

細胞を用いた生物活性測定(IL-2, G-CSF, GM-CSF, EPO 等)

■概要

インターロイキンや顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、エリスロポエチン(EPO)などのサイトカインは特定の細胞種に対して特異的に増殖活性を有することが知られており、医薬品の開発候補としても重要です。これらは、第一世代のバイオ医薬品の特許期間満了に伴うバイオ後続品(バイオシミラー医薬品)*1のターゲットとなっています。これらのサイトカインの測定方法には ELISA 法を用いた方法もありますが、ELISA 法で得られた結果は生物活性を示すものではありません。医薬品としての開発には、生物活性の測定が必要となります。本機構では各種サイトカイン(IL-2, G-CSF, GM-CSF, EPO 等)に応答性を有する各種培養細胞の増殖活性を指標に供試検体の生物活性測定(バイオアッセイ)を実施しています。

*1 バイオ後続品(バイオシミラー医薬品): Biosimilars、バイオ医薬品の後発医薬品(ジェネリック医薬品)のこと。

■方法(細胞増殖活性測定)

水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩である WST-8 を用いた細胞増殖測定法*2を用いています。WST-8 を用いた細胞増殖測定法の原理を図 1 に示します。細胞内脱水素酵素の働きによって、WST-8 が還元され水溶性の WST-8 ホルマザンが産生されます。産生されたホルマザン量は細胞内脱水素酵素活性に依存し、それらは細胞数と直線的な比例関係にあることが知られています。供試検体によって細胞増殖がされた場合には、ホルマザン産生量が増加します。従って、このホルマザンの産生量を吸光度(450 nm)により測定することで、相対的な細胞増殖活性を測定することができます。

- *2 M. Ishiyama, *et al.*, 1997. *Talanta*, **44**, 1299-1305.
H. Tominaga, *et al.*, 1999. *Anal. Commun.*, **36**, 47-50.
T. Miyamoto, *et al.*, 2002. *Avian Dis.*, **46**, 10-16.
K. Yoshimura, *et al.*, 2002. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, **9**, 22-26.

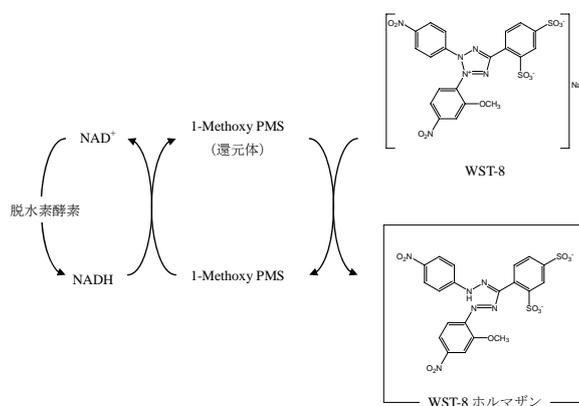


図 1. 細胞内脱水素酵素による WST-8 ホルマザン産生

■実施例

■実施例 1: G-CSF

以下にヒト組み換え G-CSF の試験結果例を示します。96 ウェルプレートで NFS-60 細胞^{*3}を段階希釈した供試検体暴露下で培養し、WST-8 試薬の添加・培養後、得られる吸光度(450 nm)から細胞増殖活性測定を行いました。得られた増殖曲線から、ロジスティック回帰により、50%細胞増殖濃度(EC₅₀ 値)を算出した結果、既報の値(0.05-0.2 ng/mL)の範囲内に入っていることがわかりました(図 2)。

*3 G-CSF 応答性の細胞株

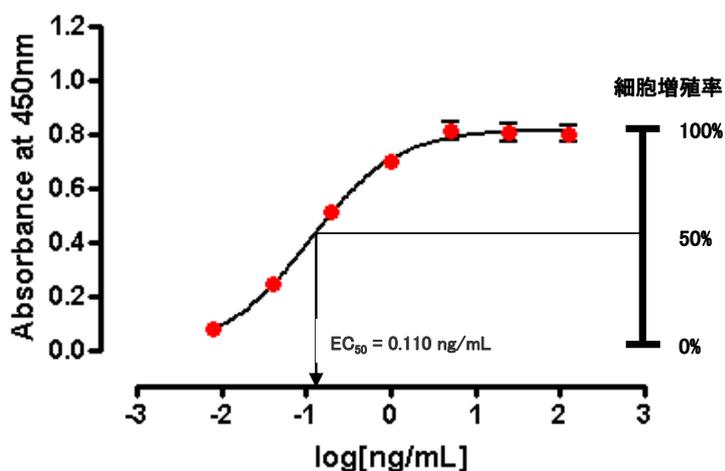
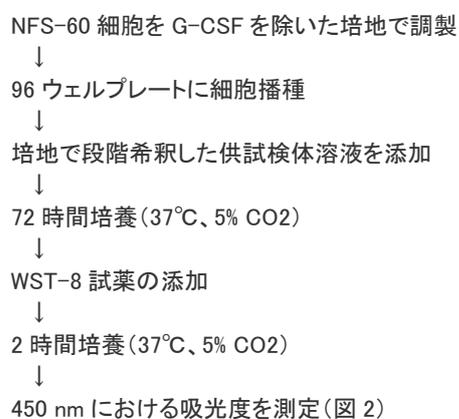


図 2. ヒト組み換え G-CSF 活性測定結果例

供試検体濃度依存的な吸光度の上昇(細胞増殖)が観察され、50%細胞増殖濃度(EC₅₀ 値)は、既報の値(0.05-0.2 ng/mL)の範囲内に入っていることがわかります

■実施例 2: EPO

エリスロポエチン(erythropoietin ; EPO)については、TF-1 細胞*4を用いることで、G-CSF 同様の方法で細胞増殖活性の測定が可能です(図 3)。

*4 EPO 応答性の細胞株

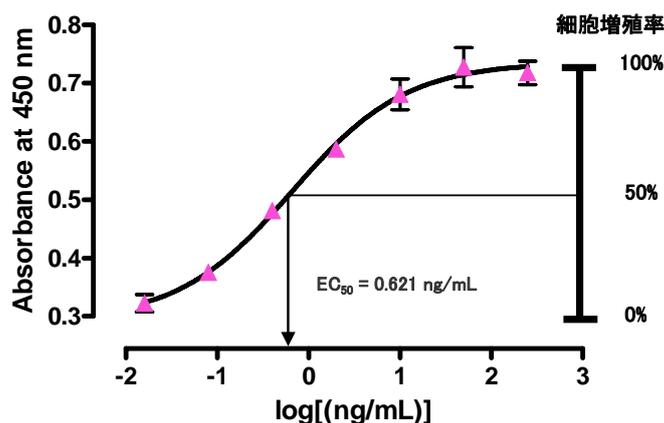


図 3. ヒト組み換え EPO α 活性測定結果例

■応用

- ◆ バイオ医薬品・後続品の安価な生物活性評価として有用 (動物試験に比べ安価)
- ◆ バイオ後続品開発における先発品との生物活性の同等性/同質性確認に使用可能
- ◆ バイオ後続品開発における安定性試験での生物活性測定に使用可能 (多検体実施)

本機構では、IL-2, G-CSF, GM-CSF, EPO 等について生物活性測定(バイオアッセイ)を実施しています。これらのサイトカインの医薬品としての開発のデータとして利用していただけます。その他のサイトカインにつきましても、ご相談に応じますので、ぜひお問い合わせください。

■お問合せ先

安定性試験・品質試験等お問合せ先：

(東日本担当窓口)

化学物質安全センター営業企画部 TEL 03 (5804) 6134 / FAX 03 (5804) 6140

E-mail: cbc@ceri.jp

(西日本担当窓口)

化学物質安全センター大阪支所 TEL 06 (6744) 2045 / FAX 06 (6744) 2052

E-mail: cbc@ceri.jp

試験系開発お問合せ先：

安全性評価技術研究所 研究第一部 TEL 0480 (37) 2601 / FAX 0480 (37) 2521

E-mail: cac-bio@ceri.jp

ホームページからもお問合せできます。 <http://www.cerij.or.jp>