

シリーズ

だってエンドトキシンなんだもん



Charles River Laboratories
Endotoxin and Microbial Detection
土谷 正和

その4 エンドトキシン試験の手法

今回はエンドトキシン試験の手法のお話です。エンドトキシン試験はカプトガニ血球から調製した Limulus Amebocyte Lysate (LAL) を使用して測定します。LAL がエンドトキシンによって凝固することが米国で発見されて以来¹⁾、種々の方法が報告されてきました。これらの中で最終的に市販されている製品として残ったものは、ゲル化法、比濁法、比色法の 3 種類です。この分類方法は観察する対象によって分けられたもので、1987 年に発行された、FDA ガイドライン²⁾に端を発していると思われます。FDA ガイドラインでは、ゲル化法 (Gel-Clot Technique)、比色法およびエンドポイント比濁法 (Chromogenic Technique and Endpoint-Turbidimetric Technique)、カイネティック比濁法 (Kinetic-Turbidimetric Technique) に分類されています。当時市販されていた LAL 試薬は、ゲル化法用試薬、エンドポイント比色法用試薬、エンドポイント比濁法試薬、カイネティック比濁法用試薬でしたから、このような分類になったのでしょう。その後、エンドポイント比濁法用の試薬は発売中止になり、カイネティック比色法が開発されてきます。そして最近の局方では、ゲル化法 (Gel-Clot Technique) と光学的測定法 (Photometric Technique) という分類が採用されました³⁾。これは測定する指標を一般化した分類と考えられ、陽性か陰性の判定で測定を行うゲル化法に対し、検量線を作成して定量を行う比濁法・比色法を、光学的測定法として区別したと考えら

れます。局方では、ゲル化法の中に限度試験法と定量試験法、光学的測定法の中に比濁法と比色法の項目が設けられ、比濁法・比色法についてはそれぞれにエンドポイント法とカイネティック法があるとしています。この分類は、現在市販されている商品や将来開発されてくる商品にうまく対応できるように工夫されているのだと思います。

ゲル化法は、LAL と試料を混合し、一定の温度で一定の時間加温し、ゲルの生成の有無を判定する方法です。その測定条件は過去のいろいろな経緯を経て、現在では $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 60 ± 2 分間静置することに落ち着いています。反応試験管の径は測定結果に影響するのですが、現在の局方では、以前に規定されていた「内径 10mm」ははずされています。すなわち、規定上はどのような径の試験管を使用してもよいのですが、メーカーが定めたラベル表示感度を出すには、メーカーの指定したサイズの試験管を使用する必要があります。判定方法も、 45° に反応試験管を傾ける方法などは姿を消し、 180° 転倒法に落ち着いています。反応時から判定時にかけての振動は生成したゲルを壊す場合があり、結果に影響を及ぼします。特に判定時に試験管をどこかにぶつけたりすると、偽陰性が起こることがありますので、注意が必要です。判定は、1 度の転倒時にゲルが試験管の底に留まっていたら陽性、その他は陰性です。ゲルができかけていても転倒の途中で崩れてしまった場合は陰性と判断します。ゲル化法は、反応試験管

ごとに陽性か陰性を判断する方法です。ゲルができる最小エンドトキシン濃度がラベル表示感度ですから、それぞれの試験管でラベル表示感度のエンドトキシン濃度以上か以下かを判定することになります。従って、定量試験法では試料の希釈系列を作って、ゲル化が起こる最小の試料濃度を探することで定量を行います。

比濁法は、LAL のゲル化に伴う透過光量の変化を測定する方法です。現在行われている方法は全て濁度変化がある一定の値に達するまでの時間を測定する比濁時間法です。すなわち Kinetic-Turbidimetric Technique は実質上、比濁時間法と考えてよいということになります。海外では、カイネティック比濁法を KTA (Kinetic-Turbidimetric Assay) と呼ぶことも多いようです。日本では反応試験管を用いた方法が主流ですが、世界的にはマイクロプレートを用いた方法が主流です。

比色法は、LAL の活性化に伴い生成する酵素の活性を分解で発色を伴う合成基質を用いて測定する方法です。比濁法と異なり、種々の解析方法が開発され、市販されているので、それぞれの製品の原理を理解しておく必要があります。エンドポイント比色法では、反応を停止して生じたパラニトロアニリンの吸光度を測る方法や、さらにこれをジアゾ化して長波長側で測定する方法などがあります。カイネティック比色法でも、カイネティック比濁法と同様に、一定の吸光度変化が起こるまでの反応時間を測定する方法に加え、日本では吸光度の増加率を測定する方法も使用されています。海外では KTA と同様の方法が主流で KCA(Kinetic-Chromogenic Assay) と呼ばれています。

2006 年に FDA に認可された弊社の PTS(Portable Test System)⁴⁾によるエンドトキシン測定法は、比色法の一つと考えられています(<http://www.criver.com>)。PTS は、保存検量線を使用するというので FDA に認可された製品で、ヨーロッパ薬局方からも国際調和エンドトキシン試験法に適合するとのコメントを得ています。日本薬局方では、どのような操作をすれば適合するかが明らかではありませんが、近い将来日本でも

欧米と同様の理解が得られることが期待されます。

エンドトキシン試験の手法については概ね標準化が進められてきたように思われますが、やはりその試験の性質上、制御できない誤差があることは否めません。従って、ある程度の誤差を許容しながら各施設での精度を上げていく必要があると思います。精度を上げるための工夫については、今後このシリーズで取り上げていきたいと考えています。その他の方法についてさらにご興味をお持ちの方は、Williams の著書をご参照ください⁵⁾。

新しい方法が医薬品や医療用具のエンドトキシン試験の分野で認められるためには、多くのデータと使用経験が必要と考えられ、比較的長い時間を必要とします。しかし、今後も新しいエンドトキシン測定法が開発されるでしょうし、その中から有望な次世代エンドトキシン測定法が出てくることでしょう。

<参考文献>

1. Levin, J., and Bang, F.B., *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **115**, 265-274 (1964).
2. Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices (1987) Food and Drug Administration, Rockville, USA
3. エンドトキシン試験法、第十五改正日本薬局方解説、日本公定書協会、東京 (2006)、B-427 - B-448
4. Wainwright, N. R., Nutter, D. and Jordan, F., In *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, Miller, M. J. (Ed.), PDA, Bethesda, (2005), 97-119
5. Williams, K., In *Endotoxin - Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation Third Edition*, Williams, K. (Ed.), Informa Healthcare, New York, (2007), 191-220.

