

コンビネーション製品の品質確保
— テーマA: エンドトキシンに関する最新動向 —

エンドトキシン試験における留意点



国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
medical
Devices

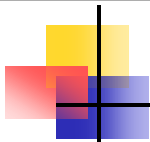
薮島 由二
haishima@nihs.go.jp

プレフィルドシリンジセミナー2019

筆頭発表者のCOI開示

筆頭発表者氏名：薮島由二

演題発表に関連し、
開示すべきCOI関係にある企業等はありません。



講演内容

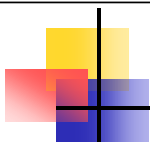
- ① イントロダクション
- ② エンドトキシン試験の概要
 - 原理, 組換え試薬の反応性, 測定手順等
- ③ エンドトキシン試験の一般的な留意点
- ④ Low Endotoxin Recovery (LER)の概要

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

齋島 由二
haishima@nihs.go.jp



発熱性物質の種類及び発熱機序

発熱性物質

① エンドトキシン

⇒ 最も強力な発熱性物質

非エンドトキシン
性発熱性物質

② エンドトキシンを除く各種の微生物由来成分

③ 化学物質に相当する材料由来の発熱性物質
(Material-mediated Pyrogens)

発熱機序

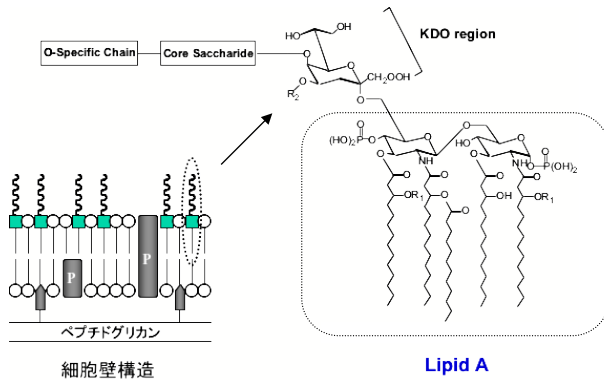
- (1) サイトカインネットワークを介して発熱を惹起する物質 → 発熱性物質①, ②
- (2) 体温調節に関与する中枢神経系に直接作用する物質
- (3) 酸化的リン酸化の脱共役剤 → 発熱性物質③
- (4) その他、作用機序の不明な物質

検出可能な発熱性物質

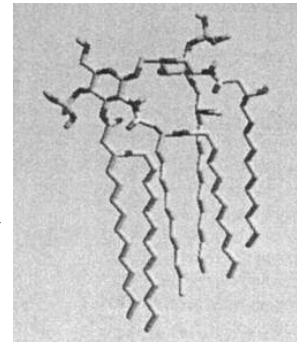
- (1) 【日局】発熱性物質試験法 発熱性物質①, ②, ③
- (2) 【日局】エンドトキシン試験法 発熱性物質①
- (3) Human Cell-based Pyrogen Test 発熱性物質①, ②

エンドトキシン (Lipopolysaccharide, LPS) とは？

局在部位と化学構造



三次元構造



E.coli lipid A

生物活性

生体レベル

発熱性, 致死毒性, ショック, トレランス, 局所・全身シュワルツマン活性, 低血糖, 血清鉄減少反応, アジュバント活性, トロンボプラスチン産生, 抗腫瘍活性, 放射線障害防御能 アジュバント活性, 網内系殺菌力亢進, 骨髄反応

細胞レベル

マクロファージ活性化能
 ・サイトカイン産生
 ・ケモカイン産生
 ・貧食作用亢進
 マイトジェン活性
 細胞毒性

分子レベル

リムルス活性
 補体活性化能

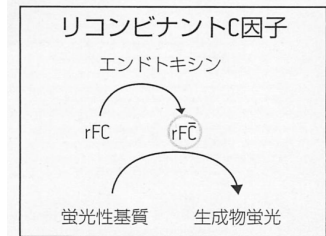
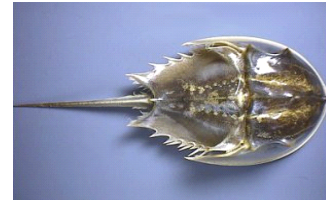
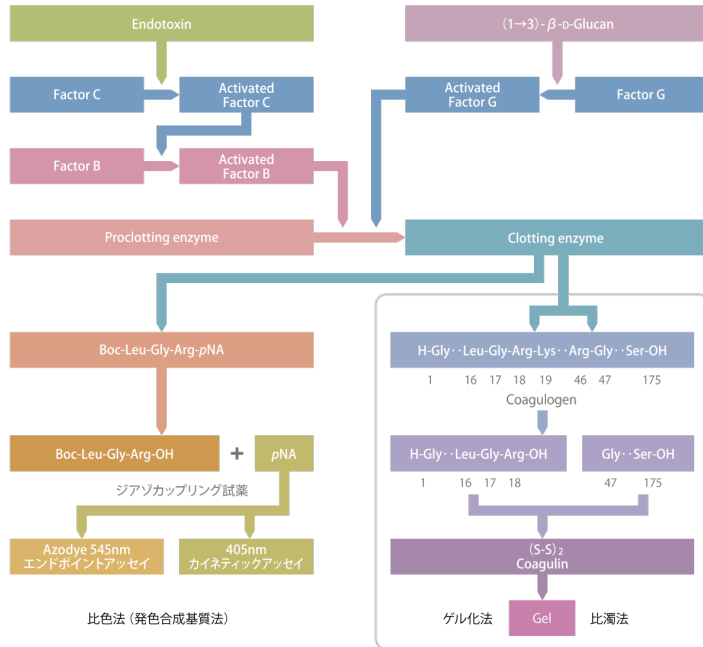
生物学的製剤のエンドトキシン試験

- 試験法: 日本薬局方一般試験法エンドトキシン試験法を準用する。
- エンドトキシン標準品: 日本薬局方標準エンドトキシン又はそれと同等の参照エンドトキシンを用いる。
- 測定: **エンドトキシン特異試薬**
- 反応干渉因子試験: 個々の特性を考慮して評価
- 判定: **平行線定量法**による統計的手法を用いて標準品に対する相対値として求める。
- 医薬品各条に規定するエンドトキシン規格値を超えてはならない。
- 人血清アルブミン、加熱ヒト血漿タンパク、インターフェロン製剤、並びに各種ワクチンの品質管理、国家検定等で実施する。
- SLP審査制度の導入により肺炎球菌ワクチン等、一部のワクチンにおけるエンドトキシン試験が削除された(2015年)。

エンドトキシン試験の原理

■反応機構の概略図

カプトガニ血球抽出液より調製されたライゼート試薬 (LAL 試薬) を用いてエンドトキシンを検出または定量できます。これはエンドトキシンがライゼート中に含まれる因子を活性化し、それに続くカスケード反応が活性化されることに基づいています。



「Pyro Gene™ rFC」システムは従来のLALエンドトキシン法に利用される同じバスキューの最初の部分のみを利用します。rFCはカプトガニのr因子のクローンであるため、LALと同様のエンドトキシン活性を保持しています。しかし、クローニングとその後の製造過程はLALの製造過程よりもはるかにコントロールしやすいので、ロット間差がより少ない製品となります。

- カイネティック比色 / 反応速度法が最も高精度 (RSD 2%)
- 和光純薬製カイネティック比濁 / 反応時間法が最も高感度 (0.0005 EU/ml)
- PyroGene以外の組換え試薬が利用可能 (EndoZyme, PyroSmart)

出典: 生化学工業HP, ロンザジャパンHP

組換え試薬の性能検証 ①

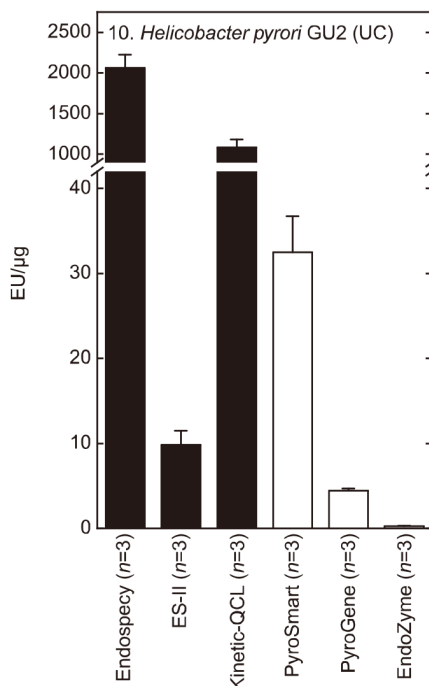
平成27,28年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」
— エンドトキシン試験法に用いる組換え試薬の評価に関する研究 —

国立医薬品食品衛生研究所, 医薬品医療機器RS財団, 日本食品分析センター, M Labs, ビオメリュー・ジャパン, 生化学工業, ロンザジャパン, 富士フィルム和光純薬

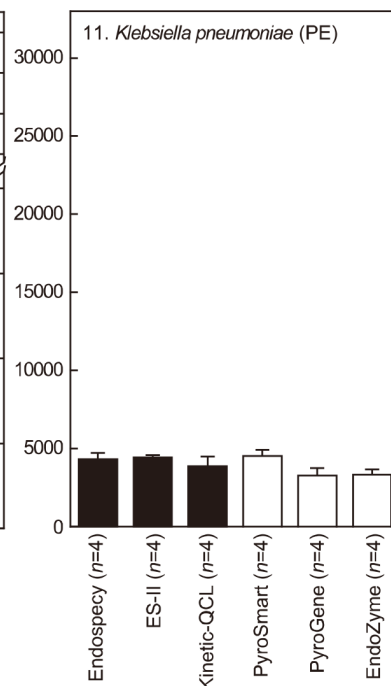
分類	No.	起 源	既存ライゼート試薬 CV				リコンビナント試薬 CV				全体 CV
			Endospey	ES-II	Kinetic-QCL	試薬間	PyroSmart	PyroGene	EndoZyme	試薬間	
LPS	1	Escherichia coli O55 (フェノール抽出)	6%	7%	15%	41%	1%	3%	7%	25%	30%
	2	Escherichia coli O111 (フェノール抽出)	5%	4%	5%	21%	6%	2%	10%	21%	19%
	3	Escherichia coli O55 (超遠心)	13%	39%	34%	79%	9%	22%	21%	39%	54%
	4	Escherichia coli O111 (超遠心)	14%	0%	27%	75%	1%	11%	12%	15%	44%
	5	Escherichia coli O113 (超遠心)	13%	8%	25%	92%	13%	22%	12%	16%	53%
	6	Escherichia coli O150 (超遠心)	4%	3%	17%	80%	1%	1%	5%	69%	102%
	7	Porphyromonas gingivalis ATCC 33277	1%	7%	7%	42%	1%	2%	5%	20%	56%
	8	Salmonella minnesota 1114	1%	12%	13%	76%	1%	24%	8%	42%	82%
	9	Salmonella minnesota R595	116%	61%	127%	66%	105%	127%	132%	18%	41%
	10	Pseudomonas aeruginosa PA01	7%	15%	25%	122%	10%	13%	2%	13%	67%
	11	Helicobacter pylori GU2	25%	34%	14%	1970%	26%	5%	11%	1081%	3197%
	12	Proteus vulgaris OX2	2%	2%	18%	8%	8%	10%	14%	6%	9%
	13	Campylobacter jejuni Penner O:19	3%	10%	4%	19%	0%	1%	70%	26%	24%
	14	Escherichia coli O128:B12	29%	12%	35%	14%	28%	19%	13%	33%	30%
	15	Escherichia coli J5	21%	8%	24%	151%	32%	9%	5%	52%	106%
	16	Salmonella enterica serotype typhimurium	3%	11%	8%	8%	7%	20%	11%	9%	14%
	17	Pseudomonas aeruginosa 10	3%	4%	20%	138%	8%	1%	3%	75%	118%
	18	Klebsiella pneumoniae	26%	2%	39%	3%	31%	25%	27%	15%	12%
	19	Burkholderia cepacia	2%	59%	5%	28%	36%	55%	26%	119%	76%
NOE	20	Serratia marcescens 約600 EU/mL	3%	2%	20%	12%	11%	5%	11%	114%	80%
	21	Ralstonia pickettii 約300 EU/mL	4%	5%	19%	30%	14%	6%	12%	121%	72%
	22	Enterobacter cloacae 約1400 EU/mL	1%	1%	20%	22%	2%	5%	14%	118%	74%
	23	Escherichia coli (3% nutrient broth) 約700 EU/mL	10%	6%	23%	8%	6%	8%	1%	46%	28%
	24	Pseudomonas aeruginosa 約8000 EU/mL	17%	3%	16%	32%	6%	8%	5%	17%	23%
	25	池(奈良県大和高田市)100~500 EU/mL	8%	7%	4%	23%	7%	2%	6%	46%	60%
	26	川(甘田川, 奈良県大和高田市)100~500 EU/mL	4%	6%	7%	14%	0%	2%	7%	40%	31%
	27	川(長瀬川, 大阪府東大阪市)100~500 EU/mL	8%	6%	22%	22%	9%	6%	0%	57%	70%
	28	家庭排水用浄化槽(奈良県大和高田市)100~500 EU/mL	19%	5%	9%	22%	2%	9%	4%	34%	36%
	29	市販ミネラルウォーター 奥大山の天然水 0.2~0.3 EU/mL	29%	28%	32%	11%	23%	15%	25%	84%	96%
	30	水道水 (PMRJ生物実験室3より採水) 10~20 EU/mL	50%	77%	68%	30%	48%	43%	52%	191%	142%

組換え試薬の性能検証 ②

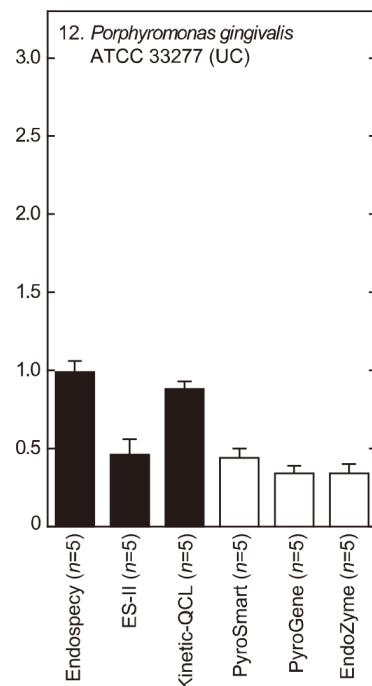
反応性が異なる例



反応性が同等な例



反応性が低い例

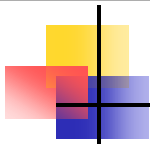


組換え試薬の性能検証 (まとめ)

- 組換え試薬は、既存のライセート試薬と同等の反応性を示す
- 組換え試薬の検量線は、異なるラボ間で同等の相関係数を示す
- 組換え試薬は、ロット間誤差が少ないため、品質管理上の利点を有する
- 医薬品を使用した再現性・頑健性試験を実施した上で、組換え試薬を利用する

参考文献

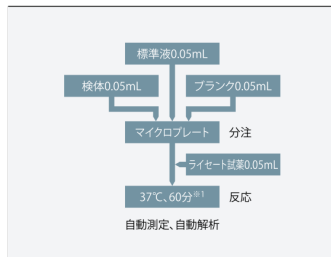
1. Kikuchi, Y. *et al.*, Collaborative Study on the Bacterial Endotoxins Test Using Recombinant Factor C-based Procedure for Detection of Lipopolysaccharides. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science* **48** (4), 252-260 (2017).
2. Kikuchi, Y. *et al.*, Collaborative Study on the Bacterial Endotoxins Test Using Recombinant Factor C-based Procedure for Detection of Lipopolysaccharides, Part 2. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science* **49** (10), 706-718 (2018).



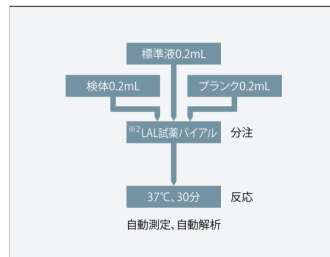
エンドキシン試験の手順例

■Pyrochrome®およびエンドスベシー®シリーズの操作法例

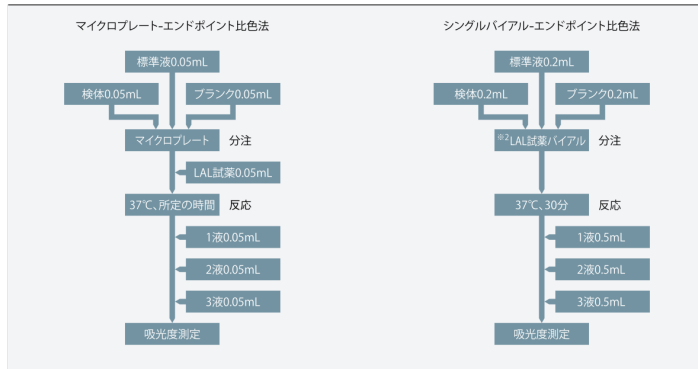
●ウェルリーダーMP-96を用いたマイクロプレート-カインティック比色法



●EGリーダーSV-12を用いたシングルバイアル-カインティック比色法

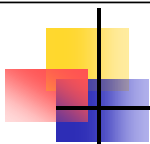


●エンドポイント比色法



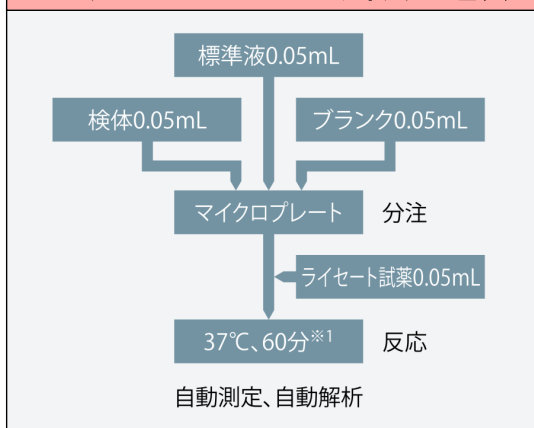
*1 Pyrochromeを用いた定量範囲0.005~50EU/mLの場合
*2 ①緩衝液0.2mLにて混和溶解液(試験管-カインティック法、試験管-エンドポイント法に共通)

出典: 生化学工業HP

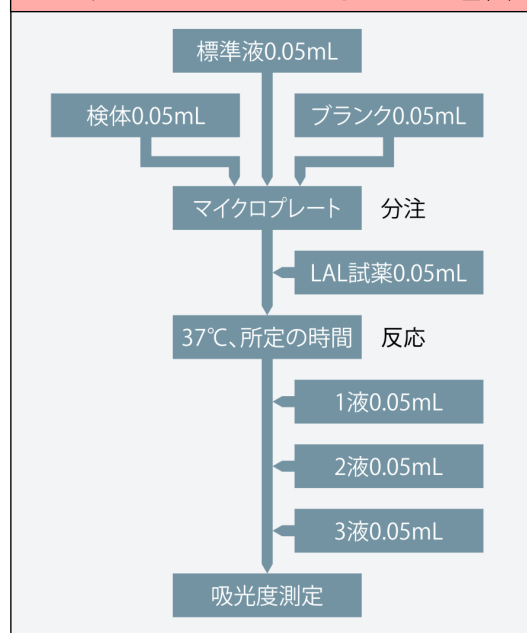


エンドキシン試験の手順例

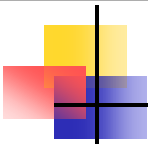
マイクロプレート/カインティック比色法



マイクロプレート/エンドポイント比色法



出典: 生化学工業HP



エンドキシン試験：光学的定量法の概要

出典：生化学工業HP

日本薬局方におけるエンドキシン試験法：光学的定量法

概要

日本薬局方におけるエンドキシン試験法を実施するに際して、比色法または比濁法の精度と有効性を保証するため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

予備試験

■検量線の信頼性確認試験

ライゼー試験は各ロットにつき、使用する前に、また試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときに行います。

操作法

用いるライゼー試験に規定されているエンドキシンの濃度範囲で、少なくとも3種の濃度のエンドキシン標準溶液を調製し、これら各濃度につき3回以上測定して検量線を作成します。

判定

作成した検量線について、直線回帰分析を行い、相関係数を求め、その絶対値 |r| が 0.999 以上であることを確認します。

■反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試料溶液について反応を促進または阻害する因子の有無を調べる試験です。本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行います。

操作法

表1に従い、A、B、CおよびD液を調製して、試験を行います。

表1

液	エンドキシン濃度	添加液	試験管またはウェルの数
A*	0	試料溶液	2以上
B**	検量線の中点濃度††	試料溶液	2以上
C**	3濃度以上	エンドキシン試験用液	各濃度、2以上
D**	0	エンドキシン試験用液	2以上

* 試料溶液のみ(試料溶液のエンドキシン濃度範囲)、最大有効希釈数を10倍で増やすことができる。
 ** AとB両液で検定された試料溶液で、検量線の中点またはその近傍のエンドキシン濃度になるように標準エンドキシンの濃度を決定する。
 †† 検量線の信頼性確認で用いる各濃度のエンドキシン標準溶液(標準液作成時)
 ††† 相対誤差、エンドキシン濃度の相対誤差

【最大有効希釈数について】

最大有効希釈数は(試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数)を次によって求める。

$$\text{最大有効希釈数} = \frac{\text{エンドキシン規格値}}{x} \times \text{試料溶液の濃度}$$

エンドキシン規格値：
除水量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドキシンの量 (Eg/kg) であり、Mは体重増加当たり1時間以内に関連する注射剤の最大量です。
試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、

エンドキシン規格値が
質量当たり (Eg/mg) で規定されている場合はmg/mL
当量当たり (Eq/mEq) で規定されている場合はEq/mL
生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL
質量当たり (Eg/mL) で規定されている場合はmg/mLです。

すなわち、エンドキシン規格値に試料溶液の濃度を乗じることにより、試料溶液1mL当たりのエンドキシン規格値 (Eg/mL) が算出され、これを検量線の最小エンドキシン濃度 (A、EU/mL) で除することにより最大有効希釈数が求められます。

回収率の算出方法

B液で測定されたエンドキシン濃度とA液で測定されたエンドキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドキシン濃度に対するエンドキシンの回収率を計算します。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{B液エンドキシン濃度} - \text{A液エンドキシン濃度}}{\text{B液の添加エンドキシン濃度}} \times 100$$

判定

回収率が90~200%の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定します。

▶▶ 試験適合要件

- C液で作成した検量線の相関係数 |r| ≥ 0.999
- D液：設定されている空試験の相対誤差を越えないか、または検出限界未満である

■定量

操作法

表1に従いA、B、CおよびD液を調製し、予備試験：反応干渉因子試験に準じて操作します。

エンドキシン濃度の算出方法

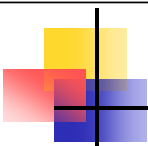
C液で作成した検量線を用い、A液の平均エンドキシン濃度を算出します。

▶▶ 試験適合要件

- C液で作成した検量線の相関係数 |r| ≥ 0.999
- B液で測定されたエンドキシン濃度とA液で測定されたエンドキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドキシン濃度に対するエンドキシンの回収率は90~200%の範囲にある
- D液：設定されている空試験の相対誤差を越えないか、または検出限界未満である

判定

A液の平均エンドキシン濃度に基づき、被験試料のエンドキシンの濃度 (EU/mL、EU/mg、EU/mEqまたはEU/単位) を求め、その値が医薬品各条に規定されたエンドキシン規格を満たすとき、被験試料はエンドキシン試験に適合とします。



エンドキシン試験：光学的定量法の概要

出典：生化学工業HP

日本薬局方におけるエンドキシン試験法：光学的定量法

概要

日本薬局方におけるエンドキシン試験法を実施するに際して、比色法または比濁法の精度と有効性を保証するため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

概要

日本薬局方におけるエンドキシン試験法を実施するに際して、比色法又は比濁法の精度と有効性を保証するため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

■反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試料溶液について反応を促進または阻害する因子の有無を調べる試験です。本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行います。

操作法

表1に従い、A、B、CおよびD液を調製して、試験を行います。

表1

液	エンドキシン濃度	添加液	試験管またはウェルの数
A*	0	試料溶液	2以上
B**	検量線の中点濃度††	試料溶液	2以上
C**	3濃度以上	エンドキシン試験用液	各濃度、2以上
D**	0	エンドキシン試験用液	2以上

* 試料溶液のみ(試料溶液のエンドキシン濃度範囲)、最大有効希釈数を10倍で増やすことができる。
 ** AとB両液で検定された試料溶液で、検量線の中点またはその近傍のエンドキシン濃度になるように標準エンドキシンの濃度を決定する。
 †† 検量線の信頼性確認で用いる各濃度のエンドキシン標準溶液(標準液作成時)
 ††† 相対誤差、エンドキシン濃度の相対誤差

【最大有効希釈数について】

最大有効希釈数は(試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数)を次によって求める。

$$\text{最大有効希釈数} = \frac{\text{エンドキシン規格値}}{x} \times \text{試料溶液の濃度}$$

エンドキシン規格値：
除水量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドキシンの量 (Eg/kg) であり、Mは体重増加当たり1時間以内に関連する注射剤の最大量です。
試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、

エンドキシン規格値が
質量当たり (Eg/mg) で規定されている場合はmg/mL
当量当たり (Eq/mEq) で規定されている場合はEq/mL
生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL
質量当たり (Eg/mL) で規定されている場合はmg/mLです。

すなわち、エンドキシン規格値に試料溶液の濃度を乗じることにより、試料溶液1mL当たりのエンドキシン規格値 (Eg/mL) が算出され、これを検量線の最小エンドキシン濃度 (A、EU/mL) で除することにより最大有効希釈数が求められます。

回収率の算出方法

B液で測定されたエンドキシン濃度とA液で測定されたエンドキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドキシン濃度に対するエンドキシンの回収率を計算します。

判定

回収率が90~200%の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定します。

▶▶ 試験適合要件

- C液で作成した検量線の相関係数 |r| ≥ 0.999
- D液：設定されている空試験の相対誤差を越えないか、または検出限界未満である

■定量

操作法

表1に従いA、B、CおよびD液を調製し、予備試験：反応干渉因子試験に準じて操作します。

エンドキシン濃度の算出方法

C液で作成した検量線を用い、A液の平均エンドキシン濃度を算出します。

▶▶ 試験適合要件

- C液で作成した検量線の相関係数 |r| ≥ 0.999
- B液で測定されたエンドキシン濃度とA液で測定されたエンドキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドキシン濃度に対するエンドキシンの回収率は90~200%の範囲にある
- D液：設定されている空試験の相対誤差を越えないか、または検出限界未満である

判定

A液の平均エンドキシン濃度に基づき、被験試料のエンドキシンの濃度 (EU/mL、EU/mg、EU/mEqまたはEU/単位) を求め、その値が医薬品各条に規定されたエンドキシン規格を満たすとき、被験試料はエンドキシン試験に適合とします。

エンドキシン試験：光学的定量法の概要

出典：生化学工業HP

日本薬局方におけるエンドキシン試験法：光学的定量法

概要

日本薬局方におけるエンドキシン試験法を実施するに際して、比色法または比濁法の精度と有効性を保証するため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

予備試験

■ 検量線の信頼性確認試験

ライセート試薬は各ロットにつき、使用するときにを行います。

操作法

用いるライセート試薬に規定されているエンドキシン濃度の範囲で、検量線の中間点濃度以上、これら各濃度につき3回以上測定し

判定

作成した検量線について、直線回帰分析を行

■ 反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試料溶液について反応本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予

操作法

表1に従い、A、B、CおよびD液を調製して、

表1

液	エンドキシン濃度	被添加液
A*1	0	試料液
B*2	検量線の中間点濃度*2	試料液
C*3	3濃度以上	エンドキシン試験用水
D*4	0	エンドキシン試験用水

*1 試料溶液のみ(試料溶液のエンドキシン濃度範囲)、最大有効希釈率で希釈された試料溶液で、検量線の中間点濃度以上(EL/mEq)で規定されている場合は単位mL、生物学的単位当量(EL/単位)で規定されている場合は単位mL、希釈率(EL/mL)で規定されている場合は単位mLです。

すなわち、エンドキシン検量線に試料溶液の濃度を乗じることにより、試料溶液1mL当たりのエンドキシン総量(EL/mL)が算出され、これを検量線の最小エンドキシン濃度(A、EL/mL)で除することにより最大有効希釈率が求められます。

【最大有効希釈率について】
最大有効希釈率(試料溶液中に存在する反応希釈率)を次式によって求めます。

最大有効希釈率 = エンドキシン総量 / エンドキシン検量線

エンドキシン総量：
検量線に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドキシン濃度(EL/kg)であり、Mは検量線1mL当たりの検量線濃度(EL/mL)です。

試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、
エンドキシン検量線の
検量線(EL/mEq)で規定されている場合はmg/mL、
当量当たり(EL/mEq)で規定されている場合はmg/mL、
生物学的単位当量(EL/単位)で規定されている場合は単位/mL、
希釈率(EL/mL)で規定されている場合は単位/mLです。

すなわち、エンドキシン検量線に試料溶液の濃度を乗じることにより、試料溶液1mL当たりのエンドキシン総量(EL/mL)が算出され、これを検量線の最小エンドキシン濃度(A、EL/mL)で除することにより最大有効希釈率が求められます。

回収率の算出方法

B液で測定されたエンドキシン濃度とA液で測定されたエンドキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドキシン濃度に対するエンドキシンの回収率を計算します。

予備試験

検量線の信頼性確認試験

ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前に、また試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときに行います。

測定法

用いるライセート試薬に規定されているエンドキシンの濃度範囲で、少なくとも**3種の濃度**のエンドキシン標準溶液を調製し、これらの各濃度につき**3回以上**測定して検量線を作成します。

判定

作成した検量線について、直線回帰分析を行い、相関係数 r を求め、その絶対値 $|r|$ が**0.980以上**であることを確認します。

エンドキシン試験：光学的定量法の概要

出典：生化学工業HP

日本薬局方におけるエンドキシン試験法：光学的定量法

概要

日本薬局方におけるエンドキシン試験法を実施するに際して、比色法または比濁法の精度と有効性を保証するため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

予備試験

■ 検量線の信頼性確認試験

ライセート試薬は各ロットにつき、使用するときにを行います。

操作法

用いるライセート試薬に規定されているエンドキシン濃度の範囲で、検量線の中間点濃度以上、これら各濃度につき3回以上測定し

判定

作成した検量線について、直線回帰分析を行

■ 反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試料溶液について反応本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予

操作法

表1に従い、A、B、CおよびD液を調製して、

表1

液	エンドキシン濃度	被添加液
A*1	0	試料液
B*2	検量線の中間点濃度*2	試料液
C*3	3濃度以上	エンドキシン試験用水
D*4	0	エンドキシン試験用水

*1 試料溶液のみ(試料溶液のエンドキシン濃度範囲)、最大有効希釈率で希釈された試料溶液で、検量線の中間点濃度以上(EL/mEq)で規定されている場合は単位mL、生物学的単位当量(EL/単位)で規定されている場合は単位mL、希釈率(EL/mL)で規定されている場合は単位mLです。

すなわち、エンドキシン検量線に試料溶液の濃度を乗じることにより、試料溶液1mL当たりのエンドキシン総量(EL/mL)が算出され、これを検量線の最小エンドキシン濃度(A、EL/mL)で除することにより最大有効希釈率が求められます。

【最大有効希釈率について】
最大有効希釈率(試料溶液中に存在する反応希釈率)を次式によって求めます。

最大有効希釈率 = エンドキシン総量 / エンドキシン検量線

エンドキシン総量：
検量線に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドキシン濃度(EL/kg)であり、Mは検量線1mL当たりの検量線濃度(EL/mL)です。

試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、
エンドキシン検量線の
検量線(EL/mEq)で規定されている場合はmg/mL、
当量当たり(EL/mEq)で規定されている場合はmg/mL、
生物学的単位当量(EL/単位)で規定されている場合は単位/mL、
希釈率(EL/mL)で規定されている場合は単位/mLです。

すなわち、エンドキシン検量線に試料溶液の濃度を乗じることにより、試料溶液1mL当たりのエンドキシン総量(EL/mL)が算出され、これを検量線の最小エンドキシン濃度(A、EL/mL)で除することにより最大有効希釈率が求められます。

回収率の算出方法

B液で測定されたエンドキシン濃度とA液で測定されたエンドキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドキシン濃度に対するエンドキシンの回収率を計算します。

反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試料溶液について反応を促進又は阻害する因子の有無を調べる試験です。本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行います。

測定法

表1に従い、A、B、CおよびD液を調製して、試験を行います。

液	エンドキシン濃度	被添加液	試験管またはウェルの数
A*1	0	試料溶液	2以上
B*2	検量線の中間点濃度*2	試料溶液	2以上
C*3	3濃度以上	エンドキシン試験用水	各濃度、2以上
D*4	0	エンドキシン試験用水	2以上

エンドキシン試験：光学的定量法の概要

出典：生化学工業HP

日本薬局方におけるエンドキシン試験法：光学的定量法

概要

日本薬局方におけるエンドキシン試験法を実施するに際して、比色法または比濁法の精度と有効性を保証するため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

予備試験

■ 検量線の信頼性確認試験

ライセート試薬は各ロットにつき、使用前に、また試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときに行います。

操作法

用いるライセート試薬は、これら

判定

作成した検量

■ 反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試

操作法

表1に従い、

表1

濃度

A¹⁾

B²⁾

C³⁾

D⁴⁾

※1 試料溶液の濃度

※2 A液とB液の濃度

※3 検量線の傾斜

※4 検量線の傾斜

回収率の算出方法

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{B液エンドキシン濃度} - \text{A液エンドキシン濃度}}{\text{B液の添加エンドキシン濃度}} \times 100$$

判定

回収率が50～200%の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定します。

【最大有効係数】

最大有効係数は、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を無視し、許容される試料溶液の最大の検量線傾斜を次の式によって求めます。

$$\text{最大有効係数} = \frac{\text{エンドキシン規格値} \times \text{試料溶液の濃度}}{\text{検量線の傾斜}}$$

エンドキシン規格値：検量線に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドキシンの量 (EU/kg) であり、Mは検量線増量当たり検量線に相当する注射剤の最大量です。

試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、

エンドキシン規格値が mg/mL である場合は mg/mL、

検量線傾斜 (EU/mL) で規定されている場合は mg/mL、

生物学的単位 (EU/mEq) で規定されている場合は mEq/mL、

検量線傾斜 (EU/mL) で規定されている場合は mL/mL です。

すなわち、エンドキシン規格値に試料溶液の濃度を乗じることにより、試料溶液1mL当たりのエンドキシン規格値 (EU/mL) が算出され、これを検量線の最小エンドキシン濃度 (A, EU/mL) で除することにより最大有効係数が求められます。

回収率の算出方法

B液で測定されたエンドキシン濃度とA液で測定されたエンドキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドキシン濃度に対するエンドキシンの回収率を計算します。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{B液エンドキシン濃度} - \text{A液エンドキシン濃度}}{\text{B液の添加エンドキシン濃度}} \times 100$$

判定

回収率が50～200%の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定します。

試験適合要件

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

判定

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

●検量線作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980

●D液：設定されている空試験の検量線を超えないか、または検出限界未満である

▶▶ 試験適合要件

■ 定量

操作法

表1に示すA, B, CおよびD液を調製し、予備試験：反応干渉因子試験に準じて操作します。

エンドキシン濃度の算出方法

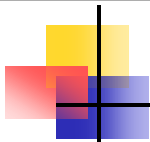
C液で作成した検量線を用い、A液の平均エンドキシン濃度を算出します。

試験適合要件

- C液で作成した検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980
- B液で測定されたエンドキシン濃度とA液で測定されたエンドキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドキシン濃度に対するエンドキシンの回収率は50～200%の範囲にある
- D液：設定されている空試験の限度値を超えないか、または検出限界未満である

判定

A液の平均エンドキシン濃度に基づき、被験試料のエンドキシンの濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEqまたはEU/単位) を求め、その値が医薬品各条に規定されたエンドキシン規格を満たすとき、被験試料はエンドキシン試験に適合とします。



エンドトキシン試験の留意点 ①

出典：生化学工業HP

■ 器具について

試験に用いるガラス製および耐熱性の器具は、少なくとも250℃で30分間の乾熱滅菌処理を行ってください。また、マイクロプレートおよびマイクロピペット用チップなどのプラスチック製品を使用する場合は、エンドトキシンが検出されないこと、およびエンドトキシン試験に対する干渉作用がないことを確認されたものを使用してください。

■ エンドトキシン試験用水(LRW)について

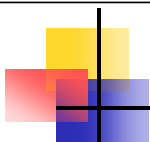
医薬品各条の「注射用水」もしくは「注射用水(容器入り)」またはその他の水で、エンドトキシン試験に用いるライセート試薬の検出限界以上の濃度のエンドトキシンを含まず、エンドトキシン試験を行うのに適したものを使用してください。

■ エンドトキシン標準原液の調製について

エンドトキシン標準原液は日本薬局方エンドトキシン標準品をエンドトキシン試験用水で溶解して調製します。

【調製方法】

1. 日本薬局方標準品エンドトキシン標準品バイアル中の試薬および口を汚染させないように、金属キャップ及びゴム栓をピンセットで取り外す。
2. 10,000EU/mLになるよう、添付文書に記載された用量のエンドトキシン試験用水を加える。
3. ゴム栓で蓋をし、蓋の周りにパラフィルムを巻き、密封し、試験管ミキサーで5分間攪拌する。
4. 調製したエンドトキシン標準原液は、使用まで冷蔵(2~8℃以下)で保存する。溶解後は14日以内に使用する。直ちに使用しない時は、ゴム栓の上からパラフィルムで固定密封する。



エンドトキシン試験の留意点 ②

■ 最大有効希釈倍数について

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数のことをいいます。

1. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されている場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{\text{エンドトキシン規格値} \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、
 エンドトキシン規格値が
 質量当たり (EU/mg) で規定されている場合はmg/mL
 当量当たり (EU/mEq) で規定されている場合はmEq/mL
 生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL
 容量当たり (EU/mL) で規定されている場合はmL/mL となります。

λ ：ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)
 比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)

2. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されていない場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{K / M \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

エンドトキシン規格値：
 注射剤のエンドトキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。
 ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり、投与経路による区分に基づき、以下のように設定されます。

投与経路	K (EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内：放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2
その他の投与経路	5.0

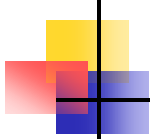
また、Mは体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量です。ただし、注射剤が頻回または持続的に投与される場合、Mは1時間以内に投与される注射剤の最大総量です。

注1) 質量または単位に基づいて投与する製剤では、主薬の表示量を基準としてエンドトキシン規格値を設定する。

注2) 成人の体重1kgあたりの最大投与量を算出するとき、成人の平均体重として60kgを用いる。

注3) 体重1kgあたり的小児投与量がその成人投与量よりも多いときは、小児投与量に基づいてエンドトキシン規格値を設定する。

λ ：ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)
 比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)



エンドトキシン試験の留意点 ②

■ 最大有効希釈倍数について

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数のことをいいます。

■ 最大有効希釈倍数について

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数のことをいいます。

当量当たり (EU/mEq) で規定されている場合はmEq/mL
生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL
容量当たり (EU/mL) で規定されている場合はmL/mL となります。

λ : ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)
比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)

2. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されていない場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{K / M \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

エンドトキシン規格値:

注射剤のエンドトキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。

ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり、投与経路による区分に基づき、以下のように設定されます。

投与経路	K (EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内：放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2
その他の投与経路	5.0

また、Mは体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量です。ただし、注射剤が頻回または持続的に投与される場合、Mは1時間以内に投与される注射剤の最大総量です。

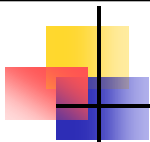
注1) 質量または単位に基づいて投与する製剤では、主薬の表示量を基準としてエンドトキシン規格値を設定する。

注2) 成人の体重1kgあたりの最大投与量を算出するとき、成人の平均体重として60kgを用いる。

注3) 体重1kgあたり的小児投与量がその成人投与量よりも多いときは、小児投与量に基づいてエンドトキシン規格値を設定する。

λ : ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)
比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)

出典：生化学工業HP



エンドトキシン試験の留意点 ②

■ 最大有効希釈倍数について

最大有効希釈倍数

1. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されている場合

1. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されている場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{\text{エンドトキシン規格値} \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、

エンドトキシン規格値が

質量当たり (EU/mg) で規定されている場合はmg/mL

当量当たり (EU/mEq) で規定されている場合はmEq/mL

生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL

容量当たり (EU/mL) で規定されている場合はmL/mL となります。

λ

2. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されていない場合

2. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されていない場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{K / M \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

エンドトキシン規格値:

注射剤のエンドトキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。

ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドキシンの量 (EU/kg) であり、投与経路による区分に基づき、以下のように設定されます。

投与経路	K (EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内：放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2
その他の投与経路	5.0

また、Mは体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量です。ただし、注射剤が頻回または持続的に投与される場合、Mは1時間以内に投与される注射剤の最大総量です。

注1) 質量または単位に基づいて投与する製剤では、主薬の表示量を基準としてエンドトキシン規格値を設定する。

注2) 成人の体重1kgあたりの最大投与量を算出するとき、成人の平均体重として60kgを用いる。

注3) 体重1kgあたり的小児投与量がその成人投与量よりも多いときは、小児投与量に基づいてエンドトキシン規格値を設定する。

λ : ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)
比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)

出典：生化学工業HP

エンドキシン試験の留意点 ②

■ 最大有効希釈倍数について

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数のことをいいます。

1. 医薬品各条に規定されている場合	投与経路	K (EU/kg)
最大有効希釈倍数 試料溶液の濃度： エンドキシン 質量当たり (EU/kg) 当量当たり (EU/kg) 生物学的単位当 容量当たり (EU/ml)	静脈内	5.0
	静脈内：放射性医薬品	2.5
	脊髄腔内	0.5
	その他の投与経路	5.0

2. 医薬品各条にエンドキシン規格値が規定されていない場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{K / M \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

エンドキシン規格値：

注射剤のエンドキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。

ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドキシンの量 (EU/kg) であり、投与経路による区分に基づき、以下のように設定されます。

投与経路	K (EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内：放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2
その他の投与経路	5.0

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{K / M \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

※
場合
注1)
注2)
注3)
λ：ゲル
比濁法または比色法

K：発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドキシンの量 (EU/kg)

M：体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量 (成人体重60kg)

λ：ゲル化法=ライセート試薬の表示感度 (EU/ml)

比濁法・比色法=検量線の最小エンドキシン濃度 (EU/mL)

比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドキシン濃度 (EU/mL)

出典：生化学工業HP

エンドキシン試験の留意点 ③

LAL試薬の反応性に影響を及ぼす因子

- 温度, pH, 塩濃度
- 界面活性剤, プロテアーゼ (特にトリプシン), プロテアーゼ阻害剤
- 高濃度のタンパク質, 多糖類, EDTA 4Na

エンドキシン活性に影響を及ぼす因子

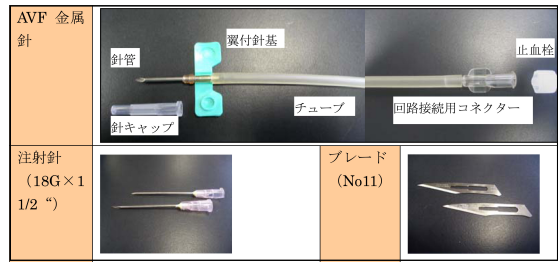
- リピドAの化学構造と heterogenicity (アシル基・リン酸基等の置換率)
- 溶解度
 - ・エンドキシンの多糖体側鎖 (O-specific chain) の長さ
 - ・塩型：トリエチルアミン塩 > Na塩, 遊離型 > Mg, Ca塩
 - ・ミセル形成状況
 - ・凝集, 吸着 (測定前に再分散)
- タンパク質等との結合
 - ・抗菌ペプチド (CAP18等) やポリミキシンB等はエンドキシンと結合して活性を中和する
- 保管温度・期間 (自己酸性による分解)

エンドキシン試験の留意点 ④

定量試験として

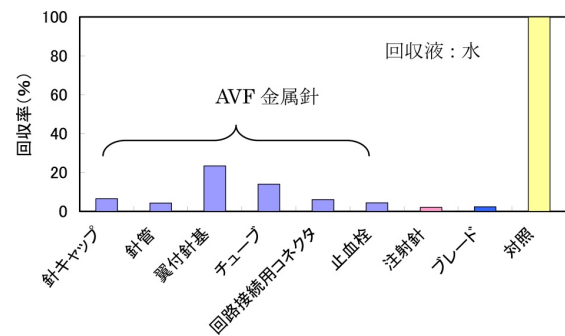
- (1) 検量線の範囲内で定量する
 - (2) プレートリーダーの校正
- ・ウェル間の誤差を平均値ではなく、SD又はRSDで評価 (n=6)

医療機器への添加回収試験



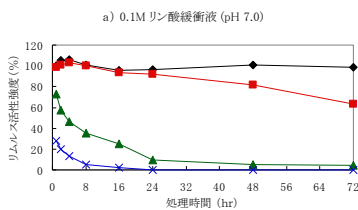
医療機器に適用可能な代替溶媒

- (1) プラスチック: PEG/Tween 60/EDTA (0.004%/0.01%/0.5mM)、ヒト血清アルブミン溶液
- (2) 金属: EDTA 溶液
- (3) ハイドロキシアパタイト: 塩酸 < EDTA 溶液
- (4) コラーゲン: 塩酸 < 精製コラゲナーゼ/塩酸
- (5) キチン・キトサン: 塩酸

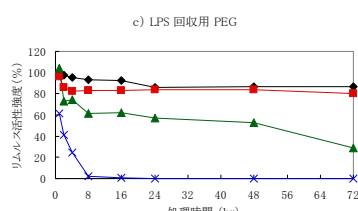
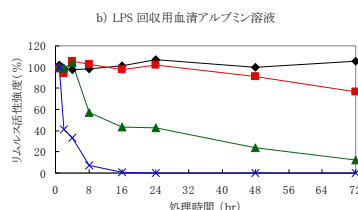
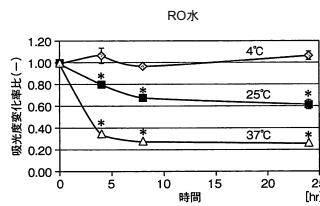


エンドキシン試験の留意点 ⑤

JPSE 10 EU/mL



JPSE 0.025 EU/mL

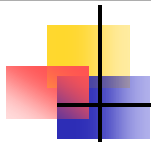


エンドキシンの熱安定性

- (1) 高濃度の場合、40°C以上で活性が低下する
- (2) 低濃度の場合、室温でも24時間までに活性が半減する可能性有り

対応策

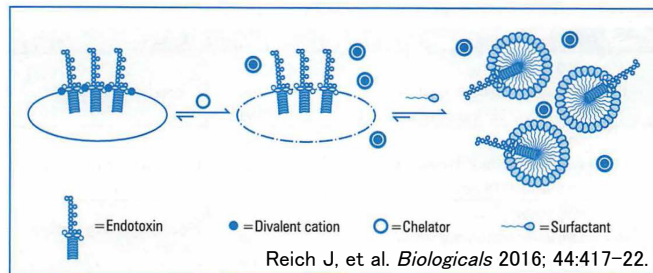
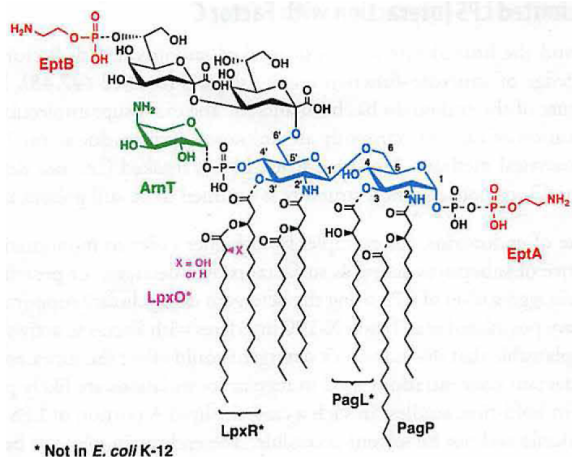
- (1) 試験液は用時調製が基本
- (2) 保存する際は冷蔵保存
- (3) 保存した場合、測定前に再分散



エンドキシン試験の留意点 ⑥

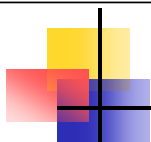
Chen, J., Low Endotoxin Recovery in Common Biologics Products.
Presented at PDA 8th Annual Global Conference on Pharmaceutical Microbiology,
Bethesda, MD, (2013).

- ある種の生物学的製剤に界面活性剤(ポリソルベート)とクエン酸Naやリン酸Na等の共存下でエンドキシンを添加すると、エンドキシンが回収されない(LER現象)
- LER現象が認められた検体のうちの一つは、ウサギ発熱性が検出された



- Hold-time studyにおいて、見かけの検出量が低下する
- 温度、pH、塩濃度、LAL試薬、エンドキシン純度・構造等により、異なる挙動を示す

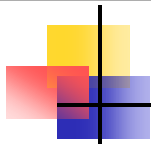
出典：PDA Technical Report No.82



PDA Technical Report No.82 / LER Case Study

RSE: Reference Standard Endotoxin, CSE: Control Standard Endotoxin, NOE: Naturally Occurring Endotoxin

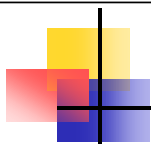
No.	概要	No.	概要
1	<p>Low Concentration PS20 Caused LER Reaction in the Presence of Monoclonal Antibody Product</p> <ul style="list-style-type: none"> 低濃度のPS20 (0.006%)とmAbは単独ではLERを起こさない 両者を併用すると、mAb濃度依存性にLER現象が起こる CSEではLERが起こるが、NOEでは起こらない 	2	<p>Mapping LER Effect in In-Process Stages of Purification</p> <ul style="list-style-type: none"> 医薬品製造の各段階においてLERが認められた時のリスク評価実施方法 ガイドライン等に沿ってLAL試験を実施する 必要な試験のみを実施する NOEを使用する
3	<p>Use of Purified and Nonpurified Endotoxins in Hold-time Studies</p> <ul style="list-style-type: none"> 精製エンドキシン及びNOEともにLERが起り得る エンドキシンの純度よりも、培養条件の影響を受ける(Mg²⁺濃度、温度) RSEの使用を推奨 	4	<p>Factors Affecting Low Endotoxin Recovery</p> <ul style="list-style-type: none"> クエン酸/PS20によるLERは、温度、pH、塩濃度の影響を受ける 低温、低pH、高塩濃度条件によりLERが低減 2mM MgSO₄によるサンプル希釈を推奨
5	<p>Comparison of Different Methods Used for Calculation of Percentile Endotoxin Recovery from LPS-Spiked Biological Therapeutic Products</p> <ul style="list-style-type: none"> Hold-time studyの陰性対照としては、LRWからのLPS回収率が優れている 	6	<p>Lipopolysaccharide Masking and Resolution of Low Endotoxin/ Lipopolysaccharide Recovery (LER/LLR) in a Citrate Buffer Monoclonal Antibody containing Polysorbate and Chelating Agent</p> <ul style="list-style-type: none"> 20mM クエン酸、150mM 塩化ナトリウム、20μM DPTA、0.025% PS80を含む mAb製剤 (25mg/mL, pH 6.0)にCSEをスパイクするとLERが起こる NOEでは、LERが起らない CSEのLER現象は、試験開始10分前に50mM MgSO₄含有100mM Tris又は12.5mM MgSO₄含有25mM Trisで、サンプルを10倍又は20倍希釈することにより改善する。
7	<p>Evaluation of an Endotoxin Demasking Protocol</p> <ul style="list-style-type: none"> LERの回避法として、Endo-RS Kitを使用したプロトコルを作成 試験温度は21°C以上を推奨 	8	<p>Strategy to investigate and overcome LER driven by protein</p> <ul style="list-style-type: none"> PS等を含まない場合でも、LERを起こすタンパク製剤がある LPSの添加時期を変動させたリバーススタディにより、測定毎の変動を回避 2-8°Cで試験を行うことにより、LERが解消される
9	<p>LER Case Study for a Monoclonal Antibody</p> <ul style="list-style-type: none"> EDTA、PS80含有mAb製剤は、RSEとCSEでLERが起こるが、NOEでは起こらない mAb単独ではLERが起らない RSEとCSEは、EDTA含有ヒスチジン/トレハロース緩衝液 (pH 5.5)でLERが起こる(原因物質: EDTA、ヒスチジン) PS80 (pH 5.5)はCSEの回収率を改善する(0.5%時のみ僅かに阻害) 分散剤、2価カチオン、酸、塩基等の前処理は全て無効 LAL試薬の種類により、LER強度が異なる 	10	<p>Endotoxin Recovery Studies with a Biologic Formulated with Citrate and Polysorbate 20</p> <ul style="list-style-type: none"> クエン酸、PS80を含有する製剤はCSEのLERを引き起こすが、クエン酸、PS80を含まない原薬レベルではLERが起らない 植物単離株由来NOEでは起らない CSEとNOEのLER挙動の違いはLPS構造の相違に由来すると考えられる LERを起こさない早い段階で評価すると良い(プロセスコントロール)
11	<p>No LER Effect in a Sodium Phosphate, Polysorbate 80 Formulation Matrix</p> <ul style="list-style-type: none"> 5 mg/mLのタンパク質 (pI 3.8-5.4) を含むリン酸ナトリウム/PS80/マンニトール緩衝液 (25mM/0.0325/13%, pH 6.2)にRSEを添加し、室温保存してもLERは起らない 	12	<p>Lack of LER Phenomenon in A Therapeutic Protein Biologic with Known LER-Causing Ingredients</p> <ul style="list-style-type: none"> ヒトグロブリン (pI 6.4-7.5)、20mM L-ヒスチジン、0.01% PS20を含むリン酸二水素ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)にCSEを添加してもLERは起らない



PDA Technical Report No.82 / LER Case Study

RSE: Reference Standard Endotoxin, CSE: Control Standard Endotoxin, NOE: Naturally Occurring Endotoxin

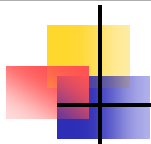
No.	概要	No.	概要
1	<p>Low Concentration PS20 Caused LER Reaction in the Presence of Monoclonal Antibody Product</p> <ul style="list-style-type: none"> 低濃度のPS20(0.006%)とmAbは単独ではLERを起こさない 両者を併用すると、mAb濃度依存的にLER現象が起こる CSEではLERが起こるが、NOEでは起こらない 	2	<p>Mapping LER Effect in In-Process Stages of Purification</p> <ul style="list-style-type: none"> 医薬品製造の各段階においてLERが認められた時のリスク評価実施方法 ガイドライン等に沿ってLAL試験を実施する 必要な試験のみを実施する NOEを使用する
3	<p>Use of Purified and Nonpurified Endotoxins in Hold-time Studies</p> <ul style="list-style-type: none"> 精製エンドトキシン及びNOEともにLERが起こり得る エンドキシンの純度よりも、培養条件の影響を受ける(Mg²⁺濃度、温度) RSEの使用を推奨 	4	<p>Factors Affecting Low Endotoxin Recovery</p> <ul style="list-style-type: none"> クエン酸/PS20によるLERは、温度、pH、塩濃度の影響を受ける 低温、低pH、高塩濃度条件によりLERが低減 2mM MgSO₄によるサンプル希釈を推奨
5	<p>Comparison of Different Methods Used for Calculation of Percentile Endotoxin Recovery from LPS-Spiked Biological Therapeutic Products</p> <ul style="list-style-type: none"> Hold-time studyの陰性対照としては、LRWからのLPS回収量が優れている 	6	<p>Lipopolysaccharide Masking and Resolution of Low Endotoxin/ Lipopoly-saccharide Recovery (LER/LLR) in a Citrate Buffer Monoclonal Antibody containing Polysorbate and Chelating Agent</p> <ul style="list-style-type: none"> 20mM クエン酸、150mM 塩化ナトリウム、20μM DPTA、0.025% PS80を含む mAb製剤(25mg/mL, pH 6.0)にCSEをスパイクするとLERが起こる NOEでは、LERが起こらない CSEのLER現象は、試験開始10分前に50mM MgSO₄含有100mM Tris又は12.5mM MgSO₄含有25mM Trisで、サンプルを10倍又は20倍希釈することにより改善する。
7	<p>Evaluation of an Endotoxin Demasking Protocol</p> <ul style="list-style-type: none"> LERの回避法として、Endo-RS Kitを使用したプロトコルを作成 試験温度は21°C以上を推奨 	8	<p>Strategy to investigate and overcome LER driven by protein</p> <ul style="list-style-type: none"> PS等を含まない場合でも、LERを起こすタンパク製剤がある LPSの添加時期を変動させたリバーススタディにより、測定毎の変動を回避 2-8°Cで試験を行うことにより、LERが解消される
9	<p>LER Case Study for a Monoclonal Antibody</p> <ul style="list-style-type: none"> EDTA、PS80含有mAb製剤は、RSEとCSEでLERが起こるが、NOEでは起こらない mAb単独ではLERが起こらない RSEとCSEは、EDTA含有ヒスチジン/トレハロース緩衝液(pH 5.5)でLERが起こる(原因物質: EDTA、ヒスチジン) PS80(pH 5.5)はCSEの回収率を改善する(0.5%時のみ僅かに阻害) 分散剤、2価カチオン、酸、塩基等の前処理は全て無効 LAL試薬の種類により、LER強度が異なる 	10	<p>Endotoxin Recovery Studies with a Biologic Formulated with Citrate and Polysorbate 20</p> <ul style="list-style-type: none"> クエン酸、PS80を含有する製剤はCSEのLERを引き起こすが、クエン酸、PS80を含まない原薬レベルではLERが起こらない 植物単離株由来NOEでは起こらない CSEとNOEのLER挙動の違いはLPS構造の相違に由来すると考えられる LERを起こさない早い段階で評価すると良い(プロセスコントロール)
11	<p>No LER Effect in a Sodium Phosphate, Polysorbate 80 Formulation Matrix</p> <ul style="list-style-type: none"> 5 mg/mLのタンパク質(pI 3.8-5.4)を含むリン酸ナトリウム/PS80/マンニトール緩衝液(25mM/0.0325/13%, pH 6.2)にRSEを添加し、室温保存してもLERは起こらない 	12	<p>Lack of LER Phenomenon in A Therapeutic Protein Biologic with Known LER-Causing Ingredients</p> <ul style="list-style-type: none"> ヒトグリコプロテイン(pI 6.4-7.5)、20mM L-ヒスチジン、0.01% PS20を含むリン酸二水素ナトリウム緩衝液(pH 6.0)にCSEを添加してもLERは起こらない



PDA Technical Report No.82 / LER Case Study

RSE: Reference Standard Endotoxin, CSE: Control Standard Endotoxin, NOE: Naturally Occurring Endotoxin

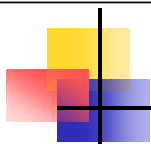
No.	概要	No.	概要
1	<p>Low Concentration PS20 Caused LER Reaction in the Presence of Monoclonal Antibody Product</p> <ul style="list-style-type: none"> 低濃度のPS20(0.006%)とmAbは単独ではLERを起こさない 両者を併用すると、mAb濃度依存的にLER現象が起こる CSEではLERが起こるが、NOEでは起こらない 	2	<p>Mapping LER Effect in In-Process Stages of Purification</p> <ul style="list-style-type: none"> 医薬品製造の各段階においてLERが認められた時のリスク評価実施方法 ガイドライン等に沿ってLAL試験を実施する 必要な試験のみを実施する NOEを使用する
3	<p>Use of Purified and Nonpurified Endotoxins in Hold-time Studies</p> <ul style="list-style-type: none"> 精製エンドトキシン及びNOEともにLERが起こり得る エンドキシンの純度よりも、培養条件の影響を受ける(Mg²⁺濃度、温度) RSEの使用を推奨 	4	<p>Factors Affecting Low Endotoxin Recovery</p> <ul style="list-style-type: none"> クエン酸/PS20によるLERは、温度、pH、塩濃度の影響を受ける 低温、低pH、高塩濃度条件によりLERが低減 2mM MgSO₄によるサンプル希釈を推奨
5	<p>Comparison of Different Methods Used for Calculation of Percentile Endotoxin Recovery from LPS-Spiked Biological Therapeutic Products</p> <ul style="list-style-type: none"> Hold-time studyの陰性対照としては、LRWからのLPS回収量が優れている 	6	<p>Lipopolysaccharide Masking and Resolution of Low Endotoxin/ Lipopoly-saccharide Recovery (LER/LLR) in a Citrate Buffer Monoclonal Antibody containing Polysorbate and Chelating Agent</p> <ul style="list-style-type: none"> 20mM クエン酸、150mM 塩化ナトリウム、20μM DPTA、0.025% PS80を含む mAb製剤(25mg/mL, pH 6.0)にCSEをスパイクするとLERが起こる NOEでは、LERが起こらない CSEのLER現象は、試験開始10分前に50mM MgSO₄含有100mM Tris又は12.5mM MgSO₄含有25mM Trisで、サンプルを10倍又は20倍希釈することにより改善する。
7	<p>Evaluation of an Endotoxin Demasking Protocol</p> <ul style="list-style-type: none"> LERの回避法として、Endo-RS Kitを使用したプロトコルを作成 試験温度は21°C以上を推奨 	8	<p>Strategy to investigate and overcome LER driven by protein</p> <ul style="list-style-type: none"> PS等を含まない場合でも、LERを起こすタンパク製剤がある LPSの添加時期を変動させたリバーススタディにより、測定毎の変動を回避 2-8°Cで試験を行うことにより、LERが解消される
9	<p>LER Case Study for a Monoclonal Antibody</p> <ul style="list-style-type: none"> EDTA、PS80含有mAb製剤は、RSEとCSEでLERが起こるが、NOEでは起こらない mAb単独ではLERが起こらない RSEとCSEは、EDTA含有ヒスチジン/トレハロース緩衝液(pH 5.5)でLERが起こる(原因物質: EDTA、ヒスチジン) PS80(pH 5.5)はCSEの回収率を改善する(0.5%時のみ僅かに阻害) 分散剤、2価カチオン、酸、塩基等の前処理は全て無効 LAL試薬の種類により、LER強度が異なる 	10	<p>Endotoxin Recovery Studies with a Biologic Formulated with Citrate and Polysorbate 20</p> <ul style="list-style-type: none"> クエン酸、PS80を含有する製剤はCSEのLERを引き起こすが、クエン酸、PS80を含まない原薬レベルではLERが起こらない 植物単離株由来NOEでは起こらない CSEとNOEのLER挙動の違いはLPS構造の相違に由来すると考えられる LERを起こさない早い段階で評価すると良い(プロセスコントロール)
11	<p>No LER Effect in a Sodium Phosphate, Polysorbate 80 Formulation Matrix</p> <ul style="list-style-type: none"> 5 mg/mLのタンパク質(pI 3.8-5.4)を含むリン酸ナトリウム/PS80/マンニトール緩衝液(25mM/0.0325/13%, pH 6.2)にRSEを添加し、室温保存してもLERは起こらない 	12	<p>Lack of LER Phenomenon in A Therapeutic Protein Biologic with Known LER-Causing Ingredients</p> <ul style="list-style-type: none"> ヒトグリコプロテイン(pI 6.4-7.5)、20mM L-ヒスチジン、0.01% PS20を含むリン酸二水素ナトリウム緩衝液(pH 6.0)にCSEを添加してもLERは起こらない



PDA Technical Report No.82 / LER Case Study

RSE: Reference Standard Endotoxin, CSE: Control Standard Endotoxin, NOE: Naturally Occurring Endotoxin

No.	概要	No.	概要
1	<p>Low Concentration PS20 Caused LER Reaction in the Presence of Monoclonal Antibody Product</p> <ul style="list-style-type: none"> 低濃度のPS20(0.006%)とmAbは単独ではLERを起こさない 両者を併用すると、mAb濃度依存的にLER現象が起こる CSEではLERが起こるが、NOEでは起こらない 	2	<p>Mapping LER Effect in In-Process Stages of Purification</p> <ul style="list-style-type: none"> 医薬品製造の各段階においてLERが認められた時のリスク評価実施方法 ガイドライン等に沿ってLAL試験を実施する 必要な試験のみを実施する NOEを使用する
3	<p>Use of Purified and Nonpurified Endotoxins in Hold-time Studies</p> <ul style="list-style-type: none"> 精製エンドトキシン及びNOEともにLERが起こり得る エンドキシンの純度よりも、培養条件の影響を受ける(Mg²⁺濃度、温度) RSEの使用を推奨 	4	<p>Factors Affecting Low Endotoxin Recovery</p> <ul style="list-style-type: none"> クエン酸/PS20によるLERは、温度、pH、塩濃度の影響を受ける 低温、低pH、高塩濃度条件によりLERが低減 2mM MgSO₄によるサンプル希釈を推奨
5	<p>Comparison of Different Methods Used for Calculation of Percentile Endotoxin Recovery from LPS-Spiked Biological Therapeutic Products</p> <ul style="list-style-type: none"> Hold-time studyの陰性対照としては、LRWからのLPS回収量が優れている 	6	<p>Lipopolysaccharide Masking and Resolution of Low Endotoxin/ Lipopoly-saccharide Recovery (LER/LLR) in a Citrate Buffer Monoclonal Antibody containing Polysorbate and Chelating Agent</p> <ul style="list-style-type: none"> 20mM クエン酸、150mM 塩化ナトリウム、20μM DPTA、0.025% PS80を含む mAb製剤(25mg/mL, pH 6.0)にCSEをスパイクするとLERが起こる NOEでは、LERが起こらない CSEのLER現象は、試験開始10分前に50mM MgSO₄含有100mM Tris又は12.5mM MgSO₄含有25mM Trisで、サンプルを10倍又は20倍希釈することにより改善する。
7	<p>Evaluation of an Endotoxin Demasking Protocol</p> <ul style="list-style-type: none"> LERの回避法として、Endo-RS Kitを使用したプロトコルを作成 試験温度は21℃以上を推奨 	8	<p>Strategy to investigate and overcome LER driven by protein</p> <ul style="list-style-type: none"> PS等を含まない場合でも、LERを起こすタンパク製剤がある LPSの添加時期を変動させたリバーススタディにより、測定毎の変動を回避 2-8℃で試験を行うことにより、LERが解消される
9	<p>LER Case Study for a Monoclonal Antibody</p> <ul style="list-style-type: none"> EDTA、PS80含有mAb製剤は、RSEとCSEでLERが起こるが、NOEでは起こらない mAb単独ではLERが起こらない RSEとCSEは、EDTA含有ヒスチジン/トレハロース緩衝液(pH 5.5)でLERが起こる(原因物質:EDTA、ヒスチジン) PS80(pH 5.5)はCSEの回収率を改善する(0.5%時のみ僅かに阻害) 分散剤、2価カチオン、酸、塩基等の前処理は全て無効 LAL試薬の種類により、LER強度が異なる 	10	<p>Endotoxin Recovery Studies with a Biologic Formulated with Citrate and Polysorbate 20</p> <ul style="list-style-type: none"> クエン酸、PS80を含有する製剤はCSEのLERを引き起こすが、クエン酸、PS80を含まない原薬レベルではLERが起こらない 植物単離株由来NOEでは起こらない CSEとNOEのLER挙動の違いはLPS構造の相違に由来すると考えられる LERを起こさない早い段階で評価すると良い(プロセスコントロール)
11	<p>No LER Effect in a Sodium Phosphate, Polysorbate 80 Formulation Matrix</p> <ul style="list-style-type: none"> 5 mg/mLのタンパク質(pI 3.8-5.4)を含むリン酸ナトリウム/PS80/マンニトール緩衝液(25mM/0.0325/13%, pH 6.2)にRSEを添加し、室温保存してもLERは起こらない 	12	<p>Lack of LER Phenomenon in A Therapeutic Protein Biologic with Known LER-Causing Ingredients</p> <ul style="list-style-type: none"> ヒトグリコプロテイン(pI 6.4-7.5)、20mM L-ヒスチジン、0.01% PS20を含むリン酸二水素ナトリウム緩衝液(pH 6.0)にCSEを添加してもLERは起こらない



PDA Technical Report No.82 / LER Case Study

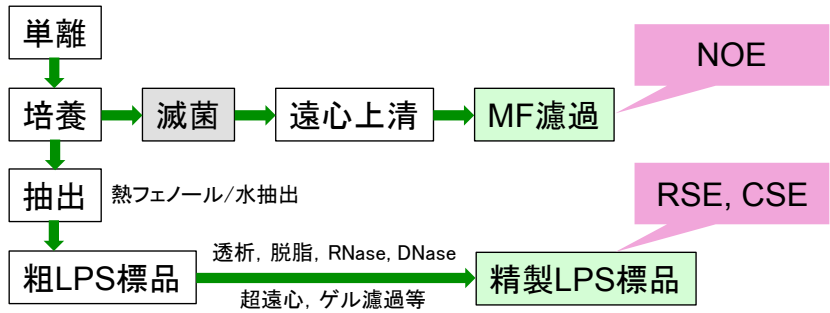
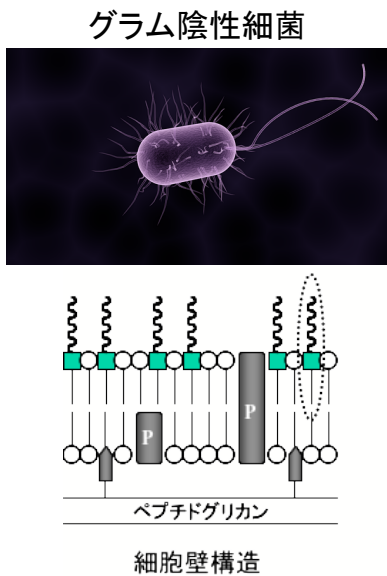
RSE: Reference Standard Endotoxin, CSE: Control Standard Endotoxin, NOE: Naturally Occurring Endotoxin

No.	概要	No.	概要
1	<p>Low Concentration PS20 Caused LER Reaction in the Presence of Monoclonal Antibody Product</p> <ul style="list-style-type: none"> 低濃度のPS20(0.006%)とmAbは単独ではLERを起こさない 両者を併用すると、mAb濃度依存的にLER現象が起こる CSEではLERが起こるが、NOEでは起こらない 	2	<p>Mapping LER Effect in In-Process Stages of Purification</p> <ul style="list-style-type: none"> 医薬品製造の各段階においてLERが認められた時のリスク評価実施方法 ガイドライン等に沿ってLAL試験を実施する 必要な試験のみを実施する NOEを使用する
3	<p>Use of Purified and Nonpurified Endotoxins in Hold-time Studies</p> <ul style="list-style-type: none"> 精製エンドトキシン及びNOEともにLERが起こり得る エンドキシンの純度よりも、培養条件の影響を受ける(Mg²⁺濃度、温度) RSEの使用を推奨 	4	<p>Factors Affecting Low Endotoxin Recovery</p> <ul style="list-style-type: none"> クエン酸/PS20によるLERは、温度、pH、塩濃度の影響を受ける 低温、低pH、高塩濃度条件によりLERが低減 2mM MgSO₄によるサンプル希釈を推奨
5	<p>Comparison of Different Methods Used for Calculation of Percentile Endotoxin Recovery from LPS-Spiked Biological Therapeutic Products</p> <ul style="list-style-type: none"> Hold-time studyの陰性対照としては、LRWからのLPS回収量が優れている 	6	<p>Lipopolysaccharide Masking and Resolution of Low Endotoxin/ Lipopoly-saccharide Recovery (LER/LLR) in a Citrate Buffer Monoclonal Antibody containing Polysorbate and Chelating Agent</p> <ul style="list-style-type: none"> 20mM クエン酸、150mM 塩化ナトリウム、20μM DPTA、0.025% PS80を含む mAb製剤(25mg/mL, pH 6.0)にCSEをスパイクするとLERが起こる NOEでは、LERが起こらない CSEのLER現象は、試験開始10分前に50mM MgSO₄含有100mM Tris又は12.5mM MgSO₄含有25mM Trisで、サンプルを10倍又は20倍希釈することにより改善する。
7	<p>Evaluation of an Endotoxin Demasking Protocol</p> <ul style="list-style-type: none"> LERの回避法として、Endo-RS Kitを使用したプロトコルを作成 試験温度は21℃以上を推奨 	8	<p>Strategy to investigate and overcome LER driven by protein</p> <ul style="list-style-type: none"> PS等を含まない場合でも、LERを起こすタンパク製剤がある LPSの添加時期を変動させたリバーススタディにより、測定毎の変動を回避 2-8℃で試験を行うことにより、LERが解消される
9	<p>LER Case Study for a Monoclonal Antibody</p> <ul style="list-style-type: none"> EDTA、PS80含有mAb製剤は、RSEとCSEでLERが起こるが、NOEでは起こらない mAb単独ではLERが起こらない RSEとCSEは、EDTA含有ヒスチジン/トレハロース緩衝液(pH 5.5)でLERが起こる(原因物質:EDTA、ヒスチジン) PS80(pH 5.5)はCSEの回収率を改善する(0.5%時のみ僅かに阻害) 分散剤、2価カチオン、酸、塩基等の前処理は全て無効 LAL試薬の種類により、LER強度が異なる 	10	<p>Endotoxin Recovery Studies with a Biologic Formulated with Citrate and Polysorbate 20</p> <ul style="list-style-type: none"> クエン酸、PS80を含有する製剤はCSEのLERを引き起こすが、クエン酸、PS80を含まない原薬レベルではLERが起こらない 植物単離株由来NOEでは起こらない CSEとNOEのLER挙動の違いはLPE構造の相違に由来すると考えられる LERを起こさない早い段階で評価すると良い(プロセスコントロール)
11	<p>No LER Effect in a Sodium Phosphate, Polysorbate 80 Formulation Matrix</p> <ul style="list-style-type: none"> 5 mg/mLのタンパク質(pI 3.8-5.4)を含むリン酸ナトリウム/PS80/マンニトール緩衝液(25mM/0.0325/13%, pH 6.2)にRSEを添加し、室温保存してもLERは起こらない 	12	<p>Lack of LER Phenomenon in A Therapeutic Protein Biologic with Known LER-Causing Ingredients</p> <ul style="list-style-type: none"> ヒトグリコプロテイン(pI 6.4-7.5)、20mM L-ヒスチジン、0.01% PS20を含むリン酸二水素ナトリウム緩衝液(pH 6.0)にCSEを添加してもLERは起こらない

【小括】LER現象

メカニズムや回避策が不明であり、現状では個別対応とならざるを得ない

- キレート剤 / ポリソルベートの影響
- エンドキシン純度の影響: RSE, CSE vs NOE
- 温度の影響: 低温でLERが低減される
- ポリソルベート、ヒスタジンの影響: ある vs ない
- エンドキシンの化学構造の影響
- タンパク質の影響: 単独 vs 要添加剤
- LAL試薬の種類による影響
- 分散剤、2価カチオン、pH、塩濃度の影響: 有効 vs 無効



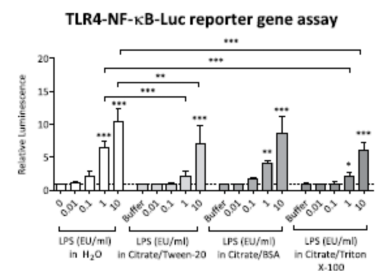
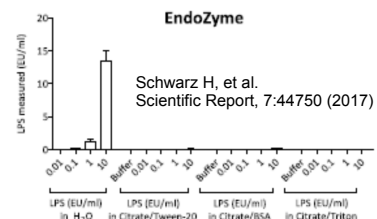
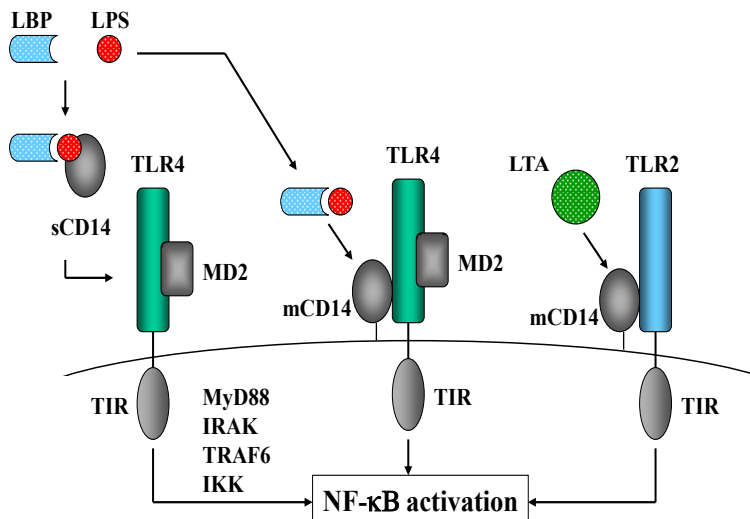
Work described in Case Study #3, "Use of Purified and Non-purified Endotoxins in Hold-time Studies", has shown that **masking susceptibility depends on the bacterial species and that culture conditions do affect the masking susceptibility of endotoxins**. Additionally, this work demonstrated that **isolation methods do not alter the primary structure of the lipid A profiles** (i.e., lipid A profiles from NOEs are similar to their highly purified counterparts); however, **the supramolecular structures of endotoxin may be influenced by the preparation method**. (PDA Technical Report No.82)

菌体成分の受容体と細胞内情報伝達機構

Toll-Like Receptor (TLR) family

- 菌体成分に対する免疫反応の主役
- ヒト10種類 (TLR1-10)
- マウス12種類 (TLR1-9, TLR11-13)

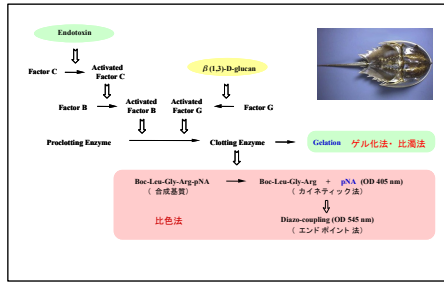
- TLR1/2, 2/6: LTA, LP, etc.
- TLR3: Viral double-stranded RNA
- TLR4: LPS
- TLR5: Bacterial flagellin
- TLR7,8: Small synthetic antiviral molecule, RNA
- TLR9: CpG DNA



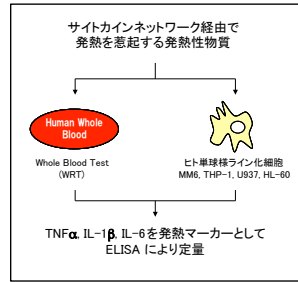
Induction of inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, TNFα

現在使用可能な発熱性物質試験

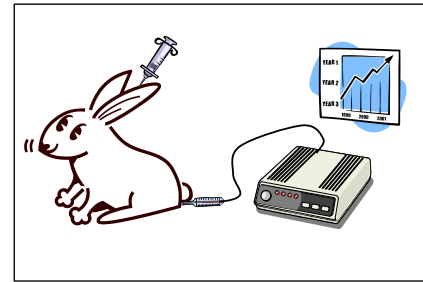
エンドトキシン試験



HCPT



ウサギ発熱試験



各試験法ともに測定原理が異なり、固有の特徴を持つ

エンドトキシン試験: 分子レベル

HCPT: 細胞レベル

ウサギ発熱試験: 生体レベル

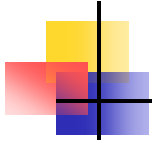
試験目的に合致した試験法
を選択することが重要

- 生体レベルの発熱性を評価したい？
- 微生物汚染の評価？
- 生理活性物質を含まない？
- 阻害物質は含まない？
- 抽出効率は大丈夫？
- 定量試験 or 限度試験？
- コストパフォーマンスは？



【総括】データ解釈上の留意点

- エンドトキシン管理の目的: エンドトキシンの薬剤中への混入を製造・貯蔵・流通段階で未然に防止する。
- 一部の薬剤は、発熱活性をはじめとしたエンドトキシンの生物活性の増強作用を有する。(インターフェロン, 血液製剤, アクチノマイシンド等)
- エンドトキシン規格値は健常人の実験データに基づく発熱最少量として設定されている。
- 規格値は投薬の対象となる患者に対する毒性を重視して設定されるべきものであり、個人差も含めた安全性を考慮する必要がある。
- 敗血症を含む重篤な疾患や免疫能の低下した患者ではエンドトキシンに対する感受性が亢進されている。
- エンドトキシン試験は高感度かつ高精度・簡便で迅速な測定を可能とする。ただし、非エンドトキシンの発熱性物質試験には無効である。
- 必要に応じて、HCPT (MAT) 等の代替法を使用する。
- エンドトキシン試験にあたっては、特定の生物学的製剤のみならず、LERの可能性を示唆する試料が存在する。
- その際は、エンドトキシン添加試料を用いた Time-hold study や回避策について検討する。必要に応じて、ウサギ発熱試験の実施も考慮する。



終わりに

ご静聴ありがとうございました

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
M^d medical
D^e devices

薮島 由二
haishima@nihs.go.jp