薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
119 (6) 451-455 (1999)

グロブリン製剤及びその他の血液製剤に対する エンドトキシン試験の適用

藤原 博,*^a 吉良清子,^a 朝川貞雄,^a 内藤誠之郎,^a 田中重則,^b 相沢真紀,^b
土谷正和,^c 高岡 文,^c 山本明彦,^a 落合雅樹,^a 堀内善信^a
国立感染症研究所,^a 生化学工業株式会社,^b 和光純薬工業株式会社^c

The Application of the Endotoxin Test for Globulin and Other Blood Products

Hiroshi FUJIWARA,*^a Kiyoko KIRA,^a Sadao ASAKAWA,^a Seishiro NAITO,^a
Shigenori TANAKA,^b Maki AIZAWA,^b Masakazu TUCHIYA,^c
Aya TAKAOKA,^c Akihiko YAMAMOTO,^a
Masaki OCHIAI,^a and Yoshinobu HORIUCHI^a

*The National Institute of Infectious Diseases,^a 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama,
Tokyo 208-0011, Japan, Seikagaku Corporation,^b 3-1253 Tateno,
Higashi Yamato, Tokyo 207-0021, Japan, and Wako Pure
Chemical Industries, Ltd.,^c 6-1 Takada-cho,
Amagasaki, Hyogo 661-0963, Japan*

(Received January 6, 1999)

The application of the endotoxin test for globulin and other blood products were investigated by two different limulus amebocyte lysate (LAL) test methods, colorimetric and kinetic turbidimetric methods, using two endotoxin-specific reagents. By the dilution of the blood products in 40 times or more, spiked endotoxin in the products was recovered accurately showing neither inhibition nor enhancement. The definite difference was not shown between the results obtained by the two LAL test methods. According to the method of the endotoxin test described under General Tests of The Japanese Pharmacopeia (thirteenth edition), JPXIII, the maximum valid dilution (MVD) for these products will be calculated to be 40 or more, so it is capable to measure the endotoxin limit for each product. This study indicates that the endotoxin test is applicable to measure the endotoxin content in globulin and other blood products as an alternative method for the rabbit pyrogen test.

Key words—endotoxin test; globulin; blood product

緒

言

医薬品の発熱物質混入の検査法として従来より発熱性物質試験法があり、我が国では日本薬局方,¹⁾ 生物学的製剤基準²⁾ 及び日本抗生物質医薬品基準³⁾ においてそれぞれの試験法を設定している。しかしこの方法は生物学的試験法であり、いくつかの面で問題があった。この試験をエンドトキシン試験法に切り換えることは既に各国で行われており、我が国でもここ数年多く

の医薬品に適用されてきている。日本薬局方は1996年の第13改正でエンドトキシン試験法の対象品目を大幅に増やし、一般試験法としてのエンドトキシン試験法も大きく改訂した。さらに日本抗生物質医薬品基準では第5改正(1998年)において日局に準拠したかたちでエンドトキシン試験を一般試験法として収載し、100以上の品目において発熱性物質試験をエンドトキシン試験に切り換えた。また生物学的製剤基準は1993年の改訂においてアルブミン製剤及びインターフェロン製剤についてエンドトキシン試験が採用され一般試験法として収載された。私達はこれまでアルブミン製剤やインターフェロン製剤におけるエンドトキシン試験の適用について発熱試験との関連性を含め検討を重ね、⁴⁻⁶⁾ その結果各基準にこの試験法が採用された。しかし、血液製剤のうちグロブリン製剤及び凝固因子製剤、抗凝固因子製剤等については現在も発熱試験が課せられており、アルブミン製剤と異なる扱いになっている。²⁾ そこで我々はこれらの血液製剤について、エンドトキシン試験法適用の可能性を探るため、方法、条件等を検討し知見を得たので報告する。

実 験 の 部

試験材料 国立予防衛生研究所(現国立感染症研究所)に提出された血液製剤のうち任意に選んだ合計100検体を使用した。使用した製剤はすべて発熱試験に合格したものである。

標準エンドトキシン 日本薬局方エンドトキシン標準品(*Escherichia coli* UKT-B株由来)を注射用蒸留水で溶解して使用した。

エンドトキシン試験 合成基質法及び比濁時間法によって行い、それぞれエンドトキシン特異的試薬(エンドスペシー⁷⁾:生化学工業, リムルス ES テストワコー⁸⁾:和光純薬)を用いた。検体内のエンドトキシン量は平行線定量法によって算出し、エンドトキシン単位(EU/ml)で表した。

回収率 エンドトキシン回収率は以下のように算出した。

回収率(%) = (添加製剤中のエンドトキシン量 - 無添加製剤中のエンドトキシン量) ÷ 添加エンドトキシン量 × 100

実験 検体に適量の標準エンドトキシンを添加してエンドトキシン試験による回収実験を行った。測定は3カ所の施設(国立予防衛生研究所, 生化学工業, 和光純薬工業)において行い、集積されたデータを統計学的分析によって検討した。

結 果 と 考 察

1. 各種グロブリン製剤におけるエンドトキシンの添加回収実験 グロブリン製剤にはその静脈内投与を可能にするなどのため種々の処理をした製剤があり、生物学的製剤基準に収載されているものが18品目、収載されていないものが1品目ある。処理法の詳細については明らかでない点もあるが、今回は処理法に関係なく統一された方法で測定することを前提として入手可能な16品目について同じ方法で回収実験を試みた。まず、4倍に希釈した各製剤に最終濃度0.25 EU/mlのエンドトキシンを添加し、これを更に4倍間隔の階段希釈を行って最終希釈16倍、64倍を作成し添加エンドトキシンの回収率を測定した。その結果、製剤によって多少の相違はあるが、いずれの製剤についてもほぼ満足できる回収率を示し、測定法による違いも認められなかった(Table 1)。

次にこの条件では回収率が低い傾向のある製剤の2倍、4倍、40倍、400倍希釈溶液に最終濃度0.1 EU/mlのエンドトキシンを添加して回収実験を行った。その成績の1部をFig. 1 及び

Table 1. Recovery of Spiked Endotoxin from Globulin Products

Code name of blood product ^{a)}	Recovery rate (%)	
	Kinetic turbidimetric method	Colorimetric method
ADD	64.3	92.4
AHB	114.3	71.9
AHBD	47.4	73.3
AHBP	88.6	78.6
AT	146.5	59.6
ATD	76.2	89.9
G	72.0	76.4
GIE	79.3	94.6
GPG	94.7	107.6
GPGD	72.7	65.3
GPH	61.1	62.6
GPHA	105.2	103.2
GPL	71.0	91.4
GPS	69.7	73.1
GSU	74.7	68.9
HIG	80.8	85.4

a) ADD: freeze-dried human anti-D (Rho) immunoglobulin, AHB: human anti-HBs immunoglobulin, AHBD: freeze-dried human anti-HBs immunoglobulin, AHBP: polyethylene glycol treated human anti-HBs immunoglobulin, AT: human anti-tetanus immunoglobulin, ATD: freeze-dried human anti-tetanus immunoglobulin, G: human immunoglobulin, GIE: freeze-dried ion-exchange-resin treated human normal immunoglobulin, GPG: polyethylene glycol treated human normal immunoglobulin, GPGD: freeze-dried polyethylene glycol treated human normal immunoglobulin, GPH: freeze-dried pH 4 treated human normal immunoglobulin, GPHA: pH 4 treated acid human normal immunoglobulin, GPL: freeze-dried plasmin treated human normal immunoglobulin, GPS: freeze-dried pepsin treated human normal immunoglobulin, GSU: freeze-dried sulfonated human normal immunoglobulin, HIG: freeze-dried histamin human normal immunoglobulin.

Fig. 2 に示す。Fig. 1 は抗 HBs ヒト免疫グロブリン及び乾燥抗 HBs ヒト免疫グロブリンの成績を、Fig. 2 は乾燥 pH 4 処理ヒト免疫グロブリン及び pH 4 処理酸性ヒト免疫グロブリンの成績を示す。その他の製剤についてもほぼ同様の成績が得られた。このようにおよそ 40 倍以上に希釈すればいずれの製剤も良好な回収率を示すことが確認された。したがって日本薬局方の試験法に準拠して試験を行うとき、医薬品各条で規定されるエンドトキシン規格値を検出できる試料液の最大許容希釈である最大有効希釈倍数 (maximum valid dilution, MVD) が 40 倍以上の場合はその濃度において規格値の測定が問題なく可能であることになる。例えば通常のグロブリン製剤の 1 時間投与量を 83 mg/kg とすると規格値は 5/83 で 0.06 EU/mg と設定される。この場合の最大有効希釈倍数は 100 となり、40 倍に希釈しても問題なく測定できることが確認された。

2. 凝固因子製剤、抗凝固因子製剤及びその他の血液製剤におけるエンドトキシンの回収実験 これらの製剤は合計 7 品目が生物学的製剤基準に収載されている。これらのうち 6 品目についてグロブリン製剤と同様の方法で回収実験を試みた。その結果、凝固因子製剤の 1 品目及び抗凝固因子製剤の 1 品目について幾つかの問題があり結論を出すに至らなかった。しかし Table 2 に示した 4 品目については 4 倍に希釈するのみで高い回収率が得られた。ただ凝固因子製剤はエンドトキシン試験の原理である凝固反応に係わる製剤であるのでこの点に関しては別の観点からの検討を計画している。

Fig. 1. Recovery of Spiked Endotoxin from Blood Products

AHB: human anti-HBs immunoglobulin

AHBD: freeze-dried human anti-HBs immunoglobulin

Fig. 2. Recovery of Spiked Endotoxin from Blood Products

GPH: freeze-dried pH 4 treated human normal immunoglobulin

GPHA: pH 4 treated acid human normal immunoglobulin

結 語

今回の実験成績から、調べたグロブリン製剤及び幾つかのその他の製剤は製剤の種類に関係なく少なくとも約40倍以上に希釈することによって製剤の抑制反応を除去できることが判明

Table 2. Recovery of Spiked Endotoxin from Blood Products

Code name of blood product ^{a)}	Recovery rate (%)	
	Kinetic turbidimetric method	Colorimetric method
C8	115.6	95.5
C9	115.9	102.8
FIB	77.8	99.8
HAP	101.8	108.5

a) C8: freeze-dried concentrated factor VIII, C9: freeze-dried concentrated factor IX, FIB: freeze-dried human fibrinogen, HAP: human haptoglobin

した。またこの実験によって凝固因子製剤の一部もグロブリン製剤と同様の処理で測定可能と判断された。したがってこれらの血液製剤についても発熱試験の代替えとしてエンドトキシン試験を適用することは可能であることが示唆された。エンドトキシン試験法は現在国際調和が進められており近いうちに国際的な試験法が確立されるので、⁹⁾ 今後ますます広い分野で採用されることが予想される。

引用文献

- 1) 厚生省, 第13改正日本薬局方, 1996.
- 2) 厚生省, 生物学的製剤基準, 1993.
- 3) 厚生省, 日本抗生物質医薬品基準, 1998.
- 4) 藤原 博, 石田説而, 島崎義男, 内藤誠之郎, 土谷正和, 松浦脩治, 薬誌, **110**, 332—340 (1990).
- 5) 内藤誠之郎, 藤原 博, 朝川貞雄, 本間玲子, 石田説而, 茅野文利, 田中重則, 大木 誠, 土谷正和, 松浦脩治, 薬誌, **112**, 551—556 (1992).
- 6) 朝川貞雄, 藤原 博, 内藤誠之郎, 本間玲子, 石田説而, 茅野文利, 土谷正和, 松浦脩治, 田中重則, 大木 誠, 薬誌, **114**, 888—893 (1994).
- 7) Obayashi T., Tamura H., Tanaka S., Ohki M., Takahashi S., Arai M., Masuda M., Kawai T., *Clin. Chim. Acta*, **149**, 55—65 (1985).
- 8) 土谷正和, 高岡 文, 時岡伸之, 松浦脩治, 日細誌, **45**, 903—911 (1990).
- 9) (財)日本公定書協会, 日本薬局方技術情報 1998, エンドトキシン試験法, 46—58 (1998).