

エンドトキシンと医薬品の品質管理

食品添加物部 棚元憲一

Endotoxin and the Quality Control of Medicine

Ken-ichi Tanamoto

In gram negative bacterial infection, endotoxin is thought to play a principal role in severe pathogenic changes such as hypotension, shock, disseminated intravascular coagulation and multiple organ failure. In the field of quality control of medicine, endotoxin is known as “pyrogen” and it is an important issue to prevent the contamination especially for the injection.

Since endotoxin is derived from widely existing bacteria in the environment, contamination occurs easily. In addition, the elimination or inactivation of the toxin is difficult because the toxin survives as a quite stable substance even if the bacteria are sterilized.

This review outlines the properties of endotoxin both chemically and biologically, and the quality control of medicine, detection method and measures against the contamination of endotoxin are discussed on the basis of accumulated scientific knowledge of endotoxin.

Keywords: endotoxin, LPS, quality control of medicine, pyrogen, Toll-like receptor

1. はじめに

医薬品の品質管理にとってエンドトキシンは大きな問題である。医薬品分野ではエンドトキシンは発熱性物質として捉えられており、極めて微量の混入によって発熱を引き起こすことから、生体内に直接導入される注射剤等において厳重な管理が求められている。一般的にエンドトキシンは単なる発熱性物質ではなく、生体に対して非常に多彩な作用を示すことはよく知られており、特に臨床分野ではエンドトキシンは敗血症に伴うDIC（汎発性血管内凝固症候群）、MOF（多臓器障害）、エンドトキシンショックに至る極めて致死率の高い疾患を引き起こす原因物質¹⁾で、米国だけでも年間数十万人が死に至るとされており、臨床上の大きな問題となっている。

エンドトキシンは強力な毒素であり、環境中に広く常在している細菌に由来するために簡単に汚染が起こる。しかも非常に安定な物質であるため、一旦汚染が起こると、たとえ菌を死滅させてもエンドトキシンそのものは残存し、除去もしくは失活させることが困難であり、しかも極めて微量で活性を示す。このような特性ゆえに、発見以来1世紀を経た現在もエンドトキシンに対する決

定的な対策が得られず、その管理に苦慮させられているのが現状である。ここではエンドトキシンの持つ多彩な作用に触れつつ、医薬品の品質保証の一要因としての発熱活性を視野に入れつつ、その管理、汚染防止対策、検出といった面からエンドトキシンを述べるが、エンドトキシン管理自体を科学的に考えるためには、まずこの毒素がいかなるものかを化学的、生物学的に理解する必要がある。それによって検出法としてのリムルステストの意味や、エンドトキシンの除去・不活化の方法、エンドトキシン規格値の設定の考え方、およびそれらに内包される本質的な問題点等がより鮮明に理解できるものと思われる。

2. エンドトキシンとは

2-1 概要

エンドトキシンの名が歴史上に最初に現れたのは、今から1世紀以上も前の1892年、Pfeiffer²⁾が熱処理コレラ菌にショックを誘発する物質が存在することを見だし、それが菌体内の成分に由来するものとしてその物質をエンドトキシンと名付けたのが始まりである。同時期にCentanni³⁾はチフス菌から耐熱性物質を抽出し、この物質が発熱性および毒性を示すことから“Pyrotoxina”と命名している。

20世紀に入り注射薬による発熱という社会問題が起こり、それが極めて微量のエンドトキシンによることが明

To whom correspondence should be addressed:

Ken-ichi Tanamoto; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel 03-3700-1141 ext.321; Fax 03-3707-6950; E-mail: tanamoto@nihs.go.jp

らかにされると共に、それを検出するための方法としてウサギを用いた発熱性試験が開発された。エンドトキシンは医薬品分野では別名パイロジェンとも呼ばれる強力な発熱物質であり、従って医薬品・医療用具などの生体内に直接導入される系ではその汚染管理は大きな問題となっている。

エンドトキシンはグラム陰性菌の菌体成分であり、図1に示すように細菌表層の3層構造（菌の内側から順に細胞質膜、ペプチドグリカン、外膜）の外膜の最も外側、すなわち菌が外界と接する表面に局在するリポ多糖で、外膜成分の約20%を占め、表層の半分近くを覆っていると計算されている⁴⁾、疎水性の脂質部分を外膜脂質二重層に埋め込み、親水性の多糖部分を菌体外に突き出した形で存在している。

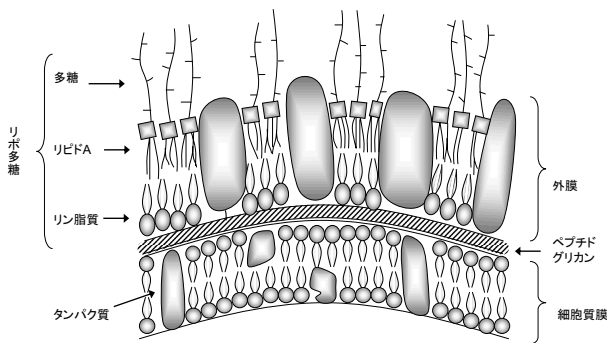


図1 グラム陰性菌菌体表層の模式図

エンドトキシンは本来菌体成分として菌の形状保持に寄与するのみならず、抗生物質や界面活性剤のような化学物質、あるいは白血球内での殺菌機構といった種々の外部からの攻撃に対して細胞内部を保護するという、菌にとっては非常に重要な役割を果たしている^{5, 6)}。また、リポ多糖のないグラム陰性菌は存在しないことや、リポ多糖の構成糖である KDO (2-ケト-3-デオキシオクトン酸) の類縁体を用いて競合的にエンドトキシンの生合成を阻害することによって菌が生育しなくなるという事実から、エンドトキシンの存在そのものが細菌の生存、生育に不可欠であると考えられている⁷⁾。このようにエンドトキシンは細菌の生存にとって必須の物質であるが、生体と接触しその防御機構を触発することによって、生体に多様な活性と障害、ひいては致死的な疾患を引き起こす毒素に変貌する。

歴史的に見た場合、ヒトは地球上の先住者である細菌と常に接触し、その脅威に晒されながら進化を遂げてきた。このようなヒトと細菌との長い共存の歴史を考えるならば、菌体成分エンドトキシンが生体に多彩な活性を示すことは不思議なことではなく、進化の過程の反映であると考えられる。実際、エンドトキシンは生体に対して功罪両面の実に多彩な活性を示す（表1）。天然に存在する物質の中で最も複雑且つ広範な活性を示す物質であると思われる。その一例を挙げれば、致死性、発熱性、シュワルツマン反応、白血球減少、血小板減少等の毒性に加え、種々のメディエーター産生を誘導し、それらの作用の総和として、臨床的には敗血症に伴うショック

表1 エンドトキシンの生物活性

A. 生体レベルの作用	B. 細胞レベルの作用	C. 分子レベルの反応
発熱性 致死毒性 局所シュワルツマン反応 全身シュワルツマン反応 ショック 血管縮小または拡張 血圧降下 血糖低下 白血球減少 血小板減少 血小板凝集促進 抗腫瘍作用 非特異的感染防御 アジュバント活性 流産 体重減少 骨髓出血壊死 トランス 放射能障害防御能 網内系殺菌力の亢進	マクロファージ活性化 ・食作用亢進 ・遊走阻止 ・メディエーター産生 インターフェロン インターロイキン1 プロスタグランジン／ロイコトリエン 腫瘍壊死因子 (TNF- α) コロニー刺激因子 ・NF- κ B活性化 T, B前駆細胞の成熟化 Bリンパ球 ・マイトジェン活性 ・ポリクローナル活性 ・リンフォカイン産生 ・インターフェロン産生 白血球の減少、増多 顆粒球機能亢進	カプトガニ血球成分凝固活性 (リムルス活性) 凝固線溶系への作用 ・凝固因子 (XII, Hagemann因子) の活性化 ・単球組織因子 (Ⅲ因子) の合成促進 プラスミノゲン活性化 補体活性化 ・古典経路 ・第2経路

ク、汎発性血管内凝固症候群（DIC）、さらには多臓器傷害（MOF）といった極めて致死率の高い諸疾患を引き起こす。一方、抗腫瘍活性、インターフェロン誘発活性、アジュバンド活性、非特異的感染防御能、マクロファージ活性化等の免疫能・生体防御能の賦活化作用といった多くの生体に有利な活性を示すことが知られている。すなわち細菌との共存の平衡が保たれているとき、エンドトキシンは生体にとってむしろ“Exohormone”とも呼ばれるように有利に作用するが、一旦生体の恒常状態が崩れたときは恐ろしい毒素に変身するのである。以上のような強力な毒性と生体防御作用を有することから、エンドトキシンは一方では疾患対策として、または医薬品開発の両面から、古来多くの研究者の注目を集めてきた物質である。

2-2 エンドトキシンの活性本体

菌体成分エンドトキシンは化学的にはリポ多糖である。一般的なエンドトキシンの化学構造の模式図を図2に示すが、この分子は大きく多糖部分とリポドAと呼ばれる脂質部分とから構成されている。多糖部分はさらに血清学的抗原特異性を有するO多糖とコア多糖からなり、コア多糖部分は、KDOというエンドトキシンに特有な酸性糖を介してリポドA部分と結合している⁸⁾。

リポドAは通常弱酸の処理で多糖部分と分離される。一般に β -1,6-ジグルコサミン骨格を持ち、それに種々の脂肪酸、及びリン酸などが結合した物質で、脂肪酸の中にはエンドトキシンに特異的な β -、もしくは α -ヒドロキシ酸を含んでいるのが特徴である。代表的なものとして *E.coli* 型のリポドAの化学構造式を図3に示

すが、 β -1,6-ジグルコサミン骨格の1, 4'位にリン酸を結合し、2, 2'位と3, 3'位に β -ヒドロキシミリスチン酸をそれぞれアミド結合、及びエステル結合で配し、さらに2', 3'位の β -ヒドロキシミリスチン酸の水酸基がそれぞれラウリン酸およびミリスチン酸で置換されてダブルアシル化された構造を持っている。6'位は遊離の水酸基で、リポドAがKDOを介して多糖部分と結合している部位である。

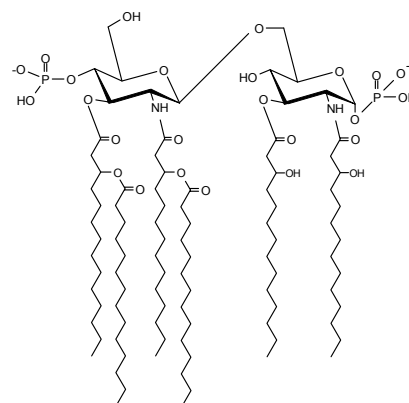


図3 *E. coli*型リポドAの化学構造

歴史的に曲折を経て、現在、エンドトキシンの示す本質的な活性はすべてリポドA部分が担っていることが証明されている^{9, 10)}。リポドAの構造は、O抗原部位に比べると菌種間に於ける共通性が比較的高いと考えられてきたが、脂肪酸の数・種類・結合位置、リン酸基の有無、及びリン酸への結合残基の存在、グルコサミン骨格のモノマーとダイマー等といった、生物学的活性に決定

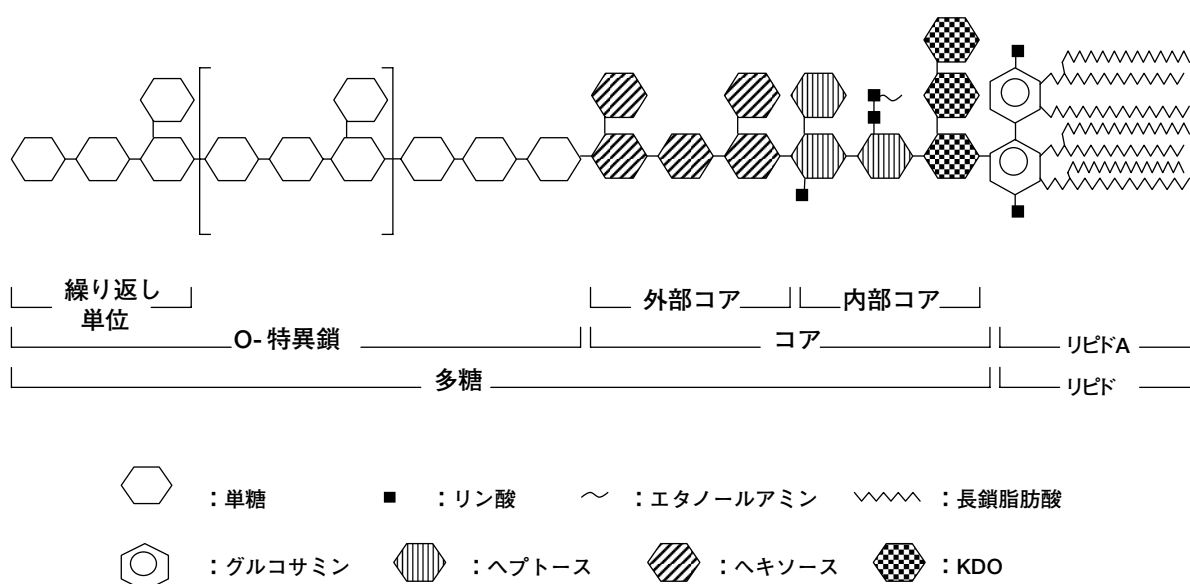


図2 エンドトキシンの化学構造の模式図

的な要因となる様々な構造上の差異が由来する菌種のリピドA間に見いだされている。すなわち、これらの構造因子、特に脂肪酸の種類や数、置換部位の違いによって、同じリピドAでも強力な毒性物質からまったくの無毒性に至るまでの多様性や、測定系による活性発現の差、さらには生物種による感受性の差といった複雑なエンドトキシン活性発現の差が近年の詳細な構造活性相関研究で明らかになってきている。

2-3 エンドトキシン活性の発現機構

化学構造の項で述べたように、エンドトキシンの活性本体リピドAは菌種によって非常に異なった構造を持っている。それにも拘わらず生体はそのような多様な分子をエンドトキシンとして認識し、活性の強弱の差はあるものの同質の反応を示す。このような事実から構造特異性が非常に弱いレセプターによって認識されているであろう事は予想されていた。

エンドトキシンの受容体TLR (Toll-like receptor) の発見以来、研究が飛躍的に進み、現在、エンドトキシンの作用機作は分子レベルで明らかにされつつある。エンドトキシン活性発現に中心的に働くマクロファージにおいて、活性化機構の概要は次のように考えられている(図4)。すなわち、体内に侵入した細菌から遊離したエンドトキシンは、血中のLBP (LPS binding protein) と

結合し、その助けのもとに細胞膜上のCD14と複合体を形成する(膜CD14に代わりsoluble CD14が作用することもある)。それが同じく膜上に発現されたエンドトキシンの機能的受容体であるTLR4(Toll-like receptor 4)-MD2複合体によって認識され、CD14-TLR4-MD2複合体が形成される。この複合体形成によりTLR4が重合化し、その細胞内領域が細胞内のMyD88と結合することによってシグナル伝達が起こり、その後の複雑な細胞内情報伝達系を介して最終的には転写因子NF- κ Bの活性化を経て各種メディエーター産生に至るという図式が、現在最も有力なエンドトキシンによる細胞活性化機構である¹¹⁾。ここで産生される多くのメディエーターがエンドトキシンの多様な活性発現に関わってくる。一般的にこの活性化機構は、由来する菌のLPSの種類や化学構造に関係なく、同じ活性化機構を取ると考えられている。

2-4 エンドトキシンの発熱作用

医薬品品質管理においては汚染エンドトキシンによって惹起される発熱作用が問題となる。一般的に発熱物質は視床下部に作用して体温を上昇させる物質で、外因性発熱物質としてはエンドトキシン以外にも細菌外毒素、ウイルス、病原性真菌、さらには化学的発熱性物質が、また内因性発熱物質としては単球・マクロファージ、好中球、上皮細胞、肺胞細胞などから産生されるインター

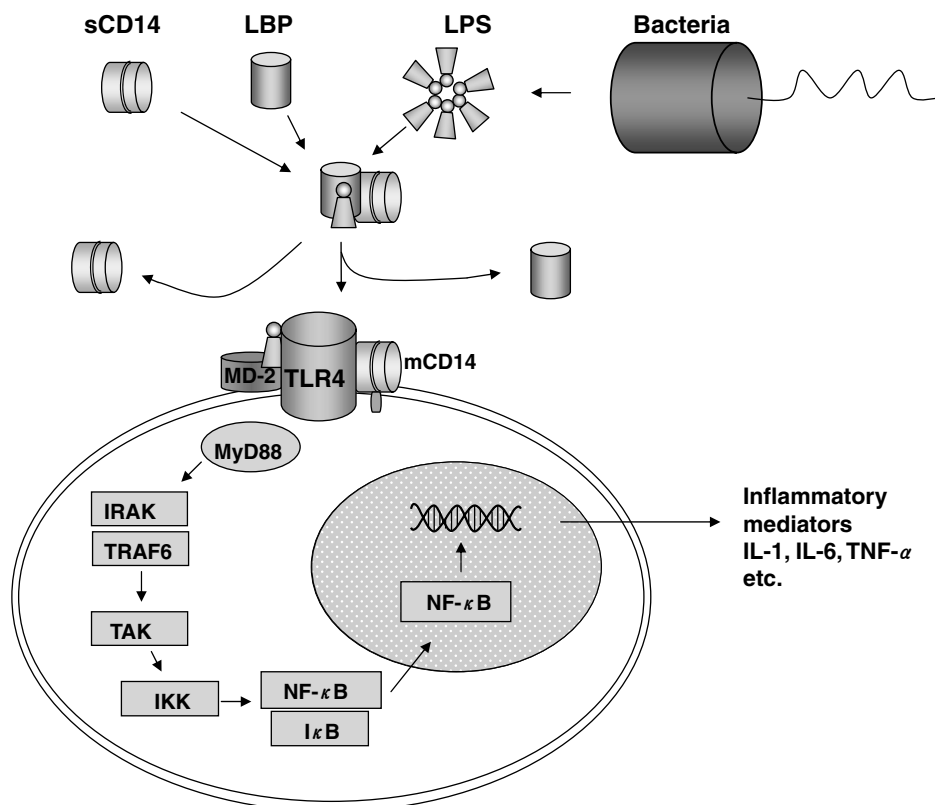


図4 エンドトキシンのTLR4を介する情報伝達

ロイキン1 (IL-1) インターフェロン α, β (IFN- α, β) およびTNF- α などがある。しかし、自然界に存在する物質の中で最も強力な発熱物質はエンドトキシンである。

エンドトキシンをウサギに投与したとき、典型的な二相性の発熱曲線がみられる。この現象のメカニズムとして、投与約1時間後に現れる最初のピークはエンドトキシンによる発熱中枢への直接作用であり、それに対して投与約3時間後に現れる発熱は、エンドトキシンが網内系、多形核白血球 (PMNL)、単球等に作用してIL-1を産生し、このIL-1が発熱中枢へ至って第2相の発熱反応を引き起こす結果と考えられている^{12, 13)}。発熱中枢へ至ったエンドトキシン、またはIL-1がさらに発熱を誘発するための次のメディエーターとして、プロスタグランディン (PG) が考えられている^{14~18)}。PG (特にE₁, E₂) がエンドトキシンによる発熱に関与していることを裏付けるデータとしては、PGEグループ (E₁, E₂) を猫、ウサギ、ラット等の脳室や視床下部前端に注入した時に発熱が誘発されること、LPSやリピドAを静脈内もしくは脳室内に投与すると脳脊髄液中のPDE₂レベルが上昇すること、さらにはインドメタシンによってリピドAの発熱性が抑えられると同時にPGレベルも下がることが示されている。一方、PGFグループ (F₁ α , F₂ α) は発熱を起こさないこと、またPGEに特異的なアンタゴニストによって発熱が抑えられること¹⁶⁾ から、PGFは発熱には関与していないと考えられる。

ここで誘導されたプロスタグランディンはさらにcAMPを誘導することがわかっており¹⁸⁾、そのcAMPが、現在のところ明らかにされていない何等かの機構で最終的な発熱現象に至らしめるものと考えられている。

IL-1以外に、インターフェロン (IFN) と、同じく単球やマクロファージから産生される抗腫瘍性因子 (TNF- α) である。IFN、特にIFN- α はウサギへの静注によりそれ自体発熱性を示し、しかも発熱中枢に直接作用することがわかっている^{19, 20)}。IFN- α の発熱は一相性であって、脳組織でのPGE₂の産生をin vitro, in vivo いずれにおいても促進する。

TNF- α は、エンドトキシンが示す抗腫瘍活性、ショック、致死毒性、好中球活性化等の多くの共通の活性を示すことから、発熱作用にとどまらず、広くエンドトキシン活性の重要なメディエーターと位置付けされている物質である²¹⁾。このTNF- α は同じくウサギへの静注により、低用量では発熱中枢への直接作用による一相性の、また高用量ではエンドトキシンと同様の二相性の発熱性を示す^{22, 23)}。TNF- α はIFNとは異なり、エンドトキシンと同様IL-1を誘導し^{21, 23~25)}、このIL-1が二相目の発熱のメディエーターとなっていると考えられている。また、TNF- α もIL-1やIFN- α と同様に直接視床下部の

PGE₂合成を誘導する²³⁾。

以上の事実、及びTNF- α はエンドトキシンの投与後極めて短時間に産生されるという事実は、TNF- α のエンドトキシンによる発熱性への関与を強く示唆しているものと思われる。

2-5 エンドトキシン疾患対策

医薬品分野では発熱物質として扱われるエンドトキシンであるが、臨床分野では感染症に伴って極めて重篤な諸疾患の原因物質として、より大きな問題として対策が求められている。現状ではそのようなエンドトキシン疾患に対する根本的な治療法は確立されていない。強力で多様な活性を示すエンドトキシンの作用を抑制させるため以下のような戦略が考えられている。

1) エンドトキシン分子への直接作用による活性阻害：LPS分子に直接作用 (結合) することによって、LPS分子のレセプター分子群との結合を防いだり、活性に大きく影響するLPS分子のミセル状態を変化させることによってその作用を中和する物質が考えられる。例えばHA-1AやE-5^{1, 26)}といったモノクローナル抗体、各種リポ蛋白質 (HDL, LDL) やカイロミクロンといったLPS結合性血中成分がエンドトキシン作用に防御的に働くという報告がある^{27~30)}。また、動物レクチン galectin-3³¹⁾、後述するエンドトキシンの定量化試薬のソースであるカプトガニの血球に含まれる抗 LPS 因子 (Anti-LPS factor; ALF)³²⁾、Tachypreus anti-LPS factor³³⁾、bactericidal/permeability-increasing protein³⁴⁾、CAP-18³⁵⁾、LPS-binding-protein³⁶⁾、NK-lysin³⁷⁾といった、植物および動物の初期防御機能に関係する物質で、リピドAに結合してエンドトキシン作用を中和する多くの物質が知られている。これらの多くはエンドトキシン作用を中和するのみならず^{38~40)}強い抗菌作用を示し⁴¹⁾、LPSやグラム陰性細菌による致死毒性を減少させる作用が見出されており^{40, 42, 43)}、敗血症の治療に応用するための研究も進んでいる。また LPS結合性中和分子の活性中心に関する研究が進み、その結合部位や結合最小構造が明らかにされるにつれ、極めて低分子で結合且つ不活化を起こすペプチドが開発・合成されるようになってきた。このような低分子化と立体構造研究によって、完全なエンドトキシン中和機能を有し、毒性及び副作用が極度に低下した分子の設計が可能となり、応用への展望が開けつつある。

2) LPS誘導炎症性メディエーターの抑制・中和：エンドトキシンによるマクロファージの活性化によりNO, TNF- α , 活性酸素, IL1, IL6等の種々メディエーターが産生されるが、そのような炎症性メディエーターの過剰産生がエンドトキシン疾患を引き起こす原因である。

従って抗炎症剤や、抗メディエーター抗体、メディエーターのインヒビター等による中和、さらにはメディエーターの受容体の競合的抑制によって、このようなメディエーター産生を抑制・中和する^{44~53)}ことで、エンドトキシン疾患の治療につなげることが可能である。しかし、エンドトキシンによって同時に多くのメディエーターが産生されること、これらのメディエーターは一方では生体防御に働いており、条件によっては期待とは逆の結果が得られる⁵⁴⁾ことなどから、実際の臨床応用には多くの問題がある。

3) LPSによるマクロファージ活性化の情報伝達系阻害：図4に示したような活性化機構によりマクロファージはエンドトキシンによって活性化され、その結果炎症性メディエーターが産生される。従って、この活性化に関わる物質、もしくは経路を阻害することによりエンドトキシン活性は抑制される。抗CD14抗体⁵⁵⁾、抗TLR4抗体 (HTA125)⁵⁶⁾、抗MD-2抗体⁵⁷⁾がエンドトキシン作用のブロック抗体として知られており、またTAK-242がTLR4のシグナル伝達を阻害してLPSによる*in vivo*, *in vitro*の活性を抑制するという報告がある^{58,59)}。特に後者は臨床への応用の期待が高いものである。近年の細胞活性化機構に関する研究の急展開と共に、この分野の医療への応用は有力な手法である。

4) LPSのアンタゴニスト：LPSのアンタゴニストはもう一つの有力なエンドトキシン治療薬の候補となり得る。最初のアンタゴニストの報告は筆者らによるもので⁶⁰⁾、化学合成された不活性型のリピドAがLPSのミトジェン活性を競合的に抑えることを見出した。現在、その後、化学的に活性型リピドAの脂肪酸を除いたものや、化学修飾したもの、さらには*Rhodopseudomonas sphaeroides*の様な不活性型天然リピドAをはじめとして、多くの不活性型リピドA類縁体がアンタゴニスト活性を示すことがわかってきている。一部のアンタゴニストについてはその作用メカニズムも明らかにされている⁶¹⁾。

近年のエンドトキシン研究の発展にもかかわらず、エンドトキシン疾患に対する効果的な治療法はいまだに確立されていないのが現状である。非常に多岐にわたる生体内の反応の総和としてのエンドトキシン疾患の治療法には、まだ基礎と臨床両面からの多くの研究が必要である。

3. エンドトキシンの検出法

3-1 エンドトキシン検出の諸方法

基礎的研究や臨床上の意味においてもそうであるが、医薬品の品質管理には、エンドトキシン量を正確、鋭敏、かつ特異的に測定出来る系を確立するが不可欠であ

る。医薬品の品質管理を考えるに当たって、まずエンドトキシンの検出法について述べる。

従来、エンドトキシンはそもそも発熱物質として認識されたこともあり、その管理は主にウサギを用いた発熱性物質試験によってなされてきたが、実験自体が非常に煩雑であること、精度、感度、再現性いずれも問題が多いこと、さらには実験動物倫理問題もあることから現在、その利用は限られたものとなりつつある。そのような背景から、発熱性以外の測定系確立に向けて多くの化学的、生物学的的方法の開発が試みられてきた。

化学的手法はデータの信頼性、再現性といった生物学的試験法には見られない長所を有するため、エンドトキシンの検出法として、また生物学的な検出法の確認のために期待される方法である。これまでエンドトキシンに特異的な構成成分であるヒドロキシ脂肪酸を指標としたいくつかの研究がある^{62~64)}。しかし、エンドトキシンは非常に活性が強いため、生理的な意味を持つ量を化学的に捉えることは困難な上に、技術的に煩雑であることから応用には至っていない。一方、生物学的手法として、多くの動物を使用した方法や、メディエーター産生等の細胞反応を利用する方法が試みられてきたが、あまりにも系が複雑すぎることから、やはり特異性、再現性、さらには感度等の問題が障害となっている。現在、これらの必要条件をすべて満たす方法として、原始生物であるカプトガニの凝固系を利用する測定法であるリムルス反応が最も汎用される方法として確立されてきた。日本薬局方においても「発熱性物質試験法」とは別に、エンドトキシンの検出に関しては「エンドトキシン試験法」としてリムルス試験が優先され、「エンドトキシン試験法の適用が困難な場合は、発熱性物質試験法を用いることが出来る」と規定し、発熱性物質試験法は補助的な試験法として位置付けられるようになった。

ここでいう「エンドトキシン試験法の適用が困難な場合」とは具体的に後述するエンドトキシン試験法において、用いる試料がカプトガニの凝固酵素に影響を及ぼして阻害または促進作用を示す場合、あるいは試料中にエンドトキシン以外の発熱性物質の汚染が懸念される場合に限られる。

3-2 リムルス試験法

生きる化石といわれるカプトガニであるが、この血液リンパがゲル状に固まる現象は古くから知られていた。Bangは1956年このゲル化反応が*Vibrio*感染によって引き起こされることを見出し⁶⁵⁾、さらに1964年この血液リンパ中の血球の凝集、崩壊、凝固を起こす原因物質が菌体成分であるエンドトキシンであることを明らかにした⁶⁶⁾。リムルステストはこのカプトガニの血球成分のエ

ンドトキシンに対する極めて鋭敏な凝固反応を利用したものであり、その後、この凝固系の解析・及び各因子の単離精製が行われ、凝固メカニズムの分子機構が明らかになっている⁶⁷⁾。現在、その凝固反応はカプトガニの微生物に対する防御機構であると考えられており、図5に示すように、この凝固反応は細菌の菌体成分エンドトキシンをトリガーとする系と、真菌、藻類等が持つ(1-3)- β -D-グルカンによって活性化される系から成り立ち、いずれも一連のプロテアーゼの連続的活性化増幅カスケードである。エンドトキシンは活性中心であるリポドAがC因子前駆体と反応してこれを活性化して、活性型のセリンプロテアーゼに変換し、それが次にB因子前駆体に作用して活性型のB因子に変換させ、さらにそのプロテアーゼが凝固酵素前駆体を活性化して凝固酵素に変える。最終的にはこの凝固酵素がコアグロゲンを分解して凝固蛋白コアグリンを生じ、凝固が起こる。一方、(1-3)- β -D-グルカンはG因子を活性化し⁶⁸⁾、その活性化G因子が同様に凝固酵素前駆体に作用してコアグロゲンの共存下でクロットを形成する。

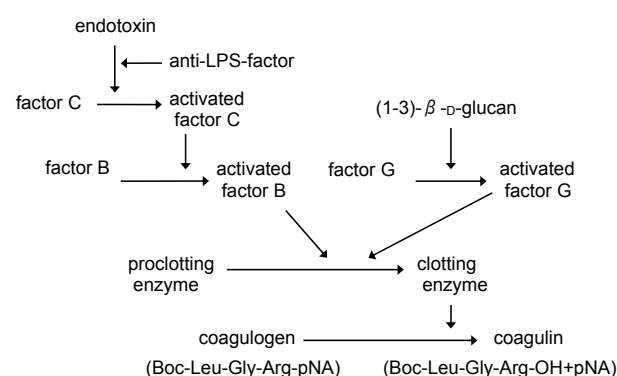


図5 リムルス反応のカスケード機構

後者の系は真菌感染を起こした患者が陽性反応を示すため、真菌感染の診断に応用できることから、医学的にも重要な意味を持つようになってきた。現在では、凝固系の各因子が完全に分離可能なことから、エンドトキシンを特異的に定量する意味からも、またG因子活性化物質の検索の意味からも、エンドトキシン、もしくは(1-3)- β -D-グルカンに特異的なリムルス試薬が開発され、使用できるようになっている。

3-3 リムルス試験の諸方法

カプトガニの凝固系によるゲル化反応を利用したリムルス法には、原理は同じながらその検出方法の違いによって種々の方法が提唱されてきた。現在、それらの中で実際広く用いられるようになったのは(1)ゲル化法、(2)比濁時間分析法、(3)合成基質法の3法である。

ゲル化法は試験管中でリムルス試薬(LAL: *Limulus Amoebocyte Lysate*)と試料を混合し、そのゲル化を目視するものであり、半定量的ではあるが操作は簡単で特別の判定機器を必要としないという意味では経済的な方法である。比濁時間法はエンドトキシンとLALとの反応によって生ずる凝固タンパクコアグリンの凝固に伴う濁度変化を透過光量の変化として捉え、試料の反応開始から一定の濁りに達するまでの反応時間(Tg)をゲル化時間として測定する。この時、エンドトキシン濃度とゲル化時間との間に検量関係が成り立つことから、エンドトキシンの定量が可能となる方法で、光学機器で測定を行うので客観的なデータが得られること、測定範囲が広いことの利点がある。合成基質法は図5に示したように、コアグロゲンの水解部位のアミノ酸配列に似た合成ペプチドに発色基質p-ニトロアニリン(pNA)を結合した化合物(Boc-Leu-Gly-Arg-pNA等)を用い、エンドトキシンを引金として活性化された凝固酵素のアミダーゼ活性によって遊離するpNAを比色定量(405nm吸光度測定)することによってエンドトキシ量を測定する方法である。ここでpNAの遊離に要する時間はエンドトキシ量に反比例し、時間とエンドトキシン濃度との対数相関が直線性を示すことを利用してエンドトキシ量を測定が可能となる。また、検体中に黄褐色系の物質が含まれているときは405nmの測定ではブランクが高くなるので、ジアゾカップリングで赤色に変換して545nmで測定する方法もある。この方法は感度、定量性、精度の点で優れている。どの方法を用いるかは上記の特徴を考慮した上で、目的、装置の有無等により選択できる。わが国ではゲル化法が日本薬局方第11局追補に最初に収載され、11局注射用水に適用された。さらに13局ではエンドトキシン試験法にゲル化以外の定量法である上記2法も取り入れられた。国際的にはこれらの3法を含んだエンドトキシン試験法が3局間で調和されている。

3-4 エンドトキシン試験法の解釈と問題点

リムルス試験法はエンドトキシンの測定系として特異性、再現性、感度、簡便さといった多くの利点を持つ故に、広く応用されるに至った。実際、基礎、臨床を問わず、研究においてこの試験法が果たした役割は大きい。次項で述べるエンドトキシンの除去・不活化に関する研究の遂行もこの試験法なしには考えられない。一方、この試験法で得られたエンドトキシンとしての値の評価には慎重でなければならない。

エンドトキシンの測定法を考えるに当たって、確かに感度、再現性、簡便さといった現実的な問題はもちろん重要であることはいうまでもないが、本来のエンドトキシン測定の目的は、発熱作用をはじめとする生体に対する

る毒性影響を調べることにある。従ってその測定方法が生体に対するエンドトキシン作用を的確に反映しているかどうかが最も本質的に重要な点ある。しかし実際問題としてヒトの系を使ってエンドトキシンを測定することは、残念ながら現状では測定のためのその他の必要要素である感度、再現性、簡便さすべての点において満足すべき方法がない。現在リムルステストが汎用されるようになってきたが、それが本来のエンドトキシン測定として地位を確実なものにするためには、間違いなく生体に対する毒性を反映しているかどうかを検証する必要がある。すなわち医薬品品質管理においてはエンドトキシンの管理目的が、汚染エンドトキシンによる発熱を惹起しないことにあることから、リムルス試験が、ヒトにおける発熱性（毒性）を正しく反映していることを検証する必要がある。

エンドトキシンは非常に多彩な活性を示すことは知られているが、それらの活性間の相関性についてはよく研究されてきた。その理由は、エンドトキシンが強力な毒性である反面、生体に有益な多くの活性を持っているため、それら生体に有利な活性を利用するために、出来るだけ無毒化した活性体を創り出すことが一つの研究目標だったからである。この試み自体は大きな成果を得ておらず、応用には至っていないが、このような構造活性相関の研究は、エンドトキシンの生物学的な手法による検出法の妥当性を考える上で多くの情報を提供している。その中で、特にエンドトキシンの測定系の評価で考慮しなければならないものの一つに種差がある。

近年高等動物である哺乳類でもエンドトキシンに対する感受性が大きく異なることが明らかになりつつある。その例としてリピドA前駆体であり、それがマウスに対しては活性体であるが、ヒトにはまったく活性を示さないことが明らかにされた^{69,70)}。リピドA前駆体構造は図3に示した活性型大腸菌リピドAの側鎖脂肪酸が2分子脱落した構造体であって、菌体内でリピドAが生合成される過程で現れる構造体であり、大腸菌型、サルモネラ型リピドAと同様活性体リピドAとして最も初期に化学合成された化合物である。この前駆体の特異な種特異性は天然にそのままの形では存在しないという理由から、それほど大きな問題とされてこなかった。しかし筆者らは、菌としても、あるいはエンドトキシンとしても代表的な構造体であったサルモネラ型リピドAが同じくマウスには強力な活性を示すにも関わらずヒトに対してはまったく活性を示さないことを見出した⁷¹⁾。さらに、この種特異性を発現する機構は筆者等によって分子レベルで解明されていて^{72,73)}、リピドA前駆体、さらにはサルモネラ型リピドAの場合いずれにおいても、ヒトとマウスのMD-2分子の構造上の違いに大きく依存することが

明らかになっている。サルモネラ型リピドAは構造的には大腸菌型リピドAにもう1分子の脂肪酸が結合しただけの化合物であるが、このような微細な変化をヒトの細胞は識別していることになる。

エンドトキシン試験法として汎用されるリムルス試験は、カプトガニという原始的な生物の生体反応を利用しているものである。同じ哺乳類であってさえ種間のエンドトキシン感受性に大きな差が見られることから、当然リムルス試験法がヒトの反応性をまったく正しく反映するとは考えにくく、実際これに矛盾するデータも知られている⁷⁴⁾。幸い現在までのところ、リムルス活性が無く、かつヒトに毒性を示すものは見つかっていない。これまでのリピドAの構造活性相関から、高等生物ほど、特にその中でもヒトではリピドAの構造要求性が厳しい傾向がある。もしそれが普遍的なものであるならば、リムルス試験でエンドトキシンの管理は十分であるが、現在まで調べられた化合物は極めてわずかであり、リピドAの類似構造は無数の可能性を持っていることを鑑みて、ヒト、リムルス等の種の違いの観点から、さらに構造活性相関の研究を進展させる必要があるし、リムルス反応で得られた結果もそのような観点から解釈されなくてはならない。

エンドトキシン試験法による測定に関して別の問題点もある。試験法は常に対照として、精製されたエンドトキシンを基準としてエンドトキシンの定量を行っている。しかしエンドトキシンがグラム陰性細菌の外膜構築成分であるというソースから考えて、自然界にエンドトキシンがフリーの形で存在することは考えられず、むしろ菌体そのもの、もしくは菌体の断片として存在していると考えられる。したがって、リムルス試験が実際に菌体、もしくは菌体断片に含まれるエンドトキシン量を的確に測定しているのかどうかということはリムルス法を適用するにあたって考慮されなければならない。特にリムルステストを医薬品の製造工程におけるバイオバーデンの測定指標として用いる場合には留意すべきである。これに関連して土谷らの報告がある⁷⁵⁾が、菌数、エンドトキシン、リムルス反応間の相関に関する研究はこれまでほとんど行われていない。

4. 医薬品の品質管理としてのエンドトキシン対策

4-1 医薬品の品質管理

これまで述べたように、エンドトキシンは強力な毒素であり、環境中に広く常在している細菌に由来するため簡単に汚染が起こるというやっかいな物質であるが、それが容易に除去、あるいは不活化することが出来れば、医薬品の品質管理上それほど大きな問題とはならない。しかしながら、エンドトキシン研究が飛躍的に進展

し、エンドトキシンの活性中心リピドA構造が解明され、それに伴いリピドAの構造活性相関の研究が進み、レセプターを含むエンドトキシンの作用機構に関する多くの知見が蓄積されてきたにもかかわらず、エンドトキシンを合目的に不活化・除去するための普遍的な方法は未だ確立されるに至っていない。それはひとえにこの物質の安定性によるものである。このような特性を有するエンドトキシンであるが、これをいかに除去・不活化するかということは医薬品製造にとって困難ではあるが非常に重要な問題である。このエンドトキシン汚染に対する対策を以下のように除去と不活化に分けて現状と将来の可能性について述べる。

4-2 エンドトキシンの除去

エンドトキシンの除去方法として、非特異的に有機物を吸着する活性炭による脱パイロジェン⁷⁶⁾や、パイロジェンフリーの水による洗浄法、蒸留法といった簡単なものがある。蒸留法は溶質を含む薬液等には使用できないが、注射用蒸留水等の製造法として日本薬局方に記載されている。より高度な除去法として、エンドトキシンの物理的な特性を利用する方法が近年発達してきた。代表的なものとして、エンドトキシン分子がマイナスチャージであることや、リピドA部分が疎水性である特性を利用してエンドトキシンの吸着を利用する方法や、エンドトキシンの分子量は1～2万ダルトン程度と考えられることから、サイズに基づき除去する方法がある。さらには生体由来のエンドトキシンに特異的に結合する物質を利用する方法も、エンドトキシン作用の中和、除去手段として有力な方法である。

4-2-1 吸着による除去

エンドトキシンは化学的に多くのリン酸基を持っていることから、全体としてマイナス荷電状態にある。従ってプラス荷電の物質に吸着され易い特性を持っていることから、このような物質を利用したアフィニティクロマトグラフィやプラス荷電修飾膜等により多くの吸着方法が考えられている。一方、リピドAの疎水性を利用した方法として疎水性ポリマーを利用した疎水性ろ過膜等が開発されている(表2)。ただし、このようなマイナス

荷電や疎水性を利用した除去方法はエンドトキシンに特異的なものではない。従ってこれらの方法は絶対的なものではなく、類似の性状を持つものには使用できないし、いずれも対象液中のpHやイオン強度等の環境変化に大きく影響されることや、吸着機構そのものも不明瞭であることを認識した上で、幾つかの方法を組み合わせるといった、用途に応じた適切な使用方法を考える必要がある。上記物質以外に先に述べたエンドトキシンに結合してその活性を中和(不活化)する種々の生命体由来の多くの物質がある^{32~37)}。これらの生体産生物質は、生体が自らの防御手段としてエンドトキシンを特異的に捕獲するために進化発展させた物質群(プロテイン、リポプロテイン)で、多くは抗菌作用も有している場合が多いことから、特に感染症及びそれに伴う種々エンドトキシン疾患への応用が期待される物質群である。それらは、先に述べた物質群が非特異的な吸着作用を示したのに対して、その生体防御の合目的性からいってエンドトキシンに特異的に作用するものである。このような物質は単に吸着除去としてのみではなく、種々のエンドトキシン疾患に対する臨床応用にも大いに期待されるものである。

4-2-2 分子ふるいによる除去

エンドトキシンの分子量は由来する菌種によって異なるが、推定の化学構造から考えて最も小さいと考えられるRe変異株由来のLPSでは3,000程度、最も大きい場合でも2万程度である。しかしエンドトキシンは両親媒性物質で、元来が膜成分であるという特性のために、水溶液中では膜状の高分子のミセルを形成し、分子量が数百万にも達すると考えられている。一方、その会合状態はキレート剤や界面活性剤の存在下はもちろん、エンドトキシンのマイナス荷電に結合しているカチオンの種類等の要因によっても大きく異なり、その様な存在状態がエンドトキシンの活性にも大きく影響することが知られている。膜によりエンドトキシンを除去しようとする場合は、この点に留意しなければならない。

異なった存在様式のエンドトキシン水溶液に対して、孔径の異なる各種の膜透過性を調べた、Sweadner 等が行った実験結果を表3に示す⁸⁴⁾が、塩や界面活性剤の

表2 エンドトキシンの吸着による除去法

プラス荷電物質	疎水性物質 ^{82, 83)}	特異的吸着物質
ポリミキシンB ^{77, 78)} ヒスチジン ヒスタミン ⁷⁹⁾ アミノ化-ポリ(γ-メチル-L-グルタミン酸) ビーズ ⁸⁰⁾ アンモニウム基導入プラス荷電修飾膜 ⁸¹⁾	ポリプロピレン ポリエチレン ポリスチレン PTEE膜	カプトガニ抗LPS因子 ^{32, 33)} BPI prtein ³⁴⁾ CAP-18 ³⁵⁾ LBP (LPS-Binding -Protein) ³⁶⁾ NK-lysin ³⁷⁾

表3 メンブランフィルターによる*E.coli*エンドトキシンの除去

試 料		ろ液中のエンドトキシン濃度 (g/mL)*				
組 成	エンドトキシン濃度 (g/mL)	EGWP (0.025 μ m)	VSWP (0.025 μ m)	PSVP (10 ⁶ nmwl)	PTHK (10 ⁵ nmwl)	PTGC (10 ⁴ nmwl)
水	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰
0.9% NaCl	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰
5mM MgCl ₂	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	
5mM EDTA	10 ⁻⁶		10 ⁻⁶	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁰	
0.5% コール酸Na	10 ⁻⁵			10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	<10 ⁻¹⁰
1% コール酸Na	10 ⁻⁵			10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	<10 ⁻¹⁰
2% コール酸Na, 5mM EDTA	10 ⁻⁵			10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	<10 ⁻¹⁰
1% デオキシコール酸	10 ⁻⁵			10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	<10 ⁻¹⁰

*10⁻¹⁰g/mL (100pg/mL) がリムルス法の検出限界

有無によりエンドトキシンの会合状態が変化し、その結果膜による除去効率が異なることが確かめられている。エンドトキシンは水溶液、もしくは0.9%食塩水中では孔径0.025 μ mのVSWP膜を通らないが、EDTAの共存下ではエンドトキシンのミセルの解離に伴って低分子化が起り、膜を通過する。また、EDTAの存在下でも分画分子量が10⁶のPSVP膜や10⁵のPTHK膜ではエンドトキシンの通過を阻止するが、界面活性剤の存在下では阻止しない。分子分画量が10⁴のPTGC膜が唯一いずれの条件下でもエンドトキシンの通過を阻止することがわかる。限外ろ過は実際に多くの低分子薬液に適用され、エンドトキシン汚染抗生物質⁸⁴⁾、電解質液等⁸⁵⁾の脱パイロジェンに使用されている。

局方では注射用水の製造法に関して蒸留法と共に超ろ過法が記載されている。超ろ過法は逆浸透 (RO) 膜と限外ろ過 (UF) 膜、もしくはこれらを組み合わせた膜ろ過装置を用い、十字ろ過方式で水をろ過する方法であるが、限外ろ過膜は分画分子量6,000のものを使用することと規定されている。膜を用いて脱パイロジェンを行う場合は、一般的に設備内における微生物の繁殖、膜からの微生物の漏れ、膜以外の膜モジュールからの微生物の漏れなどを防ぐ工程管理のバリデーションの実施が求められる。

4-3 エンドトキシンの不活化

エンドトキシンの活性中心がリピドAであることは述べた。その構造解明と構造活性相関研究の進展により、分子レベルでの系統的な不活化法の開発へ向けての基本的な戦略が可能となってきた。すなわち、エンドトキシンの活性発現には活性中心リピドAの構成構造因子がそれぞれ重要な働きをしていることから、これらの因子をコントロールすることによって理論的には不活化が可能となるからである。

従来、熱による不活化法はよく研究されてきたが、エ

ンドトキシンは元来耐熱性毒素として知られ、一般には熱での失活は困難であって、乾熱条件では非常に高温でしか効果が見られない^{86~90)}ことから、熱による完全な失活にはガラスやステンレス等の耐熱性器具や無機物といった極めて限られた素材についてしか応用できない。一方、エンドトキシンは湿熱、特に水溶液中では思ったほど耐熱性ではないという結果が得られている。水溶液中ではエンドトキシンの不活化は濃度、加熱時間、加熱温度という3因子によって支配され、とくにエンドトキシン濃度に強く影響されることがわかってきた⁹¹⁾。これは加熱によって加水分解反応が促進され、リン酸、及び脂肪酸の脱離といった活性喪失に直接つながる構造の崩壊が部分的に起こり易くなるためと考えられるし、またエンドトキシンの活性発現の重要な因子であるミセル状態が加熱によって大きく変化することも失活の要因の一つと考えられる。さらに水溶液が中性よりも高いか、もしくは低いpHでの加熱では水解作用が促進されることからその不活化効果は当然高くなると考えられる。もし極めて薄い濃度ではエンドトキシンが実際に熱によって不活化され、その現象が科学的に裏付けされるならば、現実の汚染濃度それほど高くない製品、特に溶液に対しては熱によるエンドトキシン管理が可能となるが、この結論に至るにはさらに多くのデータの蓄積が必要であると思われる。

一方、化学処理によってエンドトキシンの活性中心リピドAの構成因子であるジグルコサミン構造、リン酸、脂肪酸を修飾・分解することでエンドトキシンを不活化することが出来る。リピドAの構造から、弱アルカリ条件では部分的、もしくは完全にエステル結合脂肪酸の脱離が起こり、強アルカリではアミド結合脂肪酸を含めたすべての脂肪酸が遊離する。この脱アシル化が不完全な場合は部分的活性減少が起こり、完全な脱アシル化によってエンドトキシンは完全に活性を失ってしまう。アルカリによる不活化効果は水溶液中よりもエタノールや

ジメチルスルホキシド (DMSO) 中の方が効果的で、0.03 Nの水酸化ナトリウム、30℃のような穏和な条件下でも、速やかに失活することが知られており⁹²⁾、加熱できない器具のエンドトキシン除去には有効である。一方、酸性条件下ではリピドAのグリコシド結合のリン酸の脱離による活性減少が、また強酸処理では脱アシル化、ジグルコサミン構造の分裂等、完全なリピドAの構造崩壊が起こり活性は全くなくなる。しかし応用面から考えたとき、このような酸・アルカリによる不活化は、熱による不活化と同様、極めて限られた素材に対してのみにしか応用出来ない。その他、として、アセチル化、サクシニル化、フタリル化といったアルキル化反応を応用した化学修飾による不活化法も報告されている^{93, 94)}。

上記以外にも放射線、エチレンオキサイドガスを用いた滅菌工程におけるエンドトキシンの失活が研究されている。

Csakoらは溶液中での放射線によるエンドトキシンの不活化を系統的に調べ⁹⁵⁾、コバルト60では親水性部分である多糖部分が感受性で、特にO多糖は壊れやすく、それに伴って立体構造が変化すること、活性中心リピドAは放射線照射に耐性で、8.64 Mrad の照射で初めてエンドトキシンの必須構造脂肪酸である 3-ヒドロキシミリスチン酸のミリスチン酸への有意な変換、もしくはその脂肪酸が脱離すること、さらにこれらの構造変化に伴いエンドトキシン活性の減少することを見出している⁹⁶⁾。筆者らの研究でも溶液中での放射線の効果を認めているが^{97, 98)}、実用以上の照射が必要であることや、乾燥系での作用が弱いこと、さらに水溶液中での不活化作用は活性酸素、特にヒドロキシラジカルの関与が大きいと考えられ、エンドトキシンに特異的に作用するものではないことから、製品そのものに対する影響も考慮しなければならず、応用に至るには多くの問題点を克服しなくてはならない。

エチレンオキサイド等のアルキル化剤ではエンドトキシンのグルコサミンやコア多糖部分のエタノールアミンの求核置換、放射線照射では照射に伴って発生するラジカルによる分子破壊が考えられ、Tsuji等は 12%のエチレンオキサイド、88%のフロン、50%の湿度の条件下で6.5時間処理により94%の活性減少が起こると報告しているが⁹⁹⁾、そのエンドトキシン不活化効果は一定していない。

その他、オゾンと紫外線の協同作用による水溶液中のエンドトキシン不活化法¹⁰⁰⁾があるが、この機構もヒドロキシラジカルエフェクターとしてエンドトキシン分子に作用すると考えられることから、放射線照射の場合と同じ問題点は残る。

以上のように、エンドトキシンの不活化に関しては

様々な試みがなされているが、いずれの方法もまだ多くの問題点を含んでおり、結論からいって、現在実際に応用可能な絶対的な方法はない。エンドトキシンは医薬品製造において避けては通れない重要な問題であり、医薬品GMP、治験薬GMPによって無菌製剤については製品や製造環境におけるエンドトキシンの管理に高い技術と多大な労力が要求されることになったことを考えるならば、有効な不活化法の開発研究は大いに期待されるところである。

5. エンドトキシン規格値の設定と問題点

医薬品各条のエンドトキシンの規格値は、基本的に局方の参考情報「エンドトキシン規格値の設定」に従って規定される。

現在のエンドトキシン規格値を見たときに、いくつかの問題点が浮かび上がる。現在の規格値は健常人の実験データに基づく発熱最小量として設定されているものであり、考えられる負の要因のための安全域がとられていない。負の要因としては、まず健常人と疾患を持つ人との感受性の差がある。エンドトキシンによるsepsisに見られるように、術後等体力の衰えたときに通常では起こり得ない現象が微量のエンドトキシンによって引き起こされることは臨床的によく知られていることである。さらに同じ健常人であっても、当然感受性は異なる。一般的に毒性を考えると、個人差による安全域として10倍程度を見る必要があろう。さらに、現在エンドトキシンは医薬品原料、溶液（水）、容器等別々に規格値が設定されている。それぞれが規格値内であっても、エンドトキシン管理を総括的に捉えるとき、理論的にはトータルとしてのエンドトキシン量が発熱量をオーバーすることになる。現在日本の医薬品業界の実態として、汚染は規格値よりはるかに低いところに抑えられているために問題は起こっていないが、このような管理実態を考慮した場合、規格値の設定方法は再検討の余地があると思われる。

また、エンドトキシン活性はある種の化学物質によって増幅されることが知られている。最も顕著な例として、D-ガラクトサミン¹⁰¹⁾があり、マウスにおいて致死作用が10万倍にも増強されることが知られている。その他、アクチノマイシンD、BCG、インターフェロン誘発剤等にも同様の増強作用があることが知られていることから、規格値の設定に当たってはこの要因を考慮する必要がある。

6. おわりに

医薬品の品質管理を主眼としてエンドトキシンを述べてきたが、実際にエンドトキシンが生体に入ったときに

起こる現象は非常に複雑になる。エンドトキシン分子それ自体を考えてみても、血中に導入されたエンドトキシンは特異的・非特異的を問わず血清中の種々の物質と結合し、それによって物性も活性も大きく変化する。何よりもエンドトキシンはフリーのLPS分子としては存在せず、菌体、もしくは菌体断片として存在すること自体、*in vitro*の実験とは根本的に異なってくる。事実、強力な活性を有するLPSを菌体成分として持つ菌でも、菌体そのものをリムルステストで測定した場合に、その表層構造に影響されてほとんど活性がつかまらないことがある。一方、血中に入った菌体は血中のLBPによって菌体表面のLPSが特異的に結合抽出され、強力な毒素として作用すると考えられている^{102~104)} (図4)。さらにエンドトキシンを無毒化する機構としての酵素の存在等が知られており、それによってリピドAの脱アシル化反応のような分子修飾が起こる^{105~107)}。通常脱アシル化反応により活性が減少すると考えられるが、例えば前述のようにサルモネラリピドAのようなヘプタアシル化合物の脂肪酸が外れてヘキサアシル化体に変化した場合はヒトに対しての不活性体が強毒性物質に変化することを意味する。

臨床的に考えるならば、エンドトキシン疾患が必ずしもエンドトキシン量のみで捉えられないという点に留意しなくてはならない。生体反応において、エンドトキシンはむしろ生体の状態、他の外的・内的因子との相乗効果でその作用が千倍にも一万倍にも増幅されるという現象が起こる。すなわち、微量のエンドトキシンが必ずしも絶対的に無毒性なのではなく、諸条件が整ったときに想像を絶する作用を発揮する可能性を秘めている。従ってエンドトキシン定量は一つの目安にすぎないことも肝に銘じておく必要がある。それ以外にも侵襲された生体の状況や、トレランス誘導の問題等生体反応側の問題が数多く存在する。

以上のことを考えると、生体内でのエンドトキシンの挙動を疾患との関連で総合的に解説することは、筆者の力の及ぶところではなく、また本論の目的とするところでもないが、ここまで述べてきた基本的なエンドトキシンの特性を常に念頭に置くことが、この複雑な分子の正しい理解を得るための第一歩であることも間違いない。

参考文献

- 1) Ziegler EJ, McCutchan JA, Fisher CJ, Jr Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, Wortel CH, Fink MP, Dellinger RP, et al. and the Sepsis Study Group: *N Engl J Med* 324, 429-436 (1991)
- 2) R.Pfeiffer, Z.Hyg: *Infektr.*, 11, 393 (1892)
- 3) E.Centanni: *Deutsch. Med. Wochenshr.*, 20, 148

- (1894)
- 4) 中江太治: 内毒素 (本間遜, 岩永貞昭, 丹羽充, 吉田昌男編), P13 (1983)
- 5) G.F.L.Ames, E.N.Spudich, H.Nikaido, *J.Bacteriol.*, 117, 406 (1974)
- 6) L.Leive, Ann.N.Y.: *Acad.Sci.*, 235, 109 (1974)
- 7) M.H.Stephen, A.Claesson, A.M.Jansson, L.Larsson, B.G.Pring, C.M.Town, B.Ekstrom: *Nature*, 327, 730 (1987)
- 8) E.Th.Rietschel, C.Galanos, O.Luderitz, O.Westphal, (D.Webb, ed.) *Immunopharmacology and the Regulation of Leukocyte Function*, Marcel Decker Inc. (1982)
- 9) 棚元憲一: ファルマシア, 24, 163 (1988)
- 10) 棚元憲一: 臨床と微生物, 16, 58 (1989)
- 11) Fujihara M., Muroi M., Tanamoto K., Suzuki T., Azuma H., Ikeda H.: *Pharmacol. Ther.* 100, 171-194, (2003)
- 12) F.Coceani, I.Bishai, A.Dinareello, F.A. Fitzpatrick, *Am.J.Physiol.*, 244, 785 (1983)
- 13) B.M.R.N.J. Woloski: *Science*, 230, 1035 (1985)
- 14) E. Atkins: *Physiol. Rev.*, 40, 580 (1960)
- 15) E.Th. Rietschel, U.Schade, O. Luderitz, H.Fischer, B.Peskar, (D.Schlessinger ed.): *Microbiology* (1980)
- 16) W. I. Cranston, *Fed. Proc.*, 38, 49 (1979)
- 17) W. Feldberg, *Proc. R. Soc. London Ser.*, B191, 199 (1974)
- 18) R.Siegert, W.K.Philipp-Dormston, K.Radsak, H. Menzel: *Infect. Immun.* 14, 1130 (1976)
- 19) C.A.Dinareello, H.A.Bernheim, G.W.Duff, H.V.Le, T.L.Nagabhushan, N.C.Hamilton, F.Coceani, *J.Clin. Invest.*, 74, 906 (1984)
- 20) S.K.Ackerman, H.D.Hochstein, K.Zoon, W.Browne, E.Rivera, B.Elisberg, *J.Leukocyte Biol.*, 36, 17 (1984)
- 21) L.T.Old: *Nature*, 326, 330 (1987)
- 22) B.Beutler, A.Cerami: *New Engl. J. Med.*, 316, 740 (1987)
- 23) C.A.Dinareello, J.G.Cannon, S.M.Wolff, H.A. Bernheim, B.Beutler, A.Cerami, I.S.Figari, M.A.Palladino, J.V.Oconnor: *J.Exp. Med.*, 163, 1433 (1986)
- 24) P.P.Nawroth, I.Bank, D.Handley, J.Cassimeris, L.Chess, D.Stern: *J.Exp.Med.*, 163, 1363 (1986)
- 25) M.K.Hoffman: *Lymphokine Res.*, 5, 255 (1986)
- 26) Greenman RL, Schein RM, Martin MA, Wenzel RP, MacIntyre NR, Emmanuel G, Chmel H, Kohler RB, McCarthy M, Plouffer J.: *JAMA*, 266,

- 1097-1102 (1991)
- 27) Emancipator K., Csako G., Elin RJ.: *Infect Immun*, 60, 596-601 (1992)
- 28) Harris HW., Grunfeld C., Feingold KR., Rapp JH.: *J Clin Invest*, 86, 696-701 (1990)
- 29) Notea MG., Demacker PNM., Kullberg BJ., Boerman OC.,Verschueren I., Stalenhoef AFH., van der Meer JWM.: *J Clin Invest*, 97, 1366-1372 (1996)
- 30) Pajkrt D., Doran JE., Koster F., Lerch PG., Amet B., van der Poll T., Cate JW., van Deventer SJH.: *J Exp Med*, 184, 1601-1608 (1996)
- 31) Mey A., Leffler H., Hmama Z., Normier G., Revillard JP.: *J Immunol*, 156, 1572-1577 (1996)
- 32) Ried C., Wahl C., Miethke T., Wellnhofer G., Landgraf C., Schneider Mergener J., Hoess A.: *J Biol Chem*, 271, 28120-28127 (1996)
- 33) M.Kloczewiak, K.M.Black, P. Loisselle, J.M.Cavaillon, N.Wainwright, H.S.Warren, *J.Infect. Dis.*, 170, 1490 (1994)
- 34) R.G.Little, D.N.Kelner, E.Lim, D.J.Burke, P.J.Conlon, *J. Biol. Chem.*, 269, 1865 (1994)
- 35) J.W.Larrick, M.Hirata, H.Zheng, J.Zhong, D.Bolin, J.M.Cavaillon, H.S.Warren, S.C.Wright, *J. Immunol.*, 152, 231 (1994)
- 36) A.H.Taylor, G.Heavner, M.Nedelman, D.Sherrie, E.Brant, D.Knight, J.Ghrayeb, *J. Biol. Chem.*, 270, 17934 (1995)
- 37) M.Andersson, R.Girard, P.Cazenave, *Infect. Immun.*, 67, 201 (1999)
- 38) N.R.Wainwright, R.J.Miller, E.Paus, T.J.Novitsky, M.A.Fletcher, T.M.McKenna, T.Williams: in *Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions*, Elsevier Science Publishers B.V., p. 315 (1990)
- 39) C.E. Desch, P. OHara, J.M.Harlan, *Infect. Immun.*, 57, 1612 (1989)
- 40) H.S. Warren, M.L. Glennon, N.Wainwright, S.F.Amato, K.M.Black, S.J.Kirsch, G.R.Riveau, R.I.Whyte, W.M.Zapol, T.J.Novitsky, *Infect. Immun.*, 60, 2506 (1992)
- 41) T. Morita, S. Ohtsubo, T. Nakamura, S. Tanaka, S. Iwanaga, K. Ohashi, M. Niwa, *J. Biochem.*, 97, 1611 (1985)
- 42) G.Alpert, G.Baldwin, C.M.Thompson, N.R.Wainwright, T.J.Novitsky, Z.Gillis, J. Parsonnet, M.A.Feisher, G.R.Siber, *J. Infect. Dis.*, 165, 494 (1992)
- 43) R.Saladino, C.T.Garcia, C.M.Thompson, B.K.Hammer, J.Parsonnet, T.J.Novitsky, G.R. Siber, G.R.Fleisher, *Cric. Shock.*, 42, 104 (1994)
- 44) Cai M., Sakamoto A., Ogawa R.: *Eur J Pharmacol*, 295, 215-220 (1996)
- 45) Ruetten H., Southan GJ., Abate A., Thiernemann C.: *Br J Pharmacol*, 118, 261-270 (1996)
- 46) Wu CC., Ruetten H., Thiememann C.: *Eur J Pharmacol*, 300, 99-104 (1996)
- 47) Gardiner SM., Kemp PA., March JE., Bennet T.: *Br J Pharmacol*, 118, 141-149 (1996)
- 48) van der Poll T., Coyle SM., Barbosa K., Braxton CC., Lowry SF.: *J Clin Invest*, 97, 713-719 (1996)
- 49) Benigni F., Sacco S., Pennica D., Ghezzi P.: *Am J Pathol*, 149, 1847-1850 (1996)
- 50) Zinetti M., Galli G., Demitri MT., Fantuzzi G., Minto M., Ghezzi P., Alzani R., Cozzi E., Fratelli M.: *Immunology*, 86, 416-421 (1995)
- 51) De Castro CMMB., Nahori MA., Dumary CH., Vargaftig BB., Bachelet M.: *Eur J Pharmacol*, 294, 669-676 (1995)
- 52) Gonzalez PK., Zhuang J., Doctrow SR., Malfroy B., Benson PF., Menconi MJ., Fink MP.: *J Pharmacol Exp Ther*, 275, 798-806 (1995)
- 53) Sewerynek E., Malchiorri D., Reiter RJ., Ortiz GG., Lewinski A.: *Eur J Pharmacol*, 293, 327-334 (1995)
- 54) Fisher CJ., Agosti JM., Opal SM., Lowry SF., Balk RA., Sadoff JC., Abraham E., Schein RMH., Benjamin E.: *J Clin Invest*, 98, 1533-1538 (1996)
- 55) Leturcq DJ., Moriarty AM., Talbott G., Winn RK., Martin TR., Ulevitch RJ.: *J Clin Invest*, 98, 1533-1538 (1996)
- 56) "Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M.: *J. Exp. Med.*, Vol.189, Num.11, 1777-1782 (1999)
- 57) Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN.: *J. Biol. Chem.*, 276, 38044-38051 (2001)
- 58) Kawamoto T, Ii M, Kitazaki T, Iizawa Y, Kimura H.: *Eur J Pharmacol.*; 584(1): 40-8. (2008)
- 59) Sha T, Sunamoto M, Kitazaki T, Sato J, Ii M, Iizawa Y.: *Eur J Pharmacol.* 1; 571(2-3): 231-9. (2007)
- 60) Tanamoto K., Galanos C., Ludenitz O., Kusumoto S., Shiba T.: *Infect Immun*, 44, 427-433 (1984)
- 61) "Saitoh S, Akashi S, Yamada T, Tanimura N, Kobayashi M, Konno K, Matsumoto F, Fukase K, Kusumoto S, Nagai Y, Kusumoto Y, Kosugi A, Miyake K. *Int. Immunol.*, 16, 961-969 (2004)
- 62) K. Tanamoto, *Adv. Exp. Mord. Biol.* 256, 203 (1990)
- 63) S.K. Maitra, M.C. Sholtz, T.T. Yoshioka, A. B. Guze,

- Proc. Natl. Acad. Sci.* 8, 3993 (1978)
- 64) Sonesson, L. Larsson, G. Westerdahl, G. Odham, *J. Chromatography*, 417, 11 (1987)
- 65) F.B.Bang, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 98, 325 (1956)
- 66) J. Levin, F.B.Bang, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 115, 265 (1964)
- 67) 中村隆範, 牟田達史, 宮田敏行, 岩永貞昭, 徳永文稔, エンドトキシン臨床研究の新しい展開 (織田敏次編), p. 9 (1987)
- 68) T. Morita, S. Tanaka, T. Nakamura, S. Iwanaga, *FEBS Lett.*, 129, 318 (1981)
- 69) H. Loppnow, B. Brade, I. Durrbaum, C. A. Dinarello, *J. Immunol.*, 142, 3229 (1989)
- 70) C. Galanos, V. Lehmann, O. Luderitz, E. T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, A. Freudenberg, T. Hansen-Hagge, T. Luderitz, G. McKenzie, U. Shade, W. Strittmatter, K. Tanamoto, U. Zaringer, M. Imoto, M. Yamamoto, S. Kusumoto, T. Shiba, *Eur. J. Biochem.*, 140, 221 (1984)
- 71) Tanamoto K & Azumi S. *J. Immunol.* 164, 3149-3156, (2000)
- 72) Muroi M., Ohnishi T. & Tanamoto K. *Infect. Immun.* 70(7), 3546-3550, (2002)
- 73) Muroi M, Tanamoto K., *J. Biol. Chem.*, 281, 5484-91 (2006)
- 74) Tanamoto K.: *Infection and Immunity*, 690-692 (1995)
- 75) 土屋正和, 防菌防黴誌, 24, 593 (1996)
- 76) Berger, G. D. Ellenbogen, L. Ginger, Pyrogens, *Adv. Chem. Ser.*, 16, 168 (1956)
- 77) C. Issekutz, *J. Immunol. Methods*, 61, 275 (1983)
- 78) K.W. Talmadge, C.J. Siebert, *J. Chromatogr.*, 476, 175 (1989)
- 79) S. Minobe, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, *J. Chromatogr.*, 26, 193 (1983)
- 80) Hirayama, M. Sakata, Y. Ohkura, H. Ihara, K. Ohkuma, *Chem. Pharm. Bull. Tokyo.*, 40, 2106 (1992)
- 81) S. Minobe, T. Sato, T. Tosa, T. Chibata, *J. Chromatogr.*, 263, 193 (1983)
- 82) J. R. Robinson, M.C. O'Dell, J. Takacs, T. Barnes, Membrana Inc. and Carole Genovesi Wyeth Labs.: in Depyrogenation (Parenteral Drug Association, Philadelphia), 54 (1985)
- 83) Nagasaki, M. Tsuchiya, A. Takaoka, S. Kishi, Eui Lee In, S. Nakao, S. Kimura, "Adsorption of Endotoxin on Membranes" ICOM'96 (1996)
- 84) K. J. Sweadner, M. Forte, L.L. Nelsen, *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 382 (1977)
- 85) L. W. Henderson, E. Beans, *Kidney Int.*, 14, 522 (1978)
- 86) H. Welch, C.W. Price, V.L. Chandler, A.C. Hunter, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 34, 114 (1945)
- 87) J. Levin, P.A. Tomasulo, R.S. Oser, *J. Lab. Clin. Med.*, 75, 903 (1970)
- 88) K. Tsuji, A.R. Lewis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 715 (1978)
- 89) M.J. Akers, K.E. Avis, B. Thompson, J. Parenter. *Drug. Assoc.*, 34, 330 (1980)
- 90) B.H. Sweet, J.F. Huxsoll: in Depyrogenation (Parenteral Drug Association, Philadelphia), p.101 (1985)
- 91) 川崎浩之進, 他, 昭和61年度官民共同プロジェクト研究報告 (第二分野), p. 196 (1986)
- 92) M. Niwa, K.C. Milner, E. Ribi, J.A. Rudbach, *J. Bacteriol.*, 97, 1069 (1969)
- 93) K. Tanamoto, *Infect. Immun.*, 6, 1705 (1994)
- 94) K. Tanamoto, *FEBS Lett.*, 35, 325 (1994)
- 95) G. Csako, C. M. Tsai, B. L. Slomiany, A. Herp, R.J. Elin, *Radiat. Res.*, 105, 283 (1986)
- 96) G. Csako, E. A. Suba, A. Ahlgren, C.M. Tsai, R.J. Elin, *J. Infect. Dis.*, 153, 98 (1986)
- 97) 細淵和成, 棚元憲一他, 平成7年度東京都立アイソトープ総合研究所 年報34 (1995)
- 98) 細淵和成, 棚元憲一他, 平成7年度東京都立アイソトープ総合研究所 年報32 (1996)
- 99) K. Tsuji, S. J. Harrison: in Biochemical applications of the Horseshoe Crab (Limulidae), E. Cohen Ed. (Alan R. Liss. New York) p. 353 (1979)
- 100) M. G. Lee, P. B. Hunt, J. Vallor, J. Parenteral Sci. *Technol.*, 45, 183 (1991)
- 101) Galanos, C., M. A. Freudenberg, and W. Reutter. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 5939-5943 (1979)
- 102) Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD.: *J Exp Med.* 180: 1025-35 (1994)
- 103) Vesey CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS.: *Infect Immun.* 68: 2410-7 (2000)
- 104) Gioannini TL, Teghanemt A, Zhang D, Coussens NP, Dockstader W, Ramaswamy S.: *Weiss JP. Proc Natl Acad Sci*, 23, 101, 4186-91 (2004)
- 105) Hall, C. L., & Munford, R. S.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 80, 6671-6675 (1983)
- 106) Fukuda, I., Tanamoto, K., Kanegasaki, S., Yajima, Y. & Goto, Y.: *Br. J. Exp. Pathol.* 70, 267-274 (1989)

-
- 107) Erwin, A., Mandrell, R. & Munford, R.: *Infect. Immun.* 59, 1881-1887 (1991)