

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血液製剤に対するエンドトキシン試験法の適用と
基準化に関する研究

(H18-医薬-一般-035)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口 一成

国立感染症研究所 血液・安全性研究部

平成20（2008）年3月

研究組織

主任研究者：

山口 一成 国立感染症研究所、血液・安全性研究部
部長

分担研究者：

内藤 誠之郎 国立感染症研究所、検定検査品質保証室
主任研究官

浜口 功 国立感染症研究所、血液・安全性研究部
室長

堀内 善信 国立感染症研究所、細菌第二部
室長

目次

I. 総括研究報告書

血液製剤に対するエンドトキシン試験法の適用と基準化に関する研究	1
山口 一成	
資料：第4回合同会議要旨	9

II. 分担研究報告書

1. 発熱試験におけるウサギへの検体投与量の検討	13
内藤 誠之郎	
2. 血液製剤によるエンドトキシン試験法に対する反応干渉作用	22
堀内 善信	
3. 血液製剤によるエンドトキシン発熱反応の増強	42
浜口 功	
4. ヒト培養細胞からのサイトカイン産生を指標とする発熱試験法の検討	62
堀内 善信	
5. エンドトキシン規格値の算定と試験法適用の可能性	68
内藤 誠之郎	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	77
---------------------------	----

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血液製剤に対するエンドトキシン試験法の適用と基準化に関する研究

総括研究報告書

主任研究者：

国立感染症研究所、血液・安全性研究部

部長 山口 一成

分担研究者：内藤誠之郎¹⁾、浜口 功²⁾、堀内善信³⁾

研究協力者：落合雅樹³⁾、山本明彦³⁾、前山順一²⁾、益見厚子²⁾、古山和弘⁴⁾、
竹内繁美⁴⁾、池田清貴⁵⁾、因幡正代⁵⁾、山本栄二⁶⁾、外山幸司⁶⁾、
秋本芳則⁷⁾、徳永英治⁷⁾、只隈邦彦⁷⁾、宮崎陽子⁷⁾、有野義郎⁸⁾、
宮村真澄⁸⁾、児玉敏昭⁸⁾、小林幸子⁸⁾、赤石暁弘⁹⁾

1) 国立感染症研究所 検定検査品質保証室、2) 国立感染症研究所、血液・安全性研究部、3) 国立感染症研究所 細菌第二部、4) (株) ベネシス、5) CSL ベーリング (株)、6) 日本赤十字社、7) (財) 化血研、8) パクスター (株)、9) 日本製薬 (株)

研究要旨：

血液製剤に対して高度で適正な発熱性物質管理を導入するために、前年度に引き続き反応干渉因子試験およびエンドトキシン発熱増強作用の検討を行った。反応干渉因子試験の結果、ほとんどの製剤で強い反応干渉作用は認められず、エンドトキシン試験法を適用できる可能性が高いことが示唆された。また、エンドトキシン特異的ライセート試薬と非特異的ライセート試薬を用いた測定を比較した結果、血液製剤にはG因子を活性化する物質が含まれている場合があることが示唆され、血液製剤に対してはエンドトキシン特異的ライセート試薬の使用が必須であることが明らかになった。エンドトキシン発熱増強作用の検討では、凝固因子系の血液製剤5品目において3.6倍から8.9倍の発熱増強作用が確認された。そこで、この作用を考慮に入れて個々の血液製剤についてエン

ドトキシン規格値を計算したところ、0.2EU/mL から 2.5EU/mL の範囲に算定された。これらの規格値にもとづいて個々の血液製剤について最大有効希釈倍数 (MVD) を試算したところ、乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤を除いていずれの血液製剤においても反応干渉作用を回避するのに必要な希釈倍率を上回っており、エンドトキシン試験法の適用が可能であると判断された。乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤については強い反応阻害作用があり、通常の方法ではエンドトキシン試験法の適用が困難であると考えられた。

A. 研究目的

現在、血液製剤に対する発熱試験は、人血清アルブミン製剤と加熱人血漿たん白製剤を除いては、ウサギを用いた従来からの発熱試験法のみが適用されている。しかし、ウサギを用いた発熱試験法は ①動物を使った試験法であること ②手間とコストがかかること ③精度と感度が劣ることなどから、*in vitro* 試験法であるエンドトキシン試験法への代替が拡大している。エンドトキシン試験法は、カプトガニの血球から抽出した試薬が微量のエンドトキシンにより凝固する反応を原理とした高感度の *in vitro* エンドトキシン検出法である。エンドトキシンは、グラム陰性菌の細胞壁に存在するきわめて生物活性の強い物質であり、極微量で生体に発熱反応を引き起こす。注射製剤による発熱副反応の主要な原因は、製造過程で混入したエンドトキシンであると考えられることから、多くの注射剤に対して発熱試験法に替わってエンドトキシン試験法が適用されるようになってきている。日本薬局方では、製剤総則において注射剤には原則として

エンドトキシン試験法を適用し、エンドトキシン試験法の適用が困難な場合にのみ発熱試験法を適用することが規定されている。そこで、血液製剤に対して発熱試験法に替わってエンドトキシン試験法を適用できるかどうか検討するために本研究を行った。検討の対象となる血液製剤が多品目にわたるため、前年度に引き続き今年度も以下の課題について検討を行い、適切な判断を行うために十分なデータの集積を図った。

① 発熱試験におけるウサギへの検体投与量の検討

エンドトキシン規格値を決める因子の一つである発熱試験法におけるウサギへの検体投与量について再検討し、投与量を増やすことが適当と考えられた製剤について変更のバリデーションを行う。

② 血液製剤によるエンドトキシン試験法に対する反応干渉作用

各種の血液製剤について網羅的に、エンドトキシン試験法への反応干渉作用を回避して正確な測定を行うために必要な検体希釈倍率を明らかにした。

③ 血液製剤によるエンドトキシン発

熱反応の増強

適切なエンドトキシン規格値を設定するために、各種の血液製剤についてエンドトキシンによるウサギの発熱反応を増強するか、増強するとしたらどの程度の増強率かを明らかにした。

④ ヒト培養細胞からのサイトカイン産生を指標とする発熱試験法の検討

血液製剤によるエンドトキシンの発熱活性の増強について、ウサギとヒトの種差を考慮するために、ヒト細胞培養系からのサイトカイン産生を指標として血液製剤によるエンドトキシン活性増強を評価した。

B. 研究方法

1) エンドトキシン試験法の導入を検討する血液製剤

すでにエンドトキシン試験法の適用されている人血清アルブミン製剤および人加熱血漿たん白製剤を除くすべての血液製剤を対象として網羅的に検討した。静注用免疫グロブリン製剤、筋注用免疫グロブリン製剤、凝固因子製剤など 21 品目を対象とした。

2) 血液製剤メーカーとの協力

検討対象の血液製剤が多品目に亘るため、本年度も血液製剤製造各社と共同して研究を進めた。製造各社とは1年に1回合同会議を開催して、情報交換を図った(添付資料)。

3) 発熱試験におけるウサギへの検体投

与量の検討

前年度の検討により、投与量を増量することが適当であると考えられた製剤について、ひきつづき標準エンドトキシンを添加するシミュレーション試験を実施して、投与量を変更することに問題のないことを確認した。

4) 血液製剤による反応干渉作用の検討

エンドトキシン試験法は、反応系に存在する種々の物質により反応阻害や反応促進の影響を受けることが知られている。そこで、エンドトキシン試験法の適用を検討する血液製剤について、カイネティック比濁法およびカイネティック比色法の2種類の方法で反応干渉作用の有無を検討し、個々の血液製剤について適切な測定を行うのに必要な希釈倍率を求めた。

5) 血液製剤によるエンドトキシン発熱活性の増強の検討

血液製剤および生理食塩液に等量のエンドトキシンを添加してウサギに投与し、両者の発熱反応を比較することにより、血液製剤によるウサギのエンドトキシン発熱の増強作用を検討した。さらに、増強の認められた製剤について、その増強率を算出した。

6) ヒト培養細胞からのサイトカイン産生を指標とする発熱試験法の検討

前年度の検討により、発熱性物質に対する感受性がヒト末梢血に類似していることが明らかになったヒト培養細胞 28SC を用いて検討を行った。28SC 培養細胞をエンドトキシンで刺激してインターロイ

キン6 (IL-6) を産生させる系に各種の血液製剤をさまざまな濃度で加えた場合のIL-6 産生量の変化を測定して、各種の血液製剤によるエンドトキシン活性への影響を評価した。

7) エンドトキシン規格値の算定と試験法適用の可能性

日本薬局方参考情報に記載されている方法に準じてエンドトキシン規格値を算定し、さらに個々の血液製剤の発熱増強活性を考慮して規格値の補正を行った。

以上のようにして算定した規格値にもとづいて、日本薬局方エンドトキシン試験法の規定に準じて、個々の血液製剤について最大有効希釈倍数 (MVD) を試算した。MVD と反応干渉因子試験により明らかになった測定に必要な希釈倍数を比較してエンドトキシン試験法適用の可能性を検討した。

8) 倫理面への配慮

ウサギを使用した発熱実験は、国立感染症研究所動物実験指針にしたがって実施した。実験内容について、国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、承認を得た (承認番号: 207073)。

C. 研究結果

1) 発熱試験におけるウサギへの検体投与量の検討

5 品目の血液製剤 (静注用人免疫グロブリン製剤、乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子製剤、人ハプトグロビン製剤、乾燥人フィブリノゲン製剤、5%人血清アルブミ

ン製剤) について、エンドトキシンを添加してウサギの発熱反応を観察したところ、いずれも増量した新投与量での体温上昇度が現投与量でのそれを上回る傾向が認められ、投与量を増量することに問題は認められなかった。

2) 血液製剤による反応干渉作用の検討

本研究で検討した 5 社 21 品目の血液製剤のうち、乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤を除き、カイネティック比濁法 (ES-III) で 2-8 倍以上の希釈 (一部筋注用免疫グロブリン製剤で最大 16-32 倍以上の希釈)、カイネティック比色法 (エンドスペシー) では 4-8 倍以上の希釈により反応干渉作用を受けずに、製剤中に添加したエンドトキシン濃度の平行線定量法による算出が可能であった。

乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤は、エンドトキシン試験法に対する強い反応阻害作用を示し、反応干渉の除去にはかなりの希釈が必要であるため、感度の点から本試験法の適用は困難と考えられた。

さらに、血液製剤には、G 因子に反応する物質の混入が認められることから、エンドトキシン測定には生物学的製剤基準に従いエンドトキシン特異的ライセート試薬を用いる必要があることが確認された。

3) 血液製剤によるエンドトキシン発熱活性の増強の検討

乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子製剤、乾燥濃縮人血液凝固第 IX 因子製剤、人フ

イブリノゲン製剤、乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤および乾燥濃縮人活性化プロテイン C 製剤は、エンドトキシンによるウサギの発熱を有意に増強した。増強率は、それぞれ、3.6 倍、5.7 倍、5.1 倍、8.9 倍、4.7 倍と算定された。

一方、人免疫グロブリン製剤は、静注用、静注用特殊、筋注用の別なく、エンドトキシンによる発熱を有意に抑制した。

人ハプトグロビン製剤は、エンドトキシンによる発熱に有意 ($p \leq 0.05$) な影響が認められなかった。

4) ヒト培養細胞からのサイトカイン産生を指標とする発熱試験法の検討

人ハプトグロビン製剤、乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤及び乾燥濃縮人プロテイン C 製剤で用量依存的なエンドトキシン活性の増強現象が認められた。その増強の程度は、希釈倍率から計算すると、それぞれ 1.35、3.3、及び 2.8 倍であった。また、乾燥濃縮人血液凝固第 IX 因子製剤は、有意ではないがエンドトキシン活性の増強傾向が認められた。一方、静注用人免疫グロブリン製剤、筋注用人免疫グロブリン製剤、第 IX 因子製剤以外の凝固因子製剤については、エンドトキシン増強活性を認めなかった。

5) エンドトキシン規格値の算定と試験法適用の可能性

個々の血液製剤について、発熱増強作用も考慮に入れてエンドトキシン規格値を算出したところ、0.2EU/mL から 2.5EU/mL の間に算定された。

さらに、以上の規格値を基に、カイネティック比濁法を用いた場合とカイネティック比色法を用いた場合にわけて MVD を計算した。個々の血液製剤の MVD と反応干渉因子試験により明らかになった測定に必要な希釈倍数を比較して、エンドトキシン試験法の適用の可能性を判定したところ、どちらの方法を用いた場合にも、乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤を除いて、エンドトキシン試験法の適用が可能であると判定された。

D. 考察

エンドトキシン規格値の算定根拠の一つになる発熱試験法におけるウサギへの投与量を、臨床投与量との整合性および国際調和の観点から見直した。その結果、5 品目の血液製剤について投与量を増量する方がよいと考えられた。これらの製剤について投与量変更のバリデーション試験を実施したところ問題は認められず、投与量を増量することが適切と考えられた。そのうち 5%人血清アルブミンについては、すでにエンドトキシン試験法の適用も規定されているが、ウサギへの投与量を変更するにあたりそれに整合させてエンドトキシン規格値を 0.6EU/mL から 0.2EU/mL に引き下げることが適切と考えられる。

21 種類の血液製剤についてエンドトキシン試験法に対する反応干渉を検討したところ、乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤を除いては、それほど強い反応干渉

は認められず、最大 32 倍の希釈で測定が可能となったことから、ほとんどの血液製剤に対してエンドトキシン試験法を適用できる可能性があると考えられた。

ウサギのエンドトキシン発熱に対する血液製剤の影響を検討したところ、凝固因子系に関連する 5 品目の血液製剤について増強作用が認められた。また、ヒト細胞培養系を用いた検討でも、一部の血液製剤がエンドトキシンの活性を増強した。しかし、ヒト細胞培養系でのみ増強作用が確認された血液製剤はなかった。以上の観察と発熱試験法との整合性を図る観点から、発熱増強作用の認められた製剤については、エンドトキシン規格値の算定において、ウサギの発熱増強データに基づいて規格値を補正することが適当と考えられた。一方、発熱増強作用の認められなかった製剤および逆に発熱抑制作用の認められた製剤については、規格値を補正する必要はないと考えられる。

以上の考察に基づいて発熱増強作用も考慮に入れて算出したエンドトキシン規格値は、0.2EU/mL から 2.5EU/mL の範囲に算定された。今回、反応干渉因子試験に供試した血液製剤は 1 ロットを除いてこれら規格値以下の測定値を示しており、これらの規格値は正常に製造された血液製剤であれば十分にクリアーできる数値であると言える。

個々の血液製剤のエンドトキシン規格値にもとづいて試算した MVD は、乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤を除く血液

製剤については、反応干渉作用を回避するのに必要な希釈倍率との間に十分な余裕があり、エンドトキシン試験法の適用が可能であると考えられた。しかし乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤については、反応干渉作用が強く、単なる希釈によってではエンドトキシン試験法の適用が困難であることが明らかになった。

以上のように、ほとんどの血液製剤についてはエンドトキシン試験法の適用が技術的には可能であると考えられたが、実際にエンドトキシン試験法を適用する場合には、エンドトキシン試験法が、発熱性物質のうちエンドトキシンのみを検出する試験法であることに十分に留意すべきであろう。しかし、エンドトキシン試験法の利点と実質的な発熱性物質混入リスクを考慮すると、発熱試験法に替えてエンドトキシン試験法を導入することは、積極的に検討されるべきであると考ええる。

E. 結論

- 1) 静注用人免疫グロブリン製剤、乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子製剤、人ハプトグロビン製剤、乾燥人フィブリノゲン製剤、5%人血清アルブミン製剤は、発熱試験法におけるウサギへの投与量を増量すべきである。
- 2) 乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤を除く血液製剤は、エンドトキシン試験法に対する強い反応干渉作用は示さず、エンドトキシン試験法の適用が

可能である。

- 3) 一部の血液製剤は、エンドトキシンの発熱活性を増強するので、この点を考慮に入れてエンドトキシン規格値を算定すべきである。
- 4) エンドトキシン以外の発熱性物質を検出できないというエンドトキシン試験法の限界には留意すべきであるが、実質的な発熱性物質混入のリスクとエンドトキシン試験法の利点を考慮してエンドトキシン試験法の導入を積極的に進めるべきである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1) 誌上发表

1. 前山順一. 発熱試験法. 図説：生物学的製剤基準解説 2007年版 (株)じほう. 2007年12月.
2. 落合雅樹、山本明彦、堀内善信. エンドトキシン試験法. 図説：生物学的製剤基準解説 2007年版 (株)じほう. 2007年12月.
3. 浜口 功. 加熱人血漿たん白. 図説：生物学的製剤基準解説 2007年版 (株)じほう. 2007年12月.
4. 浜口 功. 人血清アルブミン. 図説：生物学的製剤基準解説 2007年版 (株)じほう. 2007年12月.
5. 山本明彦. 血液製剤の発熱性物質管理, エンドトキシン研究 10 基礎と臨床の最新知

見, 日本エンドトキシン研究会編集, 医学図書出版株式会社, 51-58, 2007.

6. Ochiai M, Yamamoto A, Kataoka M, Toyozumi H, Arakawa Y, Horiuchi Y. A quantitative in vitro assay to detect biological activity of endotoxin using rabbit peripheral blood. Alternatives to Animal Testing and Experimentation Special issue, vol. 14, in press.
7. 内藤誠之郎. 発熱性物質試験法, GMP微生物試験法 (株)じほう, in press.

2) 学会発表

1. Naito S, Ochiai M, Yamamoto A, Maeyama J, Masumi A, Hamaguchi I, Yamaguchi K and Horiuchi Y. Application of the Limulus Amebocyte Lysate Test to Various Blood Products as an Alternative Method to the Rabbit Pyrogen Test. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August 2007, Tokyo.
2. Horiuchi Y, Yamamoto A, Ochiai M, Kataoka M, Toyozumi H, Arakawa Y. A strategic approach for implementing the concept of 3Rs for safety control on pyrogen contamination in biological. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August 2007, Tokyo.
3. Ochiai M, Yamamoto A, Kataoka M, Toyozumi H, Arakawa Y, Horiuchi Y. A quantitative in vitro assay to detect

biological activity of endotoxin using rabbit peripheral blood. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August 2007, Tokyo.

4. Yamamoto A, Ochiai M, Kataoka M, Toyozumi H, Arakawa Y, Horiuchi Y. A clinically relevant in vitro pyrogen test using a human cell line that have the similar responsiveness to various pyrogens to that of human peripheral blood cell (hPBC). 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August 2007, Tokyo.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

血液製剤に対する発熱試験法の見直し

第4回 メーカー・国立感染症研究所合同会議 議事要旨

日時：2008年2月8日（金）13:30-16:00

場所：国立感染症研究所村山庁舎第1会議室

出席者：秋本芳則、徳永英治、宮崎陽子（化血研）小林幸子、宮村真澄（バクスター）古山和弘、佐々木祐子、吉井正彦、竹内繁美（ベネシス）外山幸司（日本赤十字）池田清貴、因幡正代、大根田守（CSL ペーリング）赤石暁弘（日本製薬）山口一成、浜口功、前山順一（感染研 血液・安全性研究部）、堀内善信、山本明彦、落合雅樹（感染研 細菌第二部）内藤誠之郎（感染研 検定検査品質保証室）（敬称略、順不同）

議事

感染研での厚労科研費での研究は今年度で終了する予定である。そこで、以下の各項目について、メーカーから感染研に報告されたデータを含めて、この2年間の研究について感染研側から総括報告を行い、意見を交換した。

1. ウサギへの投与量の変更

- 臨床投与量との整合性および国際調和の観点から検討したところ、静注用人免疫グロブリン製剤、乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子製剤、人ハプトグロビン製剤、乾燥人フィブリノゲン製剤、5%人血清アルブミン製剤については、発熱試験法でのウサギへの投与量を、それぞれ、体重1kgあたり10mL、50IU、5mL、5mL、10mLに増量したほうがよいと考えられた。
- 上記5種の血液製剤について、エンドトキシンを添加してウサギの発熱反応を観察したところ、いずれも増量した新投与量での体温上昇度が現投与量でのそれを上回る傾向が認められ、投与量を増量することに問題は認められなかった。したがって、今後、これら5種の血液製剤については、投与量を増量する方向で基準改正の手続きを進めることが適当であると考えられた。
- 5%人血清アルブミンについては、発熱試験法とともにエンドトキシン試験法の適用も規定されている。そこで、ウサギへの投与量を増量するにあたっては、それに応じてエンドトキシン試験法での規格値を現行の0.6EU/mLから0.2EU/mLに引き下げることが妥当であると考えられた。

2. エンドトキシン試験（反応干渉因子試験）

- 一部の筋注用人免疫グロブリン製剤、乾燥濃縮人アンチトロンビンIII製剤を除き、本研究班で試験した製剤は、カイネティック比濁法では2-8倍以上の希釈、カイネティック比色法では4-8倍以上の希釈により、反応干渉作用を受けずに、製剤中に添加したエンドトキシン量の算出が平行線定量法により可能であった。カイネティック比濁法に対する反応阻害が認められた筋注用免疫グロブリン製剤では、製剤を8-16倍以上に希釈することで反応阻害の除去が可能であり、8-32倍以上の希釈により製剤中に添加したエンドトキシン量の算出が平行線定量法により可能であった。製造所から報告された結果についても同様の解析を実施したところ、感染研の結果とよく一致していた。
- 乾燥濃縮人アンチトロンビンIII製剤にはエンドトキシン試験に対する強い反応阻害作用が認められ、希釈による反応干渉作用の除去にはかなりの希釈倍数が必要であり感度の点から適用は困難と考えられた。限外ろ過および加熱処理を組み合わせた前処理による反応干渉因子除去の可能性が示されたが、十分なデータを得るために今後も検討を続けることとした。

- 血液製剤には、G因子に反応する物質の混入が認められることから、エンドトキシン測定には生物学的製剤基準に従いエンドトキシン特異的ライセート試薬を用いる必要がある。

3. ヒト株化細胞を用いた評価

- 血液製剤を5倍の段階希釈し、これにエンドトキシンを高濃度から低濃度まで4段階加えて、ヒト末梢血由来株化細胞である28SC細胞の培養系へ添加し、18時間後の培養上清中に産生されるヒトIL-6を定量した。血液製剤を添加しないエンドトキシンのみ添加した場合に産生されるヒトIL-6量と比較することにより、血液製剤によるエンドトキシンの活性増強を評価した。
- その結果、人ハプトグロビン製剤、乾燥濃縮人アンチトロンビンIII製剤及び乾燥濃縮人プロテインC製剤で用量依存的なエンドトキシン活性の増強現象が見られた。この現象は、複数製造所、複数ロットで確認され、製剤特有の現象であることが示唆された。その増強の程度は、希釈倍率から計算すると、それぞれ1.35、3.3及び2.8倍であった。また、乾燥濃縮人血液凝固第IX因子は、有意ではないがやはりエンドトキシン活性の増強傾向が認められた。
- 上記の製剤の他に試験に供した血液製剤である静注用人免疫グロブリン製剤10種28ロット、筋注用人免疫グロブリン製剤5種7ロット、乾燥濃縮人血液凝固第IX因子製剤以外の凝固因子製剤については、ヒト株化細胞を用いた評価では、エンドトキシン増強活性を認めなかった。

4. 血液製剤によるエンドトキシン発熱活性の増強

- 等量のエンドトキシン（ウサギの体重1kgあたり10EU）を添加した各種の血液製剤および生理食塩液をウサギに投与して発熱反応を比較し、血液製剤によるエンドトキシンの発熱反応への影響を評価した。
- 乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子製剤、乾燥濃縮人血液凝固第IX因子製剤、人フィブリノゲン製剤、人アンチトロンビンIII製剤および乾燥濃縮人活性化プロテインC製剤は、エンドトキシンによるウサギの発熱を有意に増強した。増強率は、それぞれ、3.6倍、5.7倍、5.1倍、8.9倍、4.7倍と算定された。これらの製剤にエンドトキシン試験法を適用する際には、エンドトキシン規格値を発熱増強率に応じて低めに補正する必要があると考えられる。
- 人免疫グロブリン製剤は、静注用、静注用特殊、筋注用の別なく、エンドトキシンによる発熱を有意に抑制した。これらの製剤にエンドトキシン試験法を適用する際には、安全性重視の観点からエンドトキシン規格値の補正を行わないのが妥当と考えられる。
- 人ハプトグロビン製剤は、エンドトキシンによる発熱に有意（危険率5%）な影響が認められなかった。したがって、この製剤にエンドトキシン試験法を適用する際には特に規格値を補正する必要はないと考えられる。
- 前項のヒト株化細胞を用いた評価結果と本項のウサギを用いた検討結果の間には、一致する点と一致しない点があったが、おおむねウサギを用いた検討の方がより多くの製剤で発熱増強が認められ、増強率も高く算定された。ヒトでのみ発熱増強がある製剤は認められなかった。以上の点と、これまで実施されてきたウサギ発熱試験と同等以上の安全性を確保する観点から、次項の規格値の算定におい

てはウサギでの結果を基本に計算するのが適当と考えられた。

- ・ 今回の発熱増強率の算定では、信頼限界の幅が考慮されていない。実際に基準化を考える際には、この点も考慮に入れた検討が必要かもしれない。

5. 規格値の算定と適用の可否の評価

- ・ 日本薬局方参考情報に記載されている方法を基本として、前項で算定した血液製剤によるエンドトキシン発熱の増強率も考慮に入れて、エンドトキシン規格値を試算した。
- ・ 上記で試算した規格値から、各血液製剤の最大有効希釈倍数（MVD）を算出した。
- ・ MVDと反応干渉因子試験により明らかにされた各血液製剤の測定時に必要となる希釈倍数を比較した。その結果、乾燥濃縮人アンチトロンビン III を除いて、他の血液製剤に対してはエンドトキシン試験法の適用が可能と判断された。

6. まとめの討論

- ・ 2年間の共同研究により、ほとんどの血液製剤にエンドトキシン試験法の適用が可能であることが明らかになった。しかし、同試験法を実際に適用するにあたっては、同試験法ではエンドトキシン以外の発熱性物質を検出することができないことに十分に留意すべきであることが強調された。
- ・ 上記の理由および反応干渉の可能性もわずかながら考えられることから、生物基にエンドトキシン試験法を導入するに当たっては、人血清アルブミンなどと同様に、発熱試験法とエンドトキシン試験法を併記して、両試験法とも選択できるかたちで導入することが妥当であると考えられた。
- ・ 一製造所での経験として、製造工程で発熱性が検出されたものは、すべてエンドトキシン陽性であったことが報告された。
- ・ 今後の予定として、感染側でエンドトキシン試験法導入のための生物基改正の準備を進めていくことが確認された。

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血液製剤に対するエンドトキシン試験法の適用と基準化に関する研究

分担研究報告書

研究課題：発熱試験におけるウサギへの検体投与量の検討

分担研究者：内藤 誠之郎

国立感染症研究所 検定検査品質保証室 主任研究官

研究協力者：前山順一¹⁾、古山和弘²⁾、竹内繁美²⁾、池田清貴³⁾、因幡正代³⁾、
山本栄二⁴⁾、外山幸司⁴⁾、秋本芳則⁵⁾、徳永英治⁵⁾、只隈邦彦⁵⁾、
宮崎陽子⁵⁾、有野義郎⁶⁾、宮村真澄⁶⁾、児玉敏昭⁶⁾、小林幸子⁶⁾、
赤石暁弘⁷⁾

- ¹⁾ 国立感染症研究所、血液・安全性研究部、²⁾ (株) ベネシス、³⁾ CSL ベーリング (株)、
⁴⁾ 日本赤十字社、⁵⁾ (財) 化血研、⁶⁾ バクスター (株)、⁷⁾ 日本製薬 (株)

研究要旨

前年度に引き続き、5種類の血液製剤（静注用免疫グロブリン製剤、乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子製剤、人ハプトグロビン製剤、乾燥人フィブリノゲン製剤、5%人血清アルブミン製剤）について、エンドトキシン添加製剤を新旧2種類の投与量でウサギに投与して発熱反応を測定し、投与量を増量することに問題がないかどうか確認するためのデータを集積した。その結果、いずれの製剤においても、現投与量に比べて新投与量の方が強い発熱反応を誘導する傾向が認められ、投与量を増量することに問題は認められなかった。したがって、臨床投与量との整合性および国際調和の観点から、これら5種類の血液製剤については、発熱試験法におけるウサギへの投与量を増量することが適当であると考えられる。

A. 研究目的

血液製剤に対してエンドトキシン試験法を導入するにあたり、製剤へのエンド

トキシンの混入を許容する管理レベル（エンドトキシン規格値）を、発熱試験法とエンドトキシン試験法で整合させる

必要がある。そのためには、エンドトキシン規格値の設定に際して、発熱試験法でのウサギへの検体投与量を考慮に入れる必要がある。

ウサギ発熱試験法での検体投与量は、製剤品目ごとに人への臨床投与量や国際調和などを考慮に入れて、生物学的製剤基準によって規定されている。今回、本研究班で血液製剤へのエンドトキシン試験法の導入を検討するにあたり、現行のウサギ発熱試験法での検体投与量（現投与量）が適正かどうかを検討した（平成18年度）。その結果、5種類の血液製剤について表1の投与量（新投与量）に増量することが適当であると考えられた。

今年度は、前年度に引き続き、これら5種類の血液製剤に対して、エンドトキシンを添加して現投与量および新投与量でウサギに投与するシミュレーション試験を実施し、投与量を変更することに問題のないことを確認するためのデータを蓄積した。

B. 研究方法

1) 動物

生物学的製剤基準に準じて、体重1.5kg以上の健康なウサギを用いた。過去にエンドトキシンを投与されたウサギ、発熱を示したウサギおよび実験に用いる血液製剤と共通の抗原物質を含む検体を投与されたことがあるウサギは使用しなかった。国立感染症研究所（以下、感染研）で行なわれた実験では、北山ラベス（株）

または日本医科学資材（株）から購入したメスの日本白色種のウサギ（体重2kgから3kg）を用いた。

2) 試薬

エンドトキシンは、日本薬局方標準品であるエンドトキシン10000標準品を（財）日本公定書協会から購入して使用した。エンドトキシンの溶解と希釈には、日本薬局方・注射用水、日本薬局方・生理食塩液を使用した。

3) 血液製剤

製造者においては、自社製造の検定合格品を検体として実験を行なった。感染研においては、各メーカーから検定合格品の供与を受けて、実験に使用した。

4) エンドトキシンの希釈と検体への添加

エンドトキシン10000標準品に注射用水を加え、vortexミキサーで5分間攪拌して、10,000EU/mLのエンドトキシン溶液（標準原液）を調製した。標準原液は、4℃で保存して14日以内に使用した。標準原液を生理食塩液で適当に段階希釈した後、検体に添加した。検体へのエンドトキシン希釈液の添加は、1:100の希釈倍率で行なった。

5) 発熱試験

生物学的製剤基準に準じて試験を行なった。検体をおのおの3匹のウサギの耳静脈内に投与した。ウサギの体重あたりの検体の投与量は、血液製剤ごとに生物学的製剤基準の規定にしたがった。検体の注射直前および注射後3時間ないし5時間、30分ごとにウサギの直腸体温を

測定した。注射前の体温と注射後の体温の差を差体温とし、差体温の最大値をその試験動物の発熱反応とした。

6) 異なる投与量により誘導されるウサギの発熱反応の比較

血液製剤にエンドトキシンを添加して現投与量および新投与量でウサギに投与して、誘導される発熱反応を比較した。添加するエンドトキシン量は、現投与量でウサギに投与した時にウサギの体重1kgあたり10EU（低用量）および40EU（高用量）となる2用量とした。エンドトキシンを添加した血液製剤を、現投与量および新投与量で、それぞれ3匹のウサギに投与して、発熱試験を実施した。コントロールとして、エンドトキシンを添加していない血液製剤について、同様に発熱試験を実施した。複数のロットで同様の実験をくり返し、新投与量で認められた体温上昇の平均値が、現投与量で認められた体温上昇の平均値と同等以上であった場合に、発熱試験法におけるウサギへの検体投与量を新投与量に変更しても問題はないと判断した。

7) 倫理面への配慮

ウサギを使用した発熱実験は、国立感染症研究所動物実験指針にしたがって実施した。実験内容について、国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、承認を得た（承認番号：207073）。

C. 結果

前年度の検討により投与量を増量する

ことが適当であると考えられた5種類の血液製剤（静注用人免疫グロブリン製剤、乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子製剤、人ハプトグロビン製剤、乾燥人フィブリノゲン製剤、5%人血清アルブミン製剤）について、B-6に記載した方法で、現投与量および新投与量により誘導される発熱反応を比較した。

① 静注用人免疫グロブリン製剤

4種類の静注用人免疫グロブリン製剤（ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン製剤3ロット、乾燥スルホ化人免疫グロブリン製剤3ロット、乾燥pH4処理人免疫グロブリン製剤1ロット、乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン製剤2ロット）について検討した。その結果、いずれの製剤およびいずれのエンドトキシン添加量においても、現投与量に比べて新投与量では体温上昇度が増加した（図1a-d）。静注用人免疫グロブリン全体では、新投与量の方が現投与量よりも有意（ $p \leq 0.01$ ）に体温上昇度の平均値が増加した（図1e）。

② 乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子製剤

3製造所、21ロットの乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子製剤（第VIII因子製剤）について検討した。いずれのエンドトキシン添加量においても、新投与量の方が現投与量よりも有意（ $p \leq 0.01$ ）に体温上昇度の平均値が増加した（図2-a）。製造所およびロットによる違いは認められなかった。

③ 人ハプトグロビン製剤

3ロットの人ハプトグロビン製剤について検討した。いずれのロットにおいても新投与量での体温上昇度は現投与量の体温上昇度と同等以上であり、全体の平均値は、低エンドトキシン添加量では有意差 ($p \leq 0.05$) をもって新投与量の方が高くなり、高エンドトキシン添加量でも新投与量の方が高くなる傾向が認められた (図 2-b)。

④ 乾燥人フィブリノゲン製剤

3ロットの乾燥人フィブリノゲン製剤について検討した。いずれのロットにおいても新投与量での体温上昇度は現投与量の体温上昇度と同等以上であり、全体の平均値は、低エンドトキシン添加量、高エンドトキシン添加量ともに、有意差 ($p \leq 0.05$) をもって新投与量の方が高くなった (図 2-c)。

⑤ 5%人血清アルブミン製剤

3ロットの5%人血清アルブミン製剤について検討した。いずれのロットにおいても新投与量での体温上昇度は現投与量の体温上昇度と同等以上であり、全体の平均値は、低エンドトキシン添加量では現投与量と新投与量は同等、高エンドトキシン添加量では、新投与量の方が有意差 ($p \leq 0.01$) をもって高くなった (図 2-d)。

D. 考察

ウサギへの投与量を増量した方がよいと考えられる5種類の血液製剤 (静注用人免疫グロブリン製剤、乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子製剤、人ハプトグロビン製剤、乾燥人フィブリノゲン製剤、5%人血清アルブミン製剤) について、エンドトキ

剤、乾燥人フィブリノゲン製剤、5%人血清アルブミン製剤) について、いずれも現投与量に比べて新投与量では体温上昇度が増加する傾向が認められた。エンドトキシン添加量およびロットごとに比べた場合にも、新投与量での体温上昇度は現投与量の体温上昇度と同等以上であり、逆転することはなかった。以上のことから、これらの製剤について、投与量を増量することに問題はないと考えられた。したがって、これらの製剤については、臨床投与量との整合性および国際調和の観点から、投与量を増量することが適当であると考えられる。

人血清アルブミン製剤については、現行の基準で発熱試験として、ウサギを用いる発熱試験法とエンドトキシン試験法のうちどちらを実施してもよいことになっている。エンドトキシン試験法を実施する場合の規格値は 0.6EU/mL である。5%製剤についてウサギへの投与量を 3mL から 10mL に増量する場合には、それに整合させてエンドトキシン試験法の規格値も三分の一程度、すなわち加熱人血漿たん白製剤と同等の 0.2EU/mL に引き下げるのが妥当と考える。

E. 結論

1) 5種の血液製剤 (静注用人免疫グロブリン製剤、乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子製剤、人ハプトグロビン製剤、乾燥人フィブリノゲン製剤、5%人血清アルブミン製剤) について、エンドトキ