Food and Drug Administration, FDA)の業界向けガイダンスにも記載され、RPTの代替法としての利用が期待されている。また、EPでは2026年にRPTをMATに置き換えることを目指し議論が進められている。

しかし、日本ではMATの研究開発や導入が十分に進んでおらず、有用性や技術的課題などの理解が十分に進んでいない。事実、2010年に発熱性物質試験評価委員会は、MATはRPTとの互換性について不明な点が多く、MATをRPTの代替法とするには問題があると結論付けている³⁾。

そこで、本稿ではMATの原理である単球の活性化機序について改めてまとめるとともに、現在、日本で入手可能なヒト単球系株化細胞を用いたMATキットの特徴について紹介する。

2. 発熱性物質の作用機序

2.1 生体における発熱のしくみ

発熱性物質、特に微生物の代謝産物に由来する発熱性物質が体内に侵入すると、単球などの免疫細胞からInterleukin(IL)-1, IL-6, Tumor necrosis factor(TNF)- α といった炎症性サイトカイン(内因性発熱性物質)が産生される。内因性発熱性物質は脳血管内皮細胞に作用することで、シクロオキシゲナーゼ酵素の作用を介して細胞膜のリン脂質からアラキドン酸を切り出し、脂質メ

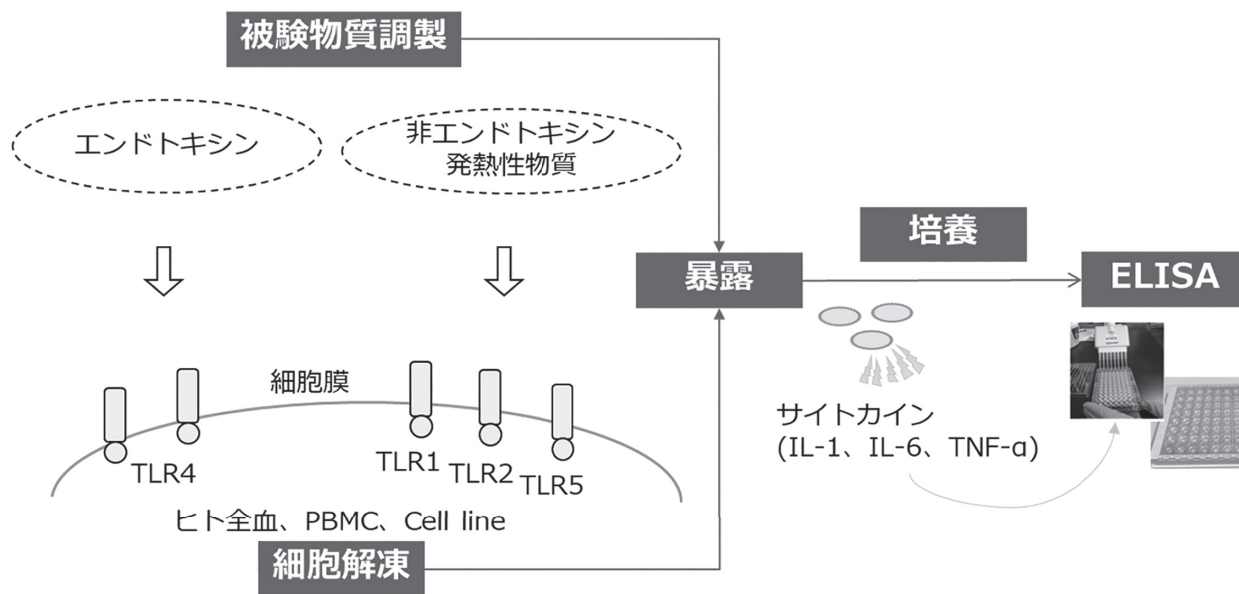


図1 MATの試験フロー

ディエーターのプロスタグランジン E_2 の合成を促進する。プロスタグランジン E_2 が体温調節を担う中枢神経系の視床下部にある視索前野に作用することで、体温のセットポイントを高く設定する^{4,5)}。その結果、生体はこのセットポイントに合わせるように皮膚の血管を収縮させ熱の放散を防いだり、褐色脂肪組織を燃焼させたり、筋肉を震わせるなどして熱を生み出すことで体温を上昇させる。

この一連の発熱メカニズムにおいて、初期応答の重要なイベントとなるのが単球系細胞による炎症性サイトカインの産生といえる。

2.2 発熱性物質による単球の活性化機序

体内に侵入した病原性微生物に対し起こる初期の免疫機構を自然免疫と呼び、マクロファージや樹状細胞などの単球系細胞や好中球などの顆粒球といったミエロイド系細胞は其中でも最初に応答する免疫細胞である。マクロファージに代表される食細胞が微生物を貪食すると、細胞膜やエンドソーム内に発現している Toll like receptor (TLR) がそれぞれ特異的なリガンドの分子パターンを認識する。特に、エンドトキシン、すなわち Lipopolysaccharide (LPS) は、TLR4 のリガンドであり、この TLR4 からレセプターとシグナル伝達分子の会合を仲介するアダプタータンパク質の Myeloid differentiation primary-

response protein-88 (MyD88) を介してセリン / スレオニンキナーゼの IL-1 受容体関連キナーゼ (IL-1 receptor-associated kinase, IRAK) を活性化させる。その結果、アダプタータンパク質の Tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF-6) が Nuclear Factor (NF)- κ B と Mitogen-activated protein kinase (MAPK) を活性化させ、活性化された NF- κ B が核内に移行することで、その標的遺伝子である IL-1 や IL-6 といった炎症性サイトカインの mRNA 発現量を増加させる^{6,7,8)}。この一連の細胞内シグナル伝達により IL-6 などの内因性発熱性物質が産生される。

3. 単球活性化試験 (Monocyte-activation test, MAT)

3.1 原理

MAT は単球系細胞に被験物質を暴露した際に産生される炎症性サイトカインを測定する試験法である (図1)。試験には、ヒト血液から採取、培養、凍結保存したヒト単球系細胞を用いる。上述の通り、発熱のメカニズムにおいて、単球系細胞の活性化、特に炎症性サイトカインの産生は重要な初期応答であり、エンドトキシン活性と単球系細胞の活性化による炎症性サイトカインの産生量の相関性を利用した試験法である。単球系細胞の TLR は、LPS のレセプターである TLR4 の他

にも様々な病原体特異的な分子パターンを認識する。例えば、TLR2はグラム陽性菌の細胞壁成分に存在するリポタイコ酸やペプチドグリカン、TLR3はPoly(I:C)といったウイルスに由来する二本鎖RNAを、TLR5は細菌鞭毛構成タンパク質であるFlagellinをそれぞれ認識する。TLRは刺激されたレセプターの種類によらず、その後のシグナル伝達はNF- κ BとMAPKの活性化という共通の経路をたどる。そのため、MATはエンドトキシンだけではなくNEPの評価も可能とされている。

3.2 試験手順

MATの目的は、医薬品などに含まれる発熱性物質の量が患者の安全を保障する汚染物質限界濃度(Contaminant Limit Concentration, CLC)を超えていないことを確認することである。すなわち、MATは、被験物質中の発熱性物質濃度がCLC未満であればその被験物質を適合と判定する試験法である。CLCは、被験物質の生理活性単位あたりのエンドトキシン換算(Endotoxin equivalent)で示される。エンドトキシン換算値はエンドトキシン標準品(Reference Standard Endotoxin, RSE)を用いて作成された標準曲線(Standard curve)から定量的(Method A)もしくは半定量的(Method B)に算出される。また、RSE標準曲線を用いずに、バリデーション済みの他のロットとの測定値の比較により評価を行う方法(Method C)を選択することも可能である。試験方法および試験濃度の選択は、以下の反応干渉因子の確認結果から決定する。

3.3 反応干渉因子の確認

MATを用いて被験物質中の発熱性物質を測定するためには、被験物質に含まれる反応干渉因子の影響を正確に評価する必要がある。すなわち、被験物質が有する作用がMATの評価系に影響しないことを確認する必要がある。MATの評価系に影響する例として、細胞毒性作用を持つ製剤や免疫活性あるいは抑制作用を持つ製剤などがある。これらの製剤は単球系細胞の炎症性サイトカイン産生に影響を与える。そのため、細胞毒性や免疫活性あるいは免疫抑制作用が見られない濃度まで被験物質を希釈し試験を実施する必要がある。

反応干渉因子の影響が認められないと判断する

基準として、既知濃度のRSEを被験物質に添加した時の回収率が用いられる。RSEを添加した被験物質と標準曲線中の同一濃度のRSE測定値を比較し、添加回収率が50~200%の範囲内となるとき被験物質中に反応干渉因子は認められないと判断する。

ただし、被験物質は最大有効希釈倍率(Maximum Valid Dilution, MVD)を超えて希釈することはできない。MVDは、CLCを評価可能な限度を示しており、下の式の通り、被験物質のCLCおよび各MATキットの検出限界(Limit of Detection, LOD)に基づき算出される。

$$MVD = \frac{CLC \times C}{LOD}$$

MVD:最大有効希釈倍率, CLC:汚染物質限界濃度, C:被験物質の試験濃度, LOD:検出限界

また、エンドトキシンと比べ、非エンドトキシン性発熱性物質は非線形または急激な用量反応となることがあるため¹⁰⁾、MATで非エンドトキシン性発熱性物質を評価する場合は可能な限り低い希釈倍率で試験を実施する必要がある。

もし、MVDを超えない希釈倍率で反応干渉因子の影響を回避することができない場合、Method Cを用いてロット間の比較による評価を行う。

3.4 MATキットの特徴

MATでは、全血、末梢血単核細胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMC)、単球系株化細胞の中から使用する細胞ソースを選択する。ヒト血液などを用いる場合は最低4名のドナーすべてで適合の判定が得られなければならない。本稿では、取扱いが容易で国内で製品として入手可能なヒト単球系株化細胞を用いた2つのMATキットについて、その特徴をまとめた(表1)。

1) PyroMAT™ System

PyroMAT™ SystemはMerck社から国内外に販売されている。PyroMAT™ Systemは、ヒト急性単球性白血病由来の株化細胞Mono-Mac-6(MM6)を用いたMATキットである。解凍直後のMM-6に被験物質を暴露し、37℃で22時間培養した後の培養液中に放出された

表1 PyroMAT™ SystemとMylc® MATの比較

	PyroMAT™ System (Merck)	Mylc® MAT (MiCAN Technologies)
細胞	Mono-Mac-6 (MM6) 急性単球性白血病由来ヒト単球系株化細胞	aMylc 末梢血単核細胞由来ヒト単球系株化細胞
保管条件	-150℃または-80℃(短期間)	-80℃
細胞懸濁液量	200 μL	100 μL
播種細胞数	記載なし(CoAから算出: $1.5 \pm 0.1 \times 10^5$ cells/well)	0.025×10^5 cells/well
培養環境	37℃	37℃, 5%CO ₂
培養時間	22 ± 2時間	20 ± 2時間
エンドトキシン標準品 (RSE)	欧州薬局方RSE	欧州薬局方RSE
媒体	水	生理食塩液
試験液量	50 μL	100 μL
調製濃度 (Method A)	0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 EU/mL	0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625 EU/mL
最終暴露濃度 (Method A)	0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025 EU/mL	0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.00313, 0.00156 EU/mL
基準値(Blank)	OD < 0.1	OD < 0.2
基準値(RSE)	OD > 3 (0.8 EU/mL)	OD > 1.5 (0.8 EU/mL)
検出限界	0.05 EU/mL	0.05 EU/mL
NEP controls	HKSA, Flagellin, PAM3CSK4, FSL-1, RESIQUIMOD R848	HKSA, Flagellin, Poly(I : C)
測定指標	IL-6産生量	IL-6産生量
方法	ELISA	ELISA
波長	450 nm(参照波長: 630 nm)	450 nm(参照波長: 570 nm)

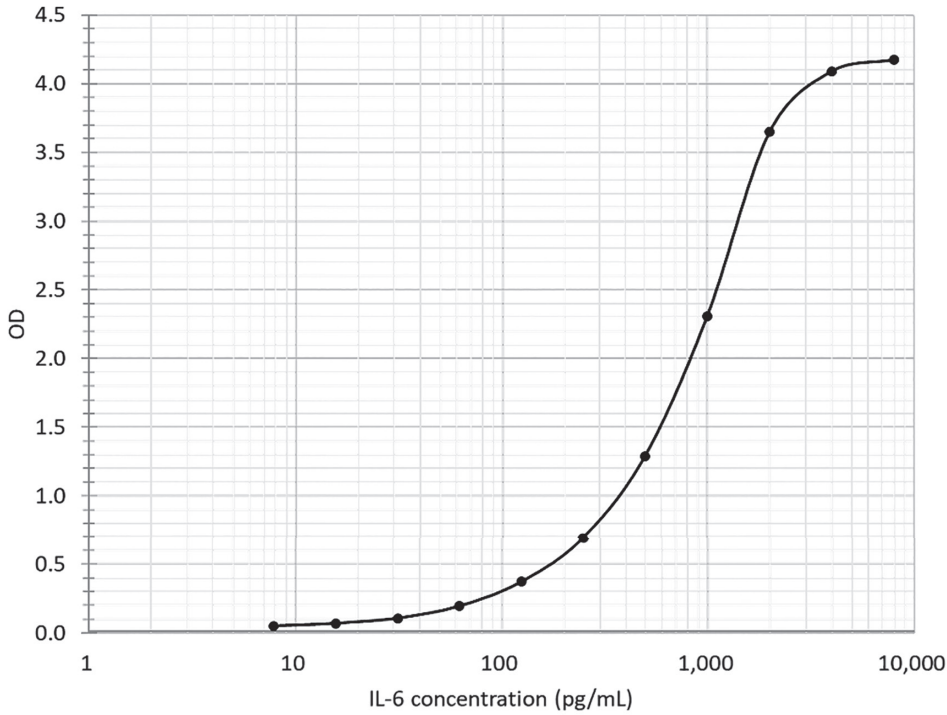
IL-6量を測定する。定量試験であるMethod Aに用いるRSE標準曲線の範囲は0.0125～0.8 EU/mL, LODは0.05 EU/mLと規定されている。なお、当研究所においてヒトIL-6 Standard (Biologend)を用いて検討した結果、測定値(OD)の範囲(Blank基準値: OD < 0.1, 最高濃度のRSE基準値: OD > 3)から推定されるMM-6が産生するIL-6量の範囲はおよそ15.6～2,000 pg/mLであった(図2)。

ユーザーガイドに記載されているNEPコントロールは5種類(HKSA, Flagellin, PAM3CSK4, FSL-1, RESIQUIMOD R848)あり、広範な種類のNEPが検出可能である。また、CoAから推測される播種時の細胞濃度は 6×10^5 cells/mLである。試験操作上の特徴として、解凍後の細胞は細胞数をカウントせずに播種可能であること、培養時のCO₂濃度の制御が不要なことが挙げられ、一般的に必要なとされている培養技術や設備がある程度なくても試験が可能である。

2) Mylc® MAT

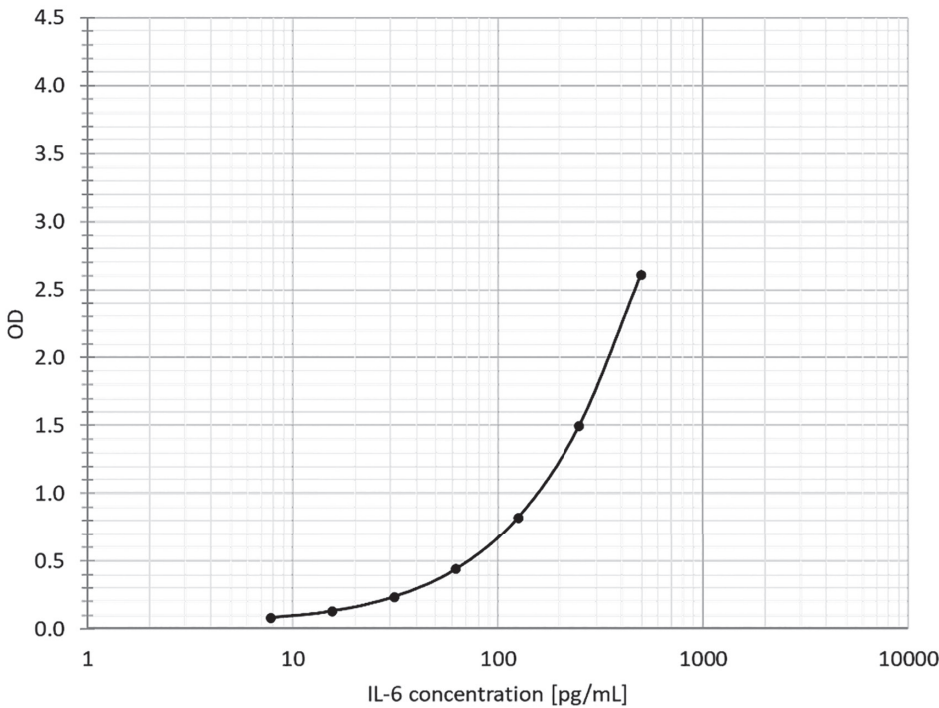
MiCAN Technologies社から販売されているMylc® MATは、ヒト末梢血由来ミエロイド系株化細胞のaMylc細胞を用いたMATキットである。解凍直後のaMylc細胞に被験物質を暴露し、37℃で20時間培養した後の培養液中に放出されたIL-6量を測定する評価系である。Method Aに用いるRSE標準曲線の濃度範囲は0.00625～0.8 EU/mL, LODは0.05 EU/mLである。当研究所において同様に検討した結果、測定値(OD)の範囲(Blank基準値: OD < 0.2, 最高濃度のRSE基準値: OD > 1.5)から推定されるaMylc細胞が産生するIL-6量はおよそ15.6～250 pg/mLであった(図3)。

また、標準作業手順書に記載されているNEPコントロールは3種類(HKSA, Poly(I:C), Flagellin)ある。Mylc® MATの特徴として、先発するPyroMAT™ Systemのme too試験として位置づけており、大枠の試験フローや解析に用いるソフトウェアは同一であるため、



IL-6 (pg/mL)	OD
8000	4.178
4000	4.092
2000	3.648
1000	2.307
500	1.289
250	0.692
125	0.371
62.5	0.194
31.3	0.106
15.6	0.069
7.8	0.051
0	0.027

図2 PyroMAT™ Systemの測定値(OD)範囲とIL-6産生量の関係



IL-6 (pg/mL)	OD
500	2.609
250	1.498
125	0.820
62.5	0.439
31.3	0.236
15.6	0.130
7.8	0.082
0	0.026

図3 Mylc® MATの測定値(OD)範囲とIL-6産生量の関係

PyroMAT™ Systemを導入済みの施設にとって容易に導入可能である点が挙げられる。また、標準作業手順書から算出される播種時の細胞濃度は 0.125×10^5 cells/mLであり、PyroMAT™ Systemと比較すると播種する細胞数が少な

く、培養上清中に産生されるIL-6量も少ないという特徴がある。

4. 結論

本稿では、医薬品や医療機器に混入した発熱

性物質を評価する新規 *in vitro* 発熱性物質試験の MAT について、その原理と日本で入手可能な MAT キットの特徴をまとめた。現行の発熱性物質試験である RPT には種差や動物福祉上の課題がある。また、エンドトキシンを高感度に検出可能な BET には NEP の検出といった課題が存在する。MAT はこれらの現行試験が有する課題を克服できるとされており、RPT や BET と同等以上に発熱性物質を評価可能であれば、今後、MAT が日本で広く利用されると見込まれる。

現在、当研究所では日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 主導のバリデーション試験やキットメーカーとの共同研究などに参加し、販売中もしくは開発中の MAT キットの技術的な課題や妥当性の検証に協力している。この取り組みを通じて、一日でも早く MAT を用いた発熱性物質の評価が公的に受け入れられるような制度が整備されることを目指し、今後も積極的に研究開発に貢献していきたいと考える。

文献

- 1) 日本薬局方 一般試験法 4.04 発熱性物質試験法.
- 2) 日本薬局方 一般試験法 4.01 エンドトキシン試験法.
- 3) 発熱性物質試験評価委員会, *In vitro* 発熱性物質試験の第三者評価報告書. 2010.
- 4) Park JY, Pillinger MH, Abramson SB: Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clinical immunology*. 2006; 119(3): 229-240
- 5) Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf C: Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*. 2001; 410(6827): 471-475
- 6) De Nardo D, Balka KR, Gloria YC, Rao VR, Latz E, Masters SL: Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) plays a dual role in myddosome formation and Toll-like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2018; 293(39): 15195-15207
- 7) Chen SN, Tan Y, Xiao XC, Li Q, Wu Q, Peng YY, Ren J, Dong ML: Deletion of TLR4 attenuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2021; 42(10), 1610-1619
- 8) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *The Journal of Immunology*. 1999; 162(7): 3749-3752
- 9) European Pharmacopoeia, 2.6.30. MONOCYTE-ACTIVATION TEST