

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 18-19 年度 総合研究報告書

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
---------------------------------------	---

主任研究者 山口 一成

資料1 第1回合同会議議事要旨	19
資料2 第2回合同会議議事要旨	22
資料3 第3回合同会議議事要旨	27
資料4 第4回合同会議議事要旨	31
資料5 エンドトキシン試験（反応干渉因子試験）プロトコール	34
資料6 反応干渉が認められた製剤のエンドトキシン試験プロトコール	39
資料7 発熱予備実験プロトコール	42
資料8 発熱増強活性試験プロトコール	44
資料9 ウサギへの検体投与量変更のバリデーション試験プロトコール	47

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物別刷	53
-----------------------	----

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⁾、
今川義孝⁷⁾、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、より高度で適正な発熱性物質管理を導入するために、現行のウサギ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を検討した。検討対象の血液製剤は、すでにエンドトキシン試験法が適用されている人血清アルブミン製剤と加熱人血漿たん白製剤をのぞく 21 品目である。これら血液製剤に、標準エンドトキシンを添加して反応干渉因子試験を行ったところ、多く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 β グルカン様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特異

的ライセート試薬の使用が必須であることが示された。次に、発熱性の管理として適正なエンドトキシン規格値を設定するために、血液製剤によるエンドトキシンの発熱活性の増強作用を検討した。その結果、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認められた。そこで、この発熱増強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ために必要な希釈倍率を十分に上回っており、エンドトキシン試験法の適用は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。以上のように多くの血液製剤についてエンドトキシン試験法を適用することが技術的に可能であることが明らかになったことから、エンドトキシンのみしか検出できないというエンドトキシン試験法の限界に留意しつつ、エンドトキシン試験法導入のメリットと実質的な発熱リスクを考慮して、血液製剤に対するエンドトキシン試験法の適用を積極的に進めるべきであると考えられた。

A. 研究目的

発熱性物質の混入を防止することは、静注用医薬品の安全性確保における重要項目の一つである。そこで、血液製剤については生物学的製剤基準で発熱試験の実施が規定されている。発熱試験は、通常、ウサギに試験品を静脈注射して発熱反応を観察するウサギ発熱試験法で行なわれている。しかし、この方法は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感度と精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の適用が拡大している。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。注射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、発熱試験法の代替法と

してエンドトキシン試験法が適用される。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。しかし、血液製剤については人血清アルブミン製剤および加熱人血漿たん白製剤を除いて、エンドトキシン試験法は導入されていない。血液製剤については、近年の製造技術の向上により、製造過程における発熱性物質混入についても管理技術の改善がみられ、ウサギ発熱試験で陽性になることは稀になっている。したがって、より高感度、高精度のエンドトキシン試験法を適用することによって、より高度な発熱性物質管理を目指すことは、動物愛護や試験コストの面に加えて、品質管理上でも意義が大きいと考えられる。また、先行してエンドトキシン試験法が適用されている人血清アルブミン製剤と加熱人血漿たん白製剤において

は、10年以上にわたって特に問題は認められていないことから、他の血液製剤についても、エンドトキシン試験法を適用できる可能性は十分にあると考えられた。そこで人血清アルブミン製剤および加熱人血漿たん白製剤以外の種々の血液製剤に対してもエンドトキシン試験法を導入できるかどうか検討した。

エンドトキシン試験法は、反応系に存在するさまざまな物質や pH などの条件により影響（反応干渉）を受けやすいことが知られており、適用するにあたっては製剤ごとに十分なバリデーションを実施することが必要である。また、製剤によっては、生体に投与したときにエンドトキシンの発熱活性を増強することが知られている。そこで、発熱反応を増強する製剤に対しては、エンドトキシン規格値（混入を許容するエンドトキシンの限度値）を低めに補正することが必要になる。そこで、本研究では、各種の血液製剤について網羅的にバリデーション試験（反応干渉試験）およびエンドトキシンの発熱活性への影響を検討して、血液製剤に幅広くエンドトキシン試験法を導入するための技術的条件を整備した。

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

人血清アルブミン製剤および加熱人血漿たん白製剤（この2製剤にはすでに生

物学的製剤基準でエンドトキシン試験法が導入されている）以外の血液製剤について、網羅的にエンドトキシン試験法の導入を検討した。本研究班で検討した血液製剤は、以下の21品目である。

a) 静注用人免疫グロブリン製剤

1. 乾燥スルホ化人免疫グロブリン
2. 乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン
3. pH4 処理酸性人免疫グロブリン
4. 乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン
5. ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン
6. 乾燥 pH4 処理人免疫グロブリン

b) 筋注用人免疫グロブリン製剤

7. 人免疫グロブリン

c) 特殊人免疫グロブリン製剤

8. 抗 HBs 人免疫グロブリン
9. 乾燥抗 HBs 人免疫グロブリン
10. ポリエチレングリコール処理抗 HBs 人免疫グロブリン
11. 乾燥抗 D(Rho) 人免疫グロブリン
12. 抗破傷風人免疫グロブリン
13. 乾燥抗破傷風人免疫グロブリン
14. ポリエチレングリコール処理抗破傷風人免疫グロブリン
15. ヒスタミン加人免疫グロブリン

d) 凝固因子製剤

16. 乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子
17. 乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子

e) その他

18. 乾燥人フィブリノゲン
19. 乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ
20. 人ハプトグロビン
21. 乾燥濃縮人活性化プロテイン C

2) 血液製剤メーカーとの協力

検討対象の血液製剤が多種類にわたるので、検討を迅速に進めるために、以下の2点で血液製剤製造各社と協力した(図1)。

- ①自社製造品目に対する試験の実施
- ②試験サンプルの感染研への提供。

本研究開始前の平成17年12月に血液製剤メーカーとの合同会議を持ち(資料1)、以上の点を確認した。その後、研究が開始されてから、平成18年7月、平成19年2月および平成20年2月に製造業者との合同会議を開催して、情報の共有と意思の疎通を図りつつ検討を進めた(資料2-4)。

さらに、実施する試験の質を確保し、製造業者および感染研で行なった試験データの比較と解析が円滑にできるように、試験ごとに詳細な実施方法を定めたプロトコールを作成し(資料5-9)、これらにしたがって試験を実施した。

3) 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際の前提となる、ウサギ発熱試験法での検体投与量について、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を行った(表1)。その結果、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、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。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た。反応干渉作用は、標準エンドトキシンを添加したのち段階希釈した検体を測定し、標準直線との平行性および添加したエンドトキシンの回収率により評価した。また、複数の実験室でエンドトキシン試験を実施して、その結果を比較した。

さらに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の比較も行った。

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

製剤の成分がエンドトキシンによる発熱反応を増強する場合には、その程度に応じてエンドトキシン規格値を低めに設定する必要がある。そこで、個々の血液製剤について、製剤によるエンドトキシン発熱活性の増強を検討した。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した。血液製剤による発熱反応の方が生理食塩液による発熱反応よりも有意に高かった場合に、その血液製剤にはエンドトキシン発熱反応を増強する作用があると判断し、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

ウサギとヒトでは、発熱性物質に対する感受性が一致するとはかぎらない。そこで、よりヒトでの発熱を正確に反映する試験系を構築するために、複数のヒト細胞株とヒト末梢血を各種の発熱性物質で刺激したときの炎症性サイトカインの産生パターンを比較して、発熱性物質に対する感受性がヒト末梢血により近似している細胞株を選び出した。このようにして選択したヒト細胞株 28SC 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、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の評価

日本薬局方参考情報に記載されている方法に準じて、個々の血液製剤についてエンドトキシン規格値を算出した。さらに、エンドトキシンの発熱活性を増強した血液製剤については、その増強率に応じてエンドトキシン規格値を補正した。このようにして算出した規格値に基づいて、日本薬局方エンドトキシン試験法に規定されている方法に準じて最大有効希釈倍数 (MVD) を試算した。MVD と個々の製剤における反応干渉作用を回避するの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評価した。

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 : 105011 [平成 18 年度]、207073 [平成 19 年度])。

C. 研究結果

1) 発熱試験法におけるウサギへの検体投与量の検討

現在の生物学的製剤基準で規定されている発熱試験法におけるウサギへの検体投与量を、臨床投与量との整合性およびヨーロッパ薬局方の規定との比較により見直したところ、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および 5% 人血清アルブミン製剤について、投与量を増量したほうがよいと考えられた。そこで、これら 5 種の血液製剤について、既知の 2 用量の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、いずれにおいて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 (表 2)。

2) 血液製剤による反応干渉作用の検討

5 社 21 品目の血液製剤について、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 種類のエンドトキシン試験法について反応干渉作用を検討した。その結果、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 (エンドスピー) 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 (表 3)。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、エンドトキシン特異的ライセート試薬とエンドトキシン非特異的ライセート試薬を比較した検討からは、血液製剤には G 因子に反応する物質が混入する可能性があることが示唆された (表 4)。したがって、血液製剤にエンドトキシン試験法を適用する場合には、現在の生物学的製剤基準でも規定されているように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。この結果は、観察した範囲において製造業者およびロットの違いに関わりなく一貫していた。

増強率は第 VIII 因子製剤が 3.6 倍、第 IX 因子製剤が 5.7 倍、フィブリノゲン製剤が 5.1 倍、アンチトロンビン III 製剤が 8.9 倍、人活性化プロテイン C 製剤が 4.7 倍と算定された (表 5)。

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

さまざまな種類のエンドトキシンやエンドトキシン以外の発熱物質でヒト末梢血を刺激したところ、上清中に異なる量のサイトカインが産生された。このように、ヒト末梢血は発熱性物質の種類により異なる感受性を示した。ヒト由来細胞株についても同様の実験をしたところ、28SC 細胞が、ヒト末梢血と最も類似した発熱性物質に対する感受性のパターンを示した。28SC 細胞は、エンドトキシンだけでなく、ペプチドグリカンや β グルカンに対する反応性もヒト末梢血と相同であった。

そこで、28SC 培養細胞をエンドトキシンの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、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。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 (表 6)。

さらに、上記の規格値を基に、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 (表 7)。

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、投与量変更のバリデーションにおいても問題は認められなかった。したがって、これらの血液製剤については投与量を増量することが適当であろう。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 に引き下げることも適当と考えられる。

21 品目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、すべて、これら規格値以下の実測値を示しており、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と思われた。

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、積極的に進められるべきであると考えられる。

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を示さず、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勘案してエンドトキシン試験法の導入を積極的に考えるべきである。

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. 山本明彦、落合雅樹、堀内善信：血液

製剤のエンドトキシン試験適用、第12回日本エンドトキシン研究会総会、平成18年11月 東京

2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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

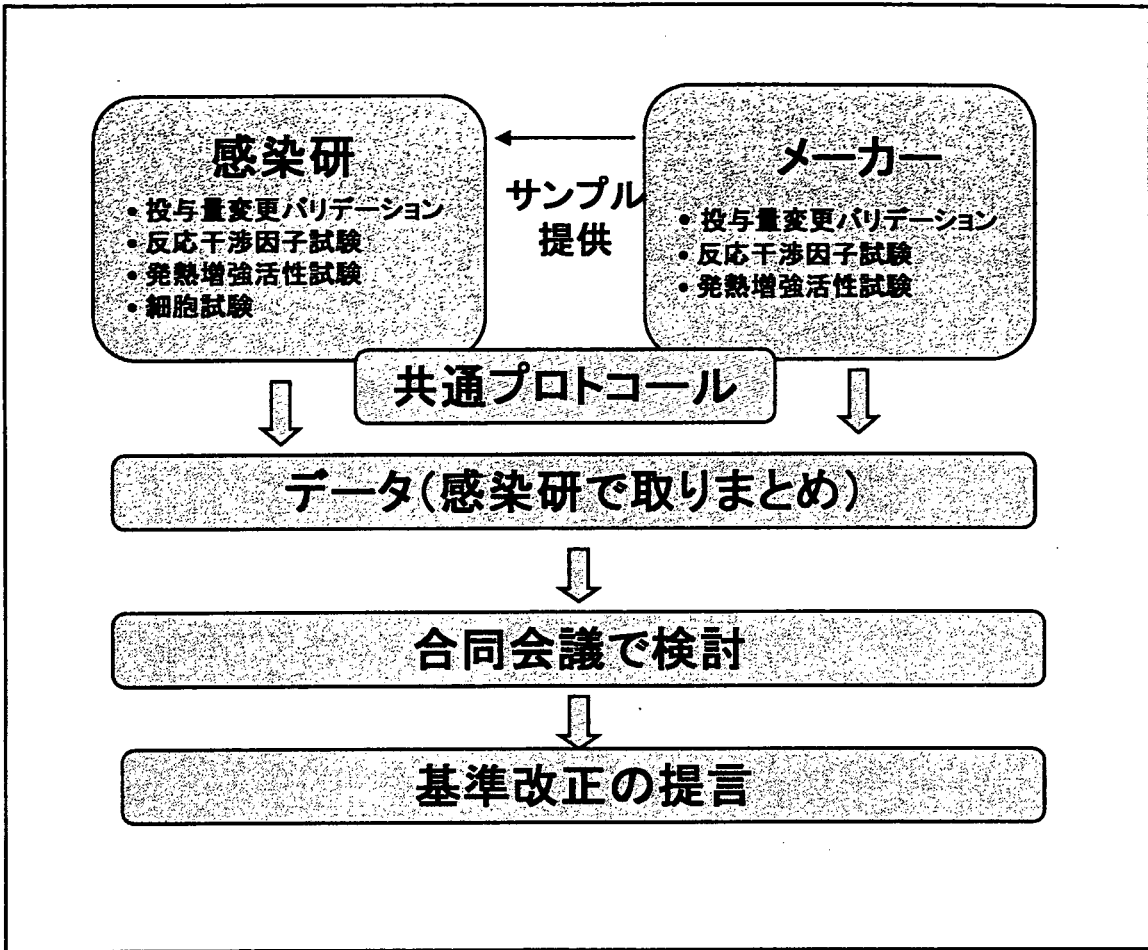


図1. 検討の枠組み

表1. 発熱試験法におけるウサギへの投与量を増量した方がよいと考えられる血液製剤

	発熱試験におけるウサギへの投与量		臨床投与量	新投与量案
	生物学的製剤基準	ヨーロッパ薬局方		
人血清アルブミン(5%)	3mL/kg	10mL/kg	1.5 - 4.2mL/kg	10mL/kg
静注用人免疫グロブリン	3mL/kg	10mL/kg	1.5 - 4 mL/kg	10mL/kg
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子	10単位/kg	50単位/kg	33単位/kg	50単位/kg
乾燥人フィブリノゲン	2.5mL/kg	30mg/kg	2.5mL(50mg)/kg	5mL/kg
人ハプトグロビン	3mL/kg	基準なし	3.3mL/kg	5mL/kg

表2. 新投与量と現投与量での発熱反応の比較

	n ¹⁾	低エンドトキシン濃度 ²⁾					高エンドトキシン濃度 ³⁾				
		現投与量		新投与量		p-value ⁴⁾	現投与量		新投与量		p-value ⁴⁾
		Mean (°C)	SD	Mean (°C)	SD		Mean (°C)	SD	Mean (°C)	SD	
静注用人免疫グロブリン	33	0.29	0.19	0.51	0.3	0.0008	0.57	0.28	0.91	0.24	2.3E-06
ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン	12	0.24	0.19	0.38	0.28	0.169	0.58	0.28	0.96	0.24	0.002
スルホ化人免疫グロブリン	12	0.35	0.17	0.61	0.26	0.008	0.53	0.25	0.88	0.24	0.002
乾燥pH4処理人免疫グロブリン	3	0.21	0.08	0.29	0.22	0.601	0.36	0.11	0.66	0.21	0.09
イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン	6	0.32	0.26	0.68	0.34	0.062	0.75	0.37	0.96	0.18	0.238
乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子	24	0.81	0.22	1.15	0.25	7.8E-06	1.06	0.28	1.52	0.32	3.0E-06
人フィブリノゲン	12	0.89	0.21	1.34	0.23	4.5E-05	1.5	0.24	1.8	0.31	0.013
人ハプトグロビン	12	0.63	0.21	0.82	0.24	0.043	1.02	0.18	1.17	0.22	0.086
人血清アルブミン(5%)	12	1.05	0.26	1.02	0.21	0.792	0.98	0.22	1.48	0.43	0.0015

1) 各群のウサギ羽数。

2) 現投与量で投与したとき、エンドトキシンの投与量が体重1kgあたり10EUとなる濃度。

3) 現投与量で投与したとき、エンドトキシンの投与量が体重1kgあたり40EUとなる濃度。

4) 等分散を仮定した2標本によるt検定。

表3. エンドトキシン試験適用に必要な最低希釈倍率

静注用免疫グロブリン製剤	検体数	必要希釈倍率			
		ES-III		エンドスペシー	
		反応干渉*1	平行性*2	反応干渉*1	平行性*2
ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン	3	4	8	4	4
ポリエチレングリコール処理抗HBs人免疫グロブリン	3	2	4	4	4
ポリエチレングリコール処理抗破傷風人免疫グロブリン	3	2 - 4	8	4	4
pH4酸性処理人免疫グロブリン	3	8	8	4	4
乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン	3	4	4	4	4
乾燥pH4処理人免疫グロブリン	3	4	8	4	4
乾燥スルホ化人免疫グロブリン	3	2 - 4	8	4	4
乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン	1	4	4	4	4

筋注用免疫グロブリン製剤	検体数	必要希釈倍率			
		ES-III		エンドスペシー	
		反応干渉*1	平行性*2	反応干渉*1	平行性*2
人免疫グロブリン	3	8 - 16	16 - 32	4	4
人免疫グロブリン	2	8	8	4	8
抗HBs人免疫グロブリン	3	16	16 - 64	4	4 - 8
抗HBs人免疫グロブリン	2	8 - 16	8 - 16	4	4 - 8
抗破傷風人免疫グロブリン	2	8	8	4	4
乾燥抗HBs人免疫グロブリン	3	2 - 4	8	4	4
乾燥抗破傷風人免疫グロブリン	3	4 - 8	8	4	4
乾燥抗D(Rho)人免疫グロブリン	3	8	8	4	4
ヒスタミン加入免疫グロブリン(乾燥)	3	8	8 - 32	4 - 8	4

凝固因子製剤およびその他製剤	検体数	必要希釈倍率			
		ES-III		エンドスペシー	
		反応干渉*1	平行性*2	反応干渉*1	平行性*2
人ハプトグロビン	4	2	2	4	4
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅳ因子	4	2	2	4	4
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅳ因子	3	2	2	4	4
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅳ因子	3	2	2	4	4
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子	4	2	2	4	4
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子	3	2	2	4	4
乾燥人フィブリノゲン	4	2 - 4	8	4	4 - 8
乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ	2	≥ 64	-	≥ 256	-
乾燥濃縮人活性化プロテインC	3	2	2 - 4	4	4

*1 添加エンドトキシンの回収率が 50 - 200%の範囲内となる最低希釈倍率

*2 エンドトキシン標準品の検量線と平行性が否定されない最低希釈倍率

表4. 種々のライセート試薬の測定結果とβ-グルカン量

製剤名	EU/mL				pg/mL	Ratio*4	発熱試験
	ES-Ⅲ	エンドスペシー	トキシカラー*1	K-QCL*2	β-グルカン*3		
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	0.06	0.01	0.03	0.05	162.5	2.3	陰性
ポリエチレングリコール処理抗HBs人免疫グロブリン	0.02	0.01	0.02	0.02	79.0	1.5	陰性
ポリエチレングリコール処理抗破傷風人免疫グロブリン	0.03	0.01	0.20	0.02	43.2	15.1	陰性
pH4処理酸性人免疫グロブリン	0.06	0.02	0.05	0.09	114.9	2.6	陰性
乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン	0.02	0.01	0.01	0.02	4.0	1.0	陰性
乾燥pH4処理人免疫グロブリン	0.04	0.02	0.13	0.17	168.8	7.5	陰性
乾燥スルホ化人免疫グロブリン	0.03	0.01	0.01	0.02	2.5	0.9	陰性
人免疫グロブリン	0.06	0.05	0.19	38.52	153.8	3.9	陰性
抗HBs人免疫グロブリン	0.05	0.02	0.08	0.20	82.3	5.0	陰性
抗破傷風人免疫グロブリン	0.05	0.07	2.66	336.85	3936.0	36.8	陰性
乾燥抗HBs人免疫グロブリン	0.03	0.01	0.09	0.10	308.1	6.5	陰性
乾燥抗破傷風人免疫グロブリン	0.03	0.03	0.04	195.31	56.2	1.3	陰性
乾燥抗D(Rho)人免疫グロブリン	0.05	0.01	0.11	0.08	334.4	8.2	陰性
凝固因子製剤およびその他製剤							
人ハプトグロビン	0.01	0.01	0.01	0.18	6.2	1.1	陰性
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅳ因子	0.01	0.01	0.01	0.02	12.7	0.8	陰性
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子	0.01	0.02	0.11	0.02	907.6	5.9	陰性
乾燥人フィブリノゲン	0.02	0.04	0.05	0.23	26.6	1.2	陰性

*1:トキシカラー(生化学バイオビジネス), カイネティック比色法(C+G因子)

*1: Kinetic-QCL(第一化学薬品), カイネティック比色法(C+G因子)

*3: ファンギテック GテストMK(生化学バイオビジネス), カイネティック比色法(G因子)

*4: トキシカラー/エンドスペシー(EU/mL)の比

表5. 各種の血液製剤のエンドトキシン発熱活性への影響

	n	体温上昇度(°C)		エンドトキシン 当量(EU)	発熱増強率	p-value ²⁾	増強/抑制
		Mean	SD				
生理食塩水	198	0.50	0.23	7	1.0	-	-
静注用人免疫グロブリン	90	0.27	0.18	2	0.3	2.9E-15	抑制
静注用特殊人免疫グロブリン	27	0.29	0.14	3	0.4	9.7E-06	抑制
筋注用人免疫グロブリン	81	0.26	0.16	2	0.3	5.8E-16	抑制
乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子	63	0.81	0.21	25	3.6	7.8E-20	増強
乾燥濃縮人血液凝固第IX因子	36	0.92	0.29	40	5.7	1.4E-19	増強
乾燥人フィブリノゲン	18	0.89	0.21	36	5.1	1.3E-11	増強
乾燥濃縮人アンチトロンビンIII	30	1.02	0.26	62	8.9	2.2E-25	増強
乾燥濃縮人活性化プロテインC	9	0.87	0.14	33	4.7	2.1E-06	増強
人ハプトグロビン	18	0.59	0.22	10	1.4	0.09	影響なし

1) 等量のエンドトキシンを添加(ウサギの体重1kgあたり10EUの投与量になるように添加)した生理食塩水または各種の血液製剤をウサギの静脈内に投与して、発熱反応を比較した。

2) 生理食塩水の体温上昇度に対する等分散を仮定した2標本によるt検定