

リムルス試薬とリコンビナント Factor C 試薬の 相違点に関する考察

土谷 正和

Charles River, Microbial Solutions

Consideration on difference between limulus amoebocyte lysate and recombinant Factor C reagents

Masakazu Tsuchiya

Charles River, Microbial Solutions

Abstract

Limulus amoebocyte lysate (LAL) is widely used for detection of endotoxin, one of the most potent pyrogen. Recent studies revealed the mechanism of activation of Factor C and Factor B, endotoxin binding proteins in LAL cascade. It is well known that Factor C is the first factor to bind endotoxin aggregates. The second coagulation factor, Factor B is important to achieve specificity of LAL to endotoxin because activated Factor C on endotoxin aggregates are essential for its activation. The endotoxin-specific signal is amplified after the Factor B activation in LAL. On the other hand, recombinant Factor C reagents rely on only the specificity of Factor C to endotoxin, and amplifies the trypsin-like activity of activated Factor C that may not be specific to endotoxin. This mechanism seems not to be as specific to endotoxin as LAL. More evaluation and improvement are necessary for recombinant reagents for endotoxin measurement as a safety test.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 43~46, 2020

Key words : endotoxin, Limulus amoebocyte lysate, recombinant Factor C, Bacterial Endotoxins Test

はじめに

カプトガニの血球から調製されるリムルス試薬は、エンドトキシンの測定に用いられ、1980年代にはエンドトキシン試験法として各国局方に収載された。エンドトキシン試験法は、かれこれ40年に渡り医薬品や医療機器のエンドトキシン検出に使用されてきたが、その不具合による製品の発熱事故は報告されていない¹⁾。エンドトキシン試験法が採用される前はウサギを用いた発熱性試験が行われていたが、その採用にあたっては、実検体測定を含む数多くの比較検討が行われ信頼性が確かめられた²⁾。その結果、エンドトキシン試験法では、ウサギ発熱性試験で陽性判定された検体のほとんどすべてを検出することができた。また、GMP規制下における医薬品や医療機器製造で混入する発熱性物質として、エンドトキシンが最も可能性が高く活性も強いと考えられたこともあり、エンドトキシン試験法がウサギ発熱性試験の代替

法として採用された。その後、リムルス試験自体は種々の改良が行われ、その性能も非常に向上している。ただ、これほど長く医薬品や医療機器の安全性試験として信頼されているのは、リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性と高い感度ゆえであろう。

リムルス試薬の活性化が複数の酵素前駆体が順次活性化されるカスケード機構であることは、1980年代に日本の研究グループによって解明されていた³⁾。最近、エンドトキシン感受性因子である Factor C や Factor B の活性化の詳細が明らかにされた^{4,5)}。これらの研究は、リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性がどのようにして実現されているかを示した点で非常に興味深い。リムルス試薬の活性化は、以前に考えられていたような単純な酵素反応によるカスケード機構ではなく、巧妙な分子間相互作用によって、エンドトキシンに対する特異性を維持していることが示唆されたのである。

最近、エンドトキシンを測定する試薬としてリコンビ

ナント Factor C 試薬が開発された⁶⁾。欧州では動物を使用した試験の禁止や動物由来の試薬を使用しない動きがあり、リコンビナント Factor C 試薬もこの点で注目されている。本稿では、リムルス試薬とリコンビナント Factor C 試薬の特異性とシグナル増幅機構について比較する。

1. リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性

リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性において、Factor C のエンドトキシンに対する強く特異的な親和性が重要な働きをしていることは明らかであろう。ただ、リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性は、これだけで担保されているわけではない。最近の研究では、Factor C の活性化は、エンドトキシン凝集体上にある少なくとも 2 分子の分子間相互作用で起こり、1 分子では活性化が起こらないこと、2 分子はお互いに相手を活性化することなどが示されている⁴⁾。1 分子活性化モデルと 2 分子活性化モデルをシミュレーションした結果も、2 分子活性化モデルを支持している⁷⁾。また、種々のリコンビナント Factor C ミュータントを用いた研究⁴⁾で、Factor C の活性化機構の詳細が明らかにされている。Factor C は Phe⁷³⁷-Ile⁷³⁸が切断されて活性化する。フェニルアラニンを切断するプロテアーゼとして、キモトリプシンがよく知られているが、キモトリプシンでも Factor C のプロテアーゼ活性を発現することができる^{4,8)}。Factor C のプロテアーゼ活性は、トリプシントイプの活性で、通常 Val-Pro-Arg-発色基のような合成基質で測定される。キモトリプシンで活性化された Factor C (β -Factor C) は、エンドトキシンに結合する能力を失っているが、この合成基質を分解する活性は持っている。しかし、この β -Factor C は、次の因子である Factor B を活性化することができない^{4,5)}。Factor B が活性化されるのは、エンドトキシンによって活性化された Factor C (α -Factor C) とエンドトキシンが共存する場合である。Factor B もエンドトキシン結合能力が強く、その活性化は、活性化した Factor C と同じエンドトキシン上で起こると考えられる⁵⁾。また、Factor B の活性化には、2 カ所の切断が必要である⁵⁾。トリプシントイプのプロテアーゼは、1 カ所目の Arg¹⁰³-Ser¹⁰⁴は切断するが、2 カ所目の Ile¹²⁴-Ile¹²⁵は切断しないと思われる。すなわち、こちらも何らかの分子間相互作用によって活性化が起こると予想され、リムルス試薬の活性化が、単純な酵素反応ではないことが分かる。この Factor B の活性化こそ、リムルス試薬がエンドトキシンに対する特異性を実現する上で最も重要な機構と思われる。単純な酵素反応による偽陽性が起こらないよう、Factor B の活性化は、活性化した Factor C とエンドトキシンが共存した場合に起こるよう設計されている。これらのことから、リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性は、Factor C

のエンドトキシンに対する強い親和性のみではなく、Factor B という因子の存在によって実現されていると考えられる。

2. リムルス試薬のシグナル増幅機構

リムルス試薬によるエンドトキシンの高感度測定の機構は、これまでカスケード機構の各因子が活性化される毎にシグナル増幅を行うと考えられてきた。しかし、Factor C と Factor B が強くエンドトキシンに結合しているとすれば、これらの活性化によるシグナル増幅作用はあまり期待できない。すなわち、リムルス試薬のシグナル増幅は、プロクロッティングエンザイムの活性化以降で起こっていることになる。筆者の実験でも、Factor C に Factor B を添加しても、エンドトキシンに対する感度は上がらなかったが、さらにプロクロッティングエンザイムを添加すると約 1,000 倍の感度上昇が認められた⁹⁾。すなわち、リムルス試薬のシグナル増幅は、プロクロッティングエンザイムがクロッティングエンザイムに変換される段階以降で行われていることが分かる。このことは、リムルス試薬のシグナル増幅が、エンドトキシンに特異的なシグナルに対して行われていることを示しており、リムルス試薬によるエンドトキシンの高感度測定における有効性を示唆している。これらの機構を含んだリムルス試薬のカスケード機構を図 1 に示す¹⁰⁾。

3. リコンビナント試薬の特異性

リコンビナント Factor C 試薬は、リムルス試薬のエンドトキシン感受性因子である Factor C のみを利用した試薬で、エンドトキシンによって活性化された Factor C のセリンプロテアーゼ活性を測定するという原理である⁶⁾。リコンビナント Factor C 試薬は、リムルス試薬のエンドトキシン感受性因子を使用しているため、リムルス試薬と全く同じ反応を見ているという意見もあるが、活性化型 Factor C の一つの性質であるセリンプロテアーゼ活性を Val-Pro-Arg-発色基で測定することは、リムルス試薬の活性化における Factor B の活性化と同じとは言い難い。前述のように、Factor B の活性化は、Val-Pro-Arg 基質を水解する β -Factor C では起こらない。Factor B は、リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性に大きく寄与していると考えられ、Factor C のみを使用したエンドトキシン測定の特異性は、Factor B とプロクロッティングエンザイムを含んだ試薬と比較して低いと考えられる。このことから、リコンビナント試薬を用いてエンドトキシンを測定するのであれば、これら 3 種類の因子を含んだフルリコンビナント試薬を目指すべきであろう。

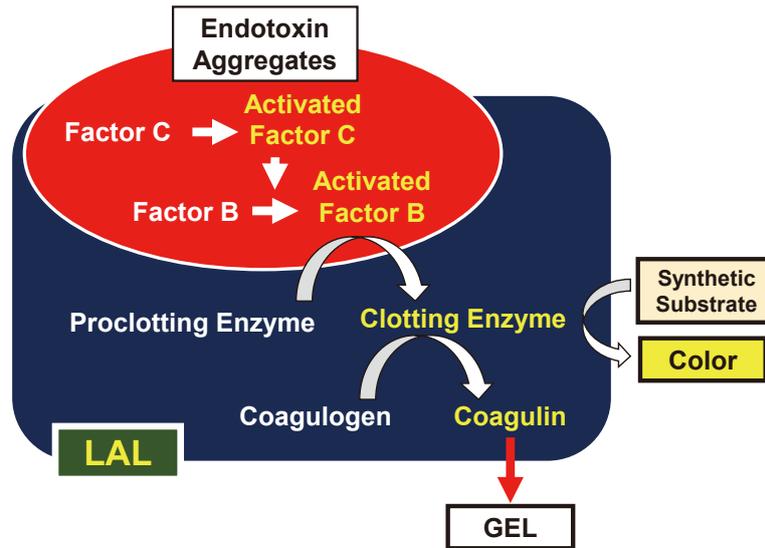


図 1 リムルス試薬のカスケード機構 (文献¹⁰より引用)

Factor C および Factor B の活性化は、エンドトキシン凝集体上で起こり、シグナル増幅はプロクロッティングエンザイムの活性化以降で行われる。

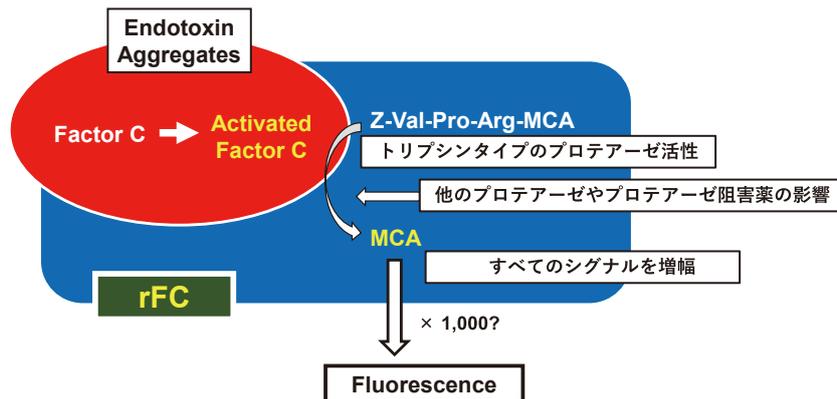


図 2 リコンビナント Factor C 試薬の反応機構 (文献¹⁰より引用改変)

Factor C 様の活性をすべて蛍光で増幅する。

4. リコンビナント Factor C 試薬のシグナル増幅

現在市販されているリコンビナント Factor C 試薬は、リムルス試薬と同等の標準エンドトキシン検出感度を実現している。リムルス試薬では、プロクロッティングエンザイムの活性化が主要なシグナル増幅機構であるが、リコンビナント Factor C 試薬では、蛍光基質を用いてシグナル増幅を行っている (図 2)。活性化された Factor C の僅かな活性を蛍光基質で増幅することは、測定に影響を及ぼす共存物質の影響も増幅するというを意味している。例えば、トリプシントypesのプロテアーゼの微量混入による偽陽性やプロテアーゼ阻害薬や活性に影響を及ぼす物質の混入による偽陰性の可能性である。リムルス試薬では、このような影響はシグナル増幅の後に出

ることが多いと考えられるので、その影響はリコンビナント Factor C 試薬より少ないと考えられる。

5. 天然のエンドトキシンに対するリムルス試薬とリコンビナント試薬の反応性

リコンビナント試薬は、エンドトキシン試験法代替法として期待されており、バリデーションの試みがなされている^{11,12})。これらのバリデーションには標準エンドトキシンが使用されているが、実際に製品中に混入するエンドトキシンが大腸菌から精製された標準エンドトキシンとは違うことを考えると、天然のエンドトキシンを用いた比較データは有用である。天然のエンドトキシンを用いてリムルス試薬とリコンビナント試薬を比較した例として、菊池らの報告がある¹³)。この報告の中で天然水の結果を見ると、湖沼水、河川水、ミネラルウォーター、

水道水などで、リコンビナント試薬の測定値の多くがリムルス試薬の測定値より著しく低い値を示している¹⁰⁾。われわれが行った製造用水のエンドトキシン測定でも、リコンビナント Factor C 試薬の値が低い傾向が認められた⁹⁾。これらの結果は、標準エンドトキシンと天然エンドトキシンの反応性の比率が、リムルス試薬とリコンビナント試薬で異なっている可能性を示すもので、リコンビナント試薬による偽陰性の可能性も示唆している。どの活性が発熱性と近いのかは、今後の研究を待たなければならないが、リコンビナント Factor C 試薬が、これまでの実績があるリムルス試薬のエンドトキシン値より明らかに低い値を示すのであれば、更なる検討が必要であろう。

おわりに

2018年に欧州薬局方では、蛍光法を用いたリコンビナント Factor C 試薬の Chapter 案 (EP 2. 6. 32.) を作成し、2021年にはこれを正式に収載の予定である。日本薬局方と米国薬局方でも、リコンビナント試薬に関する参考情報案を作成したが (2019年)、リコンビナント試薬の位置付けは、エンドトキシン試験法の代替法である。このように各国でリコンビナント試薬に対する考え方が異なるが、今後リコンビナント試薬の使用検討が進んでいくという方向は明らかであろう。ただし、医薬品や医療機器の安全性試験としてのエンドトキシン試験法でも「患者の安全」が最優先事項であることを忘れてはならない。本稿で紹介したように、リムルス試薬のエンドトキシンによる活性化は、以前に考えられていたモデルよりはるかに複雑であり、リコンビナント Factor C 試薬は原理的にリムルス試験と異なる結果を出す可能性がある。リコンビナント試薬をリムルス試験と同等に使えるようにするためには、種々のエンドトキシンに対してリムルス試験と同等の特異性を有していることを確認する必要がある。天然水や製造用水中のエンドトキシン測定で観察されているようなリコンビナント試薬による偽陰性の可能性を考えると、リコンビナント試薬は、リムルス試験の代替法として十分に確立されたとは言いがたい。リコンビナント試薬をエンドトキシン試験に使用するためには、実際に混入する可能性のある天然のエンドトキシンに対する反応性について、さらにデータを収集し、その安全性を検証する必要がある。今後の検証を基に、より良いリコンビナント試薬が開発されることが望まれる。

文 献

1) McCullough KZ : Current USP perspectives on low

- endotoxin recovery (LER). *Am Pharm Rev Endotoxin Suppl* 2016 : 4-7, 2016
- 2) 土谷正和 : ウサギによる発熱性試験とエンドトキシン試験の相関. “改訂第2版エンドトキシン試験—どのように実施し、どのように理解するか—” 情報機構, 2015, pp34-37
- 3) Iwanaga S, Miyata T, Tokunaga F, et al. : Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. *Thromb Res* 68 : 1-32, 1992
- 4) Shibata T, Kobayashi Y, Ikeda Y, et al. : Intermolecular autocatalytic activation of serine protease zymogen factor C through an active transition state responding to lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 293 : 11589-11599, 2018
- 5) Kobayashi Y, Takahashi T, Shibata T, et al. : Factor B is the second lipopolysaccharide-binding protease zymogen in the horseshoe crab coagulation cascade. *J Biol Chem* 290 : 19379-19386, 2015
- 6) Ding JL, Ho B : A new era in pyrogen testing. *Trends Biotechnol* 19 : 277-281, 2001
- 7) Miyagawa Y, Kikuchi K, Tsuchiya M, et al. : A statistical model for activation of Factor C by binding to LPS aggregates. *Eur Biophys J* 48 : 743-747, 2019 (<https://doi.org/10.1007/s00249-019-01400-4>)
- 8) Kobayashi Y, Shiga T, Shibata T, et al. : The N-terminal Arg residue is essential for autocatalytic activation of a lipopolysaccharide-responsive protease zymogen. *J Biol Chem* 289 : 25987-25995, 2014
- 9) 土谷正和 : エンドトキシンよもやま話 (その3) リムルス試薬の特異性とリコンビナント試薬. *日防菌防黴会誌* 48 : 205-208, 2020
- 10) Tsuchiya M : Innovative mechanism of *Limulus* amoebocyte lysate activation to achieve specificity and sensitivity to endotoxin ; Comparison with recombinant Factor C reagents. *Int J Dev Res* 10 : 36751-36756, 2020
- 11) Loverock B, Simon B, Burgenson A, et al. : A recombinant Factor C procedure for the detection of Gram-negative bacterial endotoxin. *Pharmacopeial Forum* 35 : 1613-1621, 2009
- 12) Bolden J, Smith K : Application of recombinant Factor C reagent for the detection of bacterial endotoxins in pharmaceutical products. *PDA J Pharm Sci Technol* 71 : 405-412, 2017
- 13) 菊池裕, 靄島由二, 福井千恵, 他 : 平成 27 年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告, エンドトキシン試験法に用いる組換え試薬の評価に関する研究. *医薬品医療器レギュラトリーサイエンス* 48 : 252-260, 2017