MONTIRELIN HYDRATE (NS-3) の抗原性試験

藤沢 広, 西村 健志, 木村喜代史

日本新薬株式会社 創薬研究本部
〒601 京都市南区西大路通八条下ル

ANTIGENICITY STUDY ON MONTIRELIN HYDRATE (NS-3)

Hiroshi FUJISAWA, Takeshi NISHIMURA and Kiyoshi KIMURA

*Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.,
Nishiohji Hachijo, Minami-ku, Kyoto 601, Japan*

(Received July 10, 1995 ; Accepted October 6, 1995)

ABSTRACT — An antigenicity study of montirelin hydrate (NS-3), a new drug for the treatment of disturbance of consciousness, was conducted in Hartley guinea pigs. Animals were sensitized twice by subcutaneous injections of montirelin hydrate in combination with Freund's complete adjuvant and twice by intramuscular injections of montirelin hydrate alone.

Montirelin hydrate was found to be negative in the homologous passive cutaneous anaphylaxis test carried out with sera from the sensitized guinea pigs. Negative results were also obtained in the active cutaneous anaphylaxis test and the active systemic anaphylaxis test in guinea pigs sensitized with montirelin hydrate.

These results show that montirelin hydrate has no antigenicity under the present experimental conditions.

KEY WORDS : Montirelin hydrate, NS-3, Antigenicity study, Guinea pigs.

緒 言

Montirelin hydrate, (–)-N-[(3R,6R)-6-methyl-5-oxo-3-thiomorpholinyl]carbonyl]-L-histidyl-L-prolinamide tetrahydrate (NS-3, 以下 montirelin と略称) は, thyrotropin-releasing hormone (TRH) の類

縁体で endopeptidase による分解を受け難くすることにより, TRH より強くかつ持続性の中樞神経賦活作用を有する意識障害治療薬として, Grünenthal 社 (Germany) において合成された (Flohé *et al.*, 1983 ; McIntosh *et al.*, 1988 ; Ogasawara *et al.*, 1993)。

今回, 著者らは本薬の安全性評価の一環として, モルモットを用いた抗原性試験を実施したのでその成績を報告する。

連絡先: 〒601 京都市南区西大路通八条下ル
日本新薬株式会社 創薬研究本部
田村 博信

実験材料および方法

1. 被験物質

Montirelin は Fig. 1 に示す化学構造を有し、分子量480.54の白色の結晶または結晶性の粉末である。Methanol に溶けやすく、無水 ethanol にやや溶けやすく、水にやや溶けにくく、ether にほとんど溶けない。被験物質は Grünenthal 社 (Germany) より供与を受け、常温気密容器にて保管した。本試験ではロット番号5 (純度94.9%) を使用した。

その他、陽性対照物質として、bovine serum albumin (以下 BSA, Miles Laboratories, Inc.) を使用した。

2. 試薬

Adjuvant として Freund's complete adjuvant (FCA, Iatron) を使用した。その他、生理食塩液 (大塚製薬) および Evans blue (Merck) を使用した。

3. 使用動物および飼育条件

(1) 使用動物

Hartley 系雄性クリーンモルモットを日本エスエルシーより購入し、バリアーシステムの飼育室において2週間の予備飼育後、試験 (感作開始時体重361~463 g) に使用した。

(2) 飼育条件

動物は室温21~25℃、湿度45~65%、換気回数15回/時間以上、人工照明12時間の一定条件下に飼育し、飼育用固型飼料 (GM-1, 船橋農場) および水道水を自由に摂取させた。

Fig. 1. Chemical structure of montirelin.

4. 試験方法

(1) 群構成

第1群: Montirelin 0.001 mg/kg 感作群, 第2群: montirelin 0.01 mg/kg 感作群, 第3群: montirelin 0.1 mg/kg 感作群, 第4群: BSA 10 mg/kg 感作群および第5群: 生理食塩液感作群の5群とし、20匹のモルモットを体重を指標として1群当たり4匹ずつ均等に配分した。なお、montirelin の感作量については腹腔内投与による最大無作用量をもとめて設定した。すなわち、montirelin をモルモットに腹腔内注射したところ、2 mg/kg で自発運動亢進が認められたが、1 mg/kg では挙動に変化は認められなかった。従って、最大無作用量を1 mg/kg [montirelin の推定臨床適用量0.01 mg/kg/日 (0.5 mg/body/日) の100倍量に相当] とし、montirelin の1回当たりの感作量を最大無作用量1 mg/kg の1/1,000, 1/100 および 1/10, すなわち、0.001 mg/kg, 0.01 mg/kg および0.1 mg/kg の3用量とした。

(2) 感作抗原液の調製

第1群については montirelin 0.002 mg/ml の生理食塩水溶液と等容量の FCA との混合乳化液および montirelin 0.001 mg/ml の生理食塩水溶液, 第2群については montirelin 0.02 mg/ml の生理食塩水溶液と等容量の FCA との混合乳化液および montirelin 0.01 mg/ml の生理食塩水溶液, 第3群については montirelin 0.2 mg/ml の生理食塩水溶液と等容量の FCA との混合乳化液および montirelin 0.1 mg/ml の生理食塩水溶液, 第4群については BSA 20 mg/ml の生理食塩水溶液と等容量の FCA との混合乳化液および BSA 10 mg/ml の生理食塩水溶液ならびに第5群については生理食塩液と等容量の FCA との混合乳化液および生理食塩液を感作抗原液とした。

(3) 感作

Montirelin の臨床適用経路は静脈内であるが、本薬の抗原性の有無をより明確にする為、montirelin とアジュバントとの等量混合乳化液の皮下注射および montirelin 単独の筋肉内注射を繰り返して感作を行った。すなわち、上記の各抗原液を1 ml/kg の容量で週2回、合計4回注射して感作を行った。第1回目および第3回目は皮下注射により FCA との等

量混合乳化液を、また、第2回目および第4回目は筋肉内注射により感作抗原の生理食塩水溶液を感作した。

(4) 惹起抗原液の調製

惹起抗原としては以下のものを使用した。なお、惹起抗原 C および D は montirelin およびその代謝物とモルモット血清蛋白との結合物の生成の可能性を想定したものである。

惹起抗原 A: Montirelin 0.1 mg/ml 生理食塩水溶液

惹起抗原 B: 惹起抗原 A に0.5% Evans blue を含むもの

惹起抗原 C: Montirelin の生理食塩水溶液を0.33 mg/kg 腹腔内注射したモルモットから30分および6時間後に採血して得られた血清を等量混合したもの

惹起抗原 D: 惹起抗原 C に0.5% Evans blue を含むもの

惹起抗原 E: 生理食塩液を、体重100 g 当たり 1 ml モルモットに腹腔内注射し、30分および6時間後に採血して得られた血清を等量混合したもの

惹起抗原 F: BSA 1 mg/ml 生理食塩水溶液

惹起抗原 G: BSA 10 mg/ml 生理食塩水溶液

惹起抗原 H: 惹起抗原 G に0.5% Evans blue を含むもの

惹起抗原 I: 生理食塩液

(5) 受動性皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応

4回感作終了後7日目に、眼窩静脈叢より採血して分離した血清を用いて、PCA 反応試験を実施した。すなわち、除毛した無処置モルモットの背部皮内に、生理食塩液を用いて4倍希釈した血清の50 μ l を1血清当たり4匹のモルモットに注射して受身感作した。なお、各モルモットに正常モルモットの4倍希釈血清を同様に皮内注射した。これより4時間あるいは8日後に、montirelin 感作群および生理食塩液感作群の血清を皮内注射したモルモットには、惹起抗原 B あるいは D を 1 ml/animal 静脈内注射した。BSA 感作群の血清を皮内注射したモルモットには、惹起抗原 H を同様に静脈内注射した。こ

れより30分後に致死せしめて、PCA 反応による漏出色素斑を観察し、次の判定基準(鈴田, 1969 a)に従って判定した。

- : 無反応あるいは正常モルモットからの血清注射部位にみられる程度の5 mm 未満の色素斑
- +: 色素斑の径が5 mm 以上, 10 mm 未満
- ++: 色素斑の径が10 mm 以上, 15 mm 未満
- +++: 色素斑の径が15 mm 以上, 20 mm 未満
- ++++: 色素斑の径が20 mm 以上

(6) 能動性皮膚アナフィラキシー (ACA) 反応

4回感作終了後14日目に、montirelin 感作群および生理食塩液感作群のモルモットには、除毛した背部皮内に惹起抗原 A, C および E を50 μ l/site 注射した。BSA 感作群のモルモットには、惹起抗原 F, G および陰性対照として惹起抗原 I を同様に注射した。これより3, 24および48時間後に、皮膚反応を次の判定基準(鈴田, 1969 b; 佐野, 1973)に従って判定した。なお、正常血清(惹起抗原 E)によっても注射部位に非特異的な発赤がみられるので、惹起抗原 C による反応の判定は、惹起抗原 E による反応と比較することによって行った。

惹起3時間後:

- : 無反応あるいは惹起抗原 E 注射部位にみられる程度の軽度の発赤が認められたもの
- +: 明らかな発赤, 浮腫がいずれか, あるいは共に認められたもの
- ++: 充血が認められたもの
- +++: 出血が認められたもの
- ++++: 壊死が認められたもの

惹起24および48時間後:

- : 無反応あるいは惹起抗原 E 注射部位にみられる程度の軽度の発赤が認められたもの
- +: 明らかな発赤が認められたもの
- ++: 硬結が認められたもの
- +++: 二重発赤, 水疱がいずれか, あるいは共に認められたもの
- ++++: 壊死が認められたもの

(7) 能動性全身アナフィラキシー (ASA) 反応

4回感作終了後21日目に、montirelin 感作群および生理食塩液感作群のモルモットには、惹起抗原 C

の 1 ml/animal を静脈内注射した。また、BSA 感作群のモルモットには、惹起抗原 G の 1 ml/animal を同様に注射した。惹起抗原注射後より発現するアナフィラキシー症状の程度を次の判定基準（鈴木，1969c）に従って行った。

- －：いずれのアナフィラキシー症状も認められなかったもの
- ＋：立毛，搔鼻，不安感，震え，くしゃみあるいは呼吸促進の症状のうち，2 つ以上該当する症状が認められたもの
- ++：＋の症状に加え，排尿・排便，呼吸困難あるいは歩行不安定の症状のうち，1 つ以上該当する症状が認められたもの
- +++：＋，++ の症状に加え，痙攣転倒の症状が加わるが死を免れたもの
- ++++：ショックをおこし，死亡したもの

実験結果

1. PCA 反応

Table 1 に PCA 反応試験の成績を示した。Montirelin 感作群のモルモットから採取した血清による，4 時間および 8 日間 PCA 反応は，惹起抗原 B および惹起抗原 D のいずれによっても陰性であった。BSA 感作群のモルモットから採取した血清による 4 時間 PCA 反応は，全例が陽性であった。8 日間 PCA 反応は 4 例中 1 例が陽性であった。生理食塩液感作群では，montirelin 感作群の場合と同様，いずれの PCA 反応も陰性であった。

2. ACA 反応

Table 2 に ACA 反応試験の成績を示した。Montirelin 感作群では，惹起抗原 A および惹起抗原 C による惹起 3，24 および 48 時間後のいずれにおいても ACA 反応は認められなかった。一方，BSA 感作群では惹起 3，24 および 48 時間後のいずれにおいてもそれぞれ 4 例全例に＋以上の ACA 反応が認められた。生理食塩液感作群ではいずれの判定時間においても ACA 反応は認められなかった。

3. ASA 反応

Table 3 に ASA 反応試験の成績を示した。Mon-

tirelin 感作群では，いずれの感作量でも ASA 反応は認められなかった。BSA 感作群では全例に＋以上の反応が認められ，その内 3 例が死亡した。生理食塩液感作群では，montirelin 感作群と同様，ASA 反応は認められなかった。

考 察

Montirelin の安全性評価の一環として，その抗原性をモルモットを用いて検討した。Montirelin 感作モルモットで，4 時間および 8 日間 PCA 反応ならびに ASA 反応が認められなかったことから，montirelin は IgE あるいは IgG₁ 抗体による I 型アレルギー反応を誘発する可能性が低いことが示唆された。また，montirelin 感作モルモットで，3 時間 ACA 反応が認められなかったことから，montirelin は III 型アレルギー反応を誘発する可能性が低いことが示唆された。すなわち，montirelin は今回検討した方法では，体液性免疫の関与するアレルギー反応を誘発しないと考えられる。

次に，montirelin 感作モルモットで，24 および 48 時間 ACA 反応がいずれも認められなかったことから，montirelin は，IV 型アレルギー反応すなわち細胞性免疫の関与するアレルギー反応を誘発しないことが示唆された。

以上のように，montirelin の抗原性の有無をモルモットを用いて検討したが，今回検討した方法においては，抗原性を持たないことが示唆された。

要 約

Montirelin の抗原性について，モルモットを用い，受動性皮膚アナフィラキシー（PCA）反応，能動性皮膚アナフィラキシー（ACA）反応および能動性全身アナフィラキシー（ASA）反応試験を実施し，以下の成績を得た。

1. Montirelin を感作したモルモットの血清による，4 時間および 8 日間 PCA 反応はいずれも陰性であった。
2. Montirelin を感作したモルモットにおける

Table 1. Four-hour and 8-day homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test in guinea pigs.

Sensitization	Sensitized animal No.	Reaction score in 4-hr PCA ^{a)}												Reaction score in 8-day PCA ^{a)}											
		Antigen B ^{b)}				Antigen D ^{c)}				Antigen H ^{d)}				Antigen B ^{b)}				Antigen D ^{c)}				Antigen H ^{d)}			
		+	++	+++	---	+	++	+++	---	+	++	+++	---	+	++	+++	---	+	++	+++	---	+	++	+++	---
Montirelin	0.001	4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
Montirelin	0.01	4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
Montirelin	0.1	4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
BSA	10									0	0	4	0									4	0	0	0
										0	0	2	0									4	0	0	0
										0	0	4	0									3	1	0	0
										0	0	4	0									4	0	0	0
Saline	—	4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				
		4	0	0	0	4	0	0	0					4	0	0	0	4	0	0	0				

BSA : Bovine serum albumin.

a) : The severity of PCA reaction was graded on the scale of — to ++++ : —, no blue spot or response of less than 5 mm in diameter of blue spot ; +, response of more than 5 mm and less than 10 mm in diameter of blue spot ; ++, response of more than 10 mm and less than 15 mm in diameter of blue spot ; +++, response of more than 15 mm and less than 20 mm in diameter of blue spot ; ++++, response of more than 20 mm in diameter of blue spot.

b) : 0.1 mg/ml of montirelin containing 0.5% Evans blue. c) : Sera, prepared from guinea pigs injected intraperitoneally with montirelin at 0.33 mg/kg, containing 0.5% Evans blue. d) : 10 mg/ml of BSA containing 0.5% Evans blue.

Table 2. Active cutaneous anaphylaxis (ACA) test in guinea pigs.

Sensitization		Sensitized animal No.	Reaction score ^{a)}											
Antigen	Dose (mg/kg)		Antigen A ^{b)}			Antigen C ^{c)}			Antigen F ^{d)}			Antigen G ^{e)}		
			3hr	24hr	48hr	3hr	24hr	48hr	3hr	24hr	48hr	3hr	24hr	48hr
Montirelin	0.001	1	—	—	—	—	—	—						
		2	—	—	—	—	—	—						
		3	—	—	—	—	—	—						
		4	—	—	—	—	—	—						
Montirelin	0.01	5	—	—	—	—	—	—						
		6	—	—	—	—	—	—						
		7	—	—	—	—	—	—						
		8	—	—	—	—	—	—						
Montirelin	0.1	9	—	—	—	—	—	—						
		10	—	—	—	—	—	—						
		11	—	—	—	—	—	—						
		12	—	—	—	—	—	—						
BSA	10	13							+	+++	+	+	+++	+
		14							+	+++	+	+	+++	+
		15							+	+	+	+	+++	++
		16							+	+++	+	+	+++	+
Saline	—	17	—	—	—	—	—	—						
		18	—	—	—	—	—	—						
		19	—	—	—	—	—	—						
		20	—	—	—	—	—	—						

BSA : Bovine serum albumin.

^{a)} : The severity of ACA reaction was graded on the scale of — to +++ : (3 hr) —, no symptoms ; +, redness and/or swelling ; ++, hyperemia ; +++, hemorrhage ; +++, necrosis ; (24, 48 hr) —, no symptoms ; +, redness ; ++, induration ; +++, double redness and/or vesicle ; +++, necrosis.

^{b)} : 0.1 mg/ml of montirelin. ^{c)} : Sera from guinea pigs injected intraperitoneally with 0.33 mg/kg of montirelin. ^{d)} : 1 mg/ml of BSA. ^{e)} : 10 mg/ml of BSA.

Table 3. Active systemic anaphylaxis (ASA) test in guinea pigs.

Sensitization		Sensitized animal No.	Behavior ^{a)}	Reaction score ^{b)}
Antigen	Dose (mg/kg)			
Montirelin	0.001	1	1	—
		2	1	—
		3	1	—
		4	1	—
Montirelin	0.01	5	1	—
		6	1	—
		7	1	—
		8	1	—
Montirelin	0.1	9	1	—
		10	1	—
		11	1	—
		12	1	—
BSA	10	13	2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12	+++
		14	3, 4, 6, 7, 10	++
		15	2, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12	+++
		16	2, 4, 7, 8, 10, 11, 12	+++
Saline	—	17	1	—
		18	1	—
		19	1	—
		20	1	—

BSA : Bovine serum albumin.

^{a)} : Behaviors of ASA reactions are as follows : 1, normal ; 2, ruffling fur ; 3, licking and rubbing nose ; 4, restlessness ; 5, chill ; 6, sneezing ; 7, anhelation ; 8, urination and defecation ; 9, labored breathing ; 10, ataxia ; 11, convulsion ; 12, death.

^{b)} : The severity of ASA reaction was graded on the scale of — to +++ : —, no abnormal behavior (1) ; +, at least 2 items out of behaviors 2~7 ; ++, at least 1 item out of behaviors 8~10 ; +++, convulsion (11) ; ++++, died (12).

ACA 反応は、誘発 3 時間、24 時間および 48 時間後においていずれも陰性であった。

3. Montirelin を感作したモルモットにおける ASA 反応は陰性であった。

以上の結果から、本試験条件下では、montirelin は抗原性を示さないと結論した。

(試験期間：1986 年 1 月 23 日～1986 年 4 月 30 日)

文 献

- Flohé, L., Bauer, K., Friderichs, E., Gunzler, W. A., Hennes, H. H., Herrling, S., Lagler, F., Otting, F. and Schwertner, E. (1983): Biological effects of degradation-stabilized TRH analogues. *In* Thyrotropin-Releasing Hormone. (Griffiths, E. C. and Bennett, G. W., eds.), pp. 327-340, Raven Press, New York.
- McIntosh, T. K., Vink, R. and Faden, A. I. (1988): An analogue of thyrotropin-releasing hormone improves outcome after brain injury: ^{31}P -NMR studies. *Am. J. Physiol.*, **254**, R785-R792.
- Ogasawara, T., Ukai, Y., Tamura, M., Taniguchi, N., Kimura, K. and Sato, A. (1993): Effects of NS-3, an analogue of thyrotropin-releasing hormone, on the central nervous system. *Biomed. Res.*, **14**, 317-328.
- 佐野靖之 (1973): 皮内反応. 臨床検査, **17**, 1582-1588.
- 鈴田達男 (1969 a): アレルギー実験法(3). 蛋白質・核酸・酵素, **14**, 823-828.
- 鈴田達男 (1969 b): アレルギー実験法(2). 蛋白質・核酸・酵素, **14**, 666-669.
- 鈴田達男 (1969 c): アレルギー実験法(1). 蛋白質・核酸・酵素, **14**, 580-588.