

## だってエンドトキシンなんだもん



Charles River Laboratories  
InVitro Products & Services

土谷正和

### その3 エンドトキシン試験のバリデーション

エンドトキシン試験の目的は、規格値以上のエンドトキシンが製品に混入していないことを確かめることです。そのため、試験が正常に行われるよう測定条件を確認することで、エンドトキシン試験のバリデーションが行われます。測定条件の確認は、測定方法の性質をよく理解した上で決める必要があります、エンドトキシン試験法の場合も、多くの経験に基づいてバリデーションの方法が確立されてきています。エンドトキシン試験実施における問題点としては、操作中の汚染、リムルス試薬の活性化(汚染などによる)、リムルス試薬の失活(通常酵素と同様)、エンドトキシン溶液の活性変化(金属イオン、共存物質、温度、吸着など)が挙げられます。これらの問題点を考慮した上で、局方エンドトキシン試験法におけるバリデーションについて考えてみましょう。

エンドトキシン試験法のバリデーションとしては、下記の2点を確認することで行われていると考えられます。

- (1) ラベル感度の確認(ゲル化法、 $n=4$ で測定)、検量線の直線性の確認(光学的方法、 $n=3$ で測定)
- (2) 反応干渉因子試験( $n=2$ で測定)

ラベル感度の確認及び検量線の直線性確認は、製造者の設定した試薬の性能を再現することによって、試験を実施する施設、操作者、器具、測定装置の適性を

確認することです。試験を行おうとする施設で、測定手法が正しく実施されているかを総合的に確かめるために行われると考えられます。

反応干渉因子試験は、測定試料の影響による測定値の変化が規定された範囲内であることを示すことによって、試料の測定条件の適性を確認することです。

これらの試験は、日常試験に先立って行われ、試験実施者及び施設の適正と試験条件の設定が適切であることを確認するために行われます。

日常のエンドトキシン試験でも、バリデーションの結果を確認するための工夫がなされています。日常試験で測定される試料は、陰性対照(NC)、陽性対照(PC)または検量線、製品(P)、製品陽性対照(PPC)の4種類です。NCは、LALの汚染がないこと、使用する水の汚染がないことを確認するために測定されます。PCは、LALの失活がないこと、使用するエンドトキシンの活性が正しいことを確認するために測定されます。NCとPCは試薬や操作が適正であることを確かめることを主な目的としていると考えられます。また、Pは製品中のエンドトキシン量の測定、PPCは製品の測定への影響がないことを確認するために測定されます。

もし、操作中に汚染がなく、試薬及び標準品の性能が期待通りであり、試料は

測定に影響を与えないということが確実にあれば、試験はPの測定のみでよいはずですが、それでは、なぜ、局方のエンドトキシン試験では上記の4種類の試料を測定することになっているのでしょうか。その理由は、エンドトキシンの活性の変わりやすさ、リムルス試薬の感度の高さ、試験の試料からの影響の受けやすさなど、前述したエンドトキシン試験実施における問題点に求めることができると思います。試料は、リムルス試薬の活性化反応やエンドトキシンの活性に影響を与えることが多く、その影響因子は試料中に微量に混入した物質である場合もあります。このような物質は、製造過程でその濃度を制御することが難しいため、反応干渉因子試験で測定条件をバリデートしているにもかかわらず、日常試験でもPPC測定を行い、影響がないことを確認していると考えられます。また、リムルス試薬は、その感度の高さゆえ、またエンドトキシンの環境中での普遍性ゆえ、汚染による感度の変化が起こりやすく、汚染は、測定者が気付かないうちに起こることが多いと思われます。日常試験でNC及びPが測定されるのは、このような経験から考案された対応策なのでしょう。

局方のエンドトキシン試験では、これら4種類の試料を何らかの形で測定する必要があります。局方以外の分野では、このような測定が行われていないことが多いと思われます。前述したように、操

作中に汚染がなく、試薬及び標準品の性能が期待通りであり、試料は測定に影響を与えないということが確実にあれば、測定対象を測定するだけでよいのですが、実際のエンドトキシン試験でこれらを完全に求めることは非常に難しいと思われます。エンドトキシン測定の目的にもよりますが、もし測定値を対外的に示す必要のある可能性があるならば、測定はn=2以上で行い、PPCを測定すべきです。エンドトキシン試験の性質と性能から考えて、n=1のPのみの測定は非常に危険です。もし測定値に疑義が生じた場合、試薬や試料に異常がなかったことを示すことが難しいからです。n=1でPのみを測定した場合、測定値の正確性の保証は何もないと考えるべきでしょう。もちろん、内部の検討や参考値として系統的に測定が行われている場合は、問題はないと思われます。NC及びPCは、試薬及び試験者・試験施設の適正確認なので、熟練した測定者が測定するのであれば、省いても大きな問題はないかもしれません。しかし、PPCに関しては、その測定の適正を保証するために測定するべきだと思います。

今回は、エンドトキシン試験法のバリデーションの考え方と日常試験の試料の意義について考えてみました。次回は、エンドトキシン試験の手法について考えてみたいと思います。

