

表6. 各種の血液製剤のエンドトキシン規格値の算定

	M値 ¹⁾		規格値 ³⁾	発熱増強率	補正規格値 ⁴⁾
	ヒト	ウサギ ²⁾			
静注用人免疫グロブリン	4ml/kg	10ml/kg	0.5EU/ml	増強なし	0.5EU/ml
静注用特殊人免疫グロブリン	1ml/kg	3ml/kg	1.7EU/ml	増強なし	1.7EU/ml
筋注用人免疫グロブリン	2ml/kg	1ml/kg	2.5EU/ml	増強なし	2.5EU/ml
乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子	33U/kg	50単位/kg	0.1EU/単位	3.6	0.03EU/単位
乾燥濃縮人血液凝固第IX因子	20U/kg	50単位/kg	0.1EU/単位	5.7	0.02EU/単位
乾燥人フィブリノゲン	2.5ml/kg	5ml/kg	1EU/ml	5.1	0.2EU/ml
乾燥濃縮人アンチトロンビンIII	60U/kg	3ml/kg	1.7EU/ml	8.9	0.2EU/ml
乾燥濃縮人活性化プロテインC	0.2ml/kg	3ml/kg	1.7EU/ml	4.7	0.4EU/ml
人ハプトグロビン	3.3ml/kg	5ml/kg	1EU/ml	増強なし	1EU/ml

1) 体重1kg当たり1時間以内に投与する注射剤の最大量。

2) 投与量の変更が提案されているものは、変更後の投与量。

3) K/M。K値は5.0EU/kgとして計算。

4) 規格値/発熱増強率

表7. 各種の血液製剤のMVDの試算とエンドトキシン試験法適用の可能性

カイネティック比濁法: $\lambda=0.02$

	補正規格値	MVD	必要希釈倍数 ¹⁾	適用可能性 ²⁾
静注用人免疫グロブリン	0.5EU/ml	25倍	4-8倍	可
静注用特殊人免疫グロブリン	1.7EU/ml	85倍	4-8倍	可
筋注用人免疫グロブリン	2.5EU/ml	125倍	8-64倍	可
乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子	0.03EU/単位	38倍 ³⁾	2倍	可
乾燥濃縮人血液凝固第IX因子	0.02EU/単位	25倍 ³⁾	2倍	可
乾燥人フィブリノゲン	0.2EU/ml	10倍	8倍	可
乾燥濃縮人アンチトロンビンIII	0.2EU/ml	10倍	64倍以上	不可
乾燥濃縮人活性化プロテインC	0.4EU/ml	20倍	2-4倍	可
人ハプトグロビン	1EU/ml	50倍	2倍	可

カイネティック比色法: $\lambda=0.005$

	補正規格値	MVD	必要希釈倍数 ¹⁾	適用可能性 ²⁾
静注用人免疫グロブリン	0.5EU/ml	100倍	4倍	可
静注用特殊人免疫グロブリン	1.7EU/ml	340倍	4倍	可
筋注用人免疫グロブリン	2.5EU/ml	500倍	4-8倍	可
乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子	0.03EU/単位	150倍 ³⁾	4倍	可
乾燥濃縮人血液凝固第IX因子	0.02EU/単位	100倍 ³⁾	4倍	可
乾燥人フィブリノゲン	0.2EU/ml	40倍	4-8倍	可
乾燥濃縮人アンチトロンビンIII	0.2EU/ml	40倍	256倍以上	不可
乾燥濃縮人活性化プロテインC	0.4EU/ml	80倍	4倍	可
人ハプトグロビン	1EU/ml	200倍	4倍	可

1) 反応干渉作用を打ち消すために必要な希釈倍数

2) MVD>必要希釈倍数ならば“可”とする

3) 試料濃度を25単位/mlとして算出

血液製剤に対する発熱試験法の見直し

第1回 メーカー・国立感染症研究所合同会議 議事要旨

日時：2005年12月2日（金）13:30-15:50

場所：国立感染症研究所村山庁舎第1会議室

出席者：今川義孝、只隈邦彦（化血研）、赤石暁弘（日本製薬）、難波眞樹、小林幸子（バクスター）、吉田典央（バイエル）、古山和弘、中川敏信、竹内繁美、後藤輝明（ベネシス）、勝林祥郎、外山幸司（日本赤十字）、池田清貴、因幡正代（ZLB ベーリング）、山口一成、浜口功、内藤 誠之郎、前山順一、益見厚子（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）（敬称略、順不同）

議事（司会：浜口）

1. 開会挨拶（山口）

この件に関して平成18年度、19年度の厚労科研費を申請しております。メーカー・感染研で協力して、スピード感をもって発熱試験法に関する懸案事項を解決してゆきたいと考えます。

2. 発熱試験法見直しの概要（内藤）

「見直し項目の概要」「検討の枠組み」「スケジュール」について、順次説明があった。

見直し項目：1. ウサギへの検体投与量 2. エンドトキシン試験法の導入

検体投与量の見直し：「臨床投与量」および「欧米基準」を参考に見直したところ、5品目（5%人血清アルブミン、静注用人免疫グロブリン、第Ⅷ因子、ハプトグロビン、フィブリノゲン）について投与量を改訂する必要が認められた。これらについては、バリデーション試験で確認後に改訂をしたい。

エンドトキシン試験の導入：すでにエンドトキシン試験が導入されている血液製剤以外のすべての血液製剤について、エンドトキシン試験の導入を検討する。そのために、「反応干渉因子試験」「発熱増強活性試験」を行なう。これらの検討により、エンドトキシン試験適用の可否の判断、規格値の設定を行ない、基準改正の提言をする。

検討の枠組み：感染研・メーカーで、共通のプロトコルを使って検討を行なう。メーカーは感染研にサンプルを提供する。得られたデータは感染研で取りまとめ、合同会議での検討の後に、基準改正の提言を行なう。

スケジュール：「投与量の変更」については1年程度、「エンドトキシン試験法の導入」に関しては、製造ロット数の多少により、1から2年程度の検討期間の後に、3回に分けて基準改正の提案をする。厚労科研費の研究期間である平成18年度・19年度の2か年で決着を着けたい。半年に1回程度、合同会議を開催する。

以上の説明に対して、基準改正の提案後、実際に基準が改正されるまでの期間について質問があった。これに対して、早くて半年だが場合によっては3回分をまとめて審議される可能性もあることが説明された。

3. 検討プロトコルの説明（内藤）

6月7日に各メーカーに郵送された要綱（「血液製剤の発熱試験におけるウサギへの検体投与量の見直し」「血液製剤に対するエンドトキシン試験法の適用の検討」）およびプロトコル（「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ル」「エンドトキシン試験（反応干渉因子試験）プロトコル」「発熱増強活性試験プロトコル」）について、かい摘まんでの説明があった。以下の3点について、プロトコルの

変更が提案された。

変更提案1：「投与量変更バリデーション」および「発熱増強活性試験」の本試験における注射後の測定時間を5時間から、3時間でもよいことに変更することが提案され、了承された。

変更提案2：「投与量変更バリデーション」および「発熱増強活性試験」において、予備試験によって「0.5℃発熱用量」と「1.0℃発熱用量」を各社で算出することになっていたところを、「0.5℃発熱用量→10EU/kg」「1.0℃発熱用量→40EU/kg」に固定して、各社共通にする。

この提案に対して、「変更してはうまく行かないメーカーがあるのではないか？」「容器への吸着のためか、感度が低い。使用する容器など細かい点まで各社共通にしてはどうか？」「予備試験の用量設定が対数等間隔の3用量以上としか記載されていないので、各社でまちまちの結果になるのではないか？」などの意見が出された。そこで、この件については、以下のように取り扱うことになった。

(ア) 10EU/kg、40EU/kg を含む3用量を用いた予備試験方法を感染研側から再提案する。

(イ) 10EU/kg、40EU/kg でうまく行きそうなメーカーは、この用量で本試験を行なう。

(ウ) 10EU/kg、40EU/kg ではうまく行かないメーカーは、個別に感染研と協議する。

(エ) 参考のために、感染研で行なった試験方法および材料について開示する。

変更提案3：エンドトキシン試験法で反応干渉が認められた場合の試験方法について、新たにプロトコールを定めた。これについては、検討結果の報告のなかで説明する。

4. 感染研での検討結果（報告）

(ア) 発熱試験（内藤）

5%人血清アルブミン、PEG 処理人免疫グロブリン、人ハプトグロビン、乾燥人フィブリノゲンの各1ロットについて、以下の試験を行なった。

1. 投与量の変更バリデーション

いずれの製剤でも新投与量での体温上昇は現投与量での体温上昇以上であり、投与量変更に伴う問題は観察されなかった。

2. 発熱増強活性試験

5%人血清アルブミンについては、明らかな発熱増強活性が認められた。他の製剤については、さらにデータを積み重ねる必要がある。

(イ) エンドトキシン試験（落合）

1. エンドトキシン試験（反応干渉因子試験）プロトコール（以下、通常プロトコールと呼ぶ）について説明された。

2. 感染研ではカイネティック比濁法—ES-III Test Wako（和光純薬工業）、カイネティック比色法—エンドスペシー（生化学工業）について検討を行い、製造所では上記のいずれかのライセート試験薬について検討を行うことが確認された。

3. これまでに感染研で実施した試験結果が報告され、一部の製剤で強い反応干渉作用が認められることが報告された。

4. 通常プロトコールの6. 反応干渉因子が認められた場合の、反応干渉作用が認められた製剤のエ

ンドトキシン試験プロトコル案（以下、干渉用プロトコルと呼ぶ）が提案され、通常プロトコルの最大希釈試料溶液においてエンドトキシンの添加回収率が50%未満の場合は、本プロトコルを適用することが確認された。

5. アンチトロンビンについては、反応干渉作用の存在が明らかなため、通常プロトコルは実施せずに干渉用プロトコルを適用することとした。また、アンチトロンビンについては、当面製造所では2～3ロットの製剤を用いて干渉用プロトコルにより反応干渉作用の除去が可能な希釈倍数を確認することとした。
6. 反応干渉作用の除去法については感染研で検討するが、製造所でアイデアがある場合は感染研に提案していただけるよう要望された。
7. 感染研の試験結果とこれまでに製造所から報告された試験結果は、よく一致していたことが報告された

(ウ) 培養細胞試験（山本）

1. 「血液製剤によるエンドトキシン生物活性への影響の評価」のタイトルで以下の内容について発表された。
2. 血液製剤をエンドトキシン試験に適用する場合、その規格値を算出するために製剤によるエンドトキシンへの増強作用を測定する必要があることが説明された。
3. その増強作用を、人でのエンドトキシンによる作用を反映できる測定系にて調べることは有用である。これに適用する測定系として、感染研にて開発された28SC細胞は、エンドトキシンに対し人末梢血と同様の反応性を有することがデータで示された。
4. 28SC細胞を用いて候補となる血液製剤によるエンドトキシンへの増強作用を測定し、エンドトキシン規格値を算出する方法について具体的に示された。
5. 現在までの検討の結果として、候補品となる血液製剤5種類各1ロットずつ用量を変えて28SC細胞でのエンドトキシンへの増強作用を測定したところ、乾燥人フィブリノゲン製剤が増強活性を示したことが説明された。

5. 次回会議予定

スケジュールのところで説明した通り、次回は6か月後、6月上旬に開催したい。

6. 閉会挨拶（堀内室長）

こうして協力してゆくことによって、迅速な問題解決につながると思いますので、よろしくお願ひします。データの解析には、Bioassay Assist というソフトウェアを無料で提供できますのでご相談ください。本日は、ありがとうございました。

血液製剤に対する発熱試験法の見直し第2回 メーカー・国立感染症研究所合同会議 議事要旨

日時：2006年7月11日（火）13:30-15:40

場所：国立感染症研究所村山庁舎第1会議室

出席者：今川義孝、只隈邦彦（化血研）、赤石暁弘（日本製薬）、白髭陽一（バクスター）、竹内繁美、村木一彦（ベネシス）、外山幸司（日本赤十字）、因幡正代（ZLB ベーリング）、山口一成、浜口功、内藤 誠之郎、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）

（敬称略、順不同）

議事**1. 開会挨拶（山口）**

感染研側では、今年度から厚生労働科学研究費補助金を得て、本格的に研究を開始しております。研究期間は本年度を含めて2年間ですので、この期間に十分なデータを得たいと考えております。メーカー側からの御協力もよろしくお願いいたします。

2. 各メーカーからの報告**（1）化血研（今川、只隈）**

乾燥スルホ化人免疫グロブリンの1ロット、1回の試験結果より、投与量の変更については、増量により発熱が上昇し、感度が良好となる傾向にあった。しかし、発熱増強活性については、データがばらついたため、傾向がつかめなかった。

（2）日本製薬（赤石）

社内的予備データは何回かおこないましたが、共通プロトコールに準じた正式な実験はこれからであります。また、お送りする検体の選択・収集をおこなっており、準備出来次第お送りいたします。ただし、製造ロット数の少ないものにつきましては数が揃ったものについて順次お送りする予定です。

（3）バクスター（白髭）

人血清アルブミン（5%）の投与量の変更につきまして、発表では、投与量3mL/kgを2006年12月、投与量10mL/kgを2007年1月に実施するように計画しておりましたが、会議での議論をふまえて投与量3mL/kgと10mL/kgを同一ロットで一度に試験を行うよう計画を変更いたします。試験は、トータルで3ロット、終了は2007年1月末を計画しております。

（4）ベネシス（竹内）**a) 投与量の変更**

検討した4品目（ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン、人ハプトグロビン、乾燥人フィブリノゲン、乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子）では、現行投与量以上の体温上昇を伴う発熱が惹起された。

b) 発熱増強活性

検討した7品目のうち3品目（乾燥人フィブリノゲン、乾燥濃縮人アンチトロンビンIII、乾燥濃縮人血液凝固第IX因子）では発熱の増強作用、3品目（人ハプトグロビン、乾燥濃縮人血液凝固第VII因子）は発熱への影響なし、残り1品目のポリエチレングリコール処理人免疫グロブリンは発熱の抑制作用を認めた。

c) 反応干渉因子試験

・検討した6品目のうち5品目（ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン、人ハプトグロビン、乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子、乾燥濃縮人血液凝固第IX因子）は2～16倍の希釈範囲内で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を平行線定量法により算出できた。

・乾燥濃縮人アンチトロンビンIIIは64倍まで反応干渉作用を認めた。

d) 今後の予定

未着手の残り5品目の発熱増強活性の検討及び残り6品目の反応干渉因子試験を本年12月までに完了し報告できるように致したい。

(5) 日赤（外山）

・ 投与量見直しの検討

第VIII因子製剤1ロットについて試験した結果、現行投与量と新投与量に有意な差を認めなかった。

・ 発熱増強活性試験

第VIII因子製剤、抗HBs人免疫グロブリン製剤 各1ロットについて試験した結果、どちらの製剤も生理食塩液と比較したところ有意な差を認めなかった。

・ 反応干渉因子試験

第VIII因子製剤4ロットについて試験した結果、すべての希釈点で平行性を認め、80%以上の回収率があった。

(6) ZLB ベーリング（因幡）

エンドトキシン試験反応干渉因子試験

・ 乾燥pH4処理人免疫グロブリン：10ロット全てにおいて平行性が成立し、回収率が50-200%の範囲内であった。（10ロット中2ロットについては、7月中に追加報告書を提出させていただきます。）

・ 乾燥濃縮人アンチトロンビンIII：3ロット全てにおいて平行性が不成立であり、また回収率は算出できなかった（3ロット全てにおいて、反応干渉作用が認められた）。→反応干渉作用が認められた製剤のエンドトキシン試験プロトコールに従い試験する（9月報告予定です）。

・ 抗破傷風人免疫グロブリン：未実施（9月中に2ロット分の試験を行なう予定です。）

発熱試験における投与量変更のバリデーション

・ 乾燥pH4処理人免疫グロブリン（3mL/Kg→10mL/Kg）：エンドトキシン20EU/kgにおける現行投与量と新投与量において、3ロット中2ロットで新投与量において発熱抑制の傾向が認められた。（現在有意差検定を含めたデータの確認をおこなっており、9月に報告書を提出する予定となっています。）

発熱増強活性確認試験

・ 乾燥pH4処理人免疫グロブリン：3ロット中1ロットで、エンドトキシン単独投与とエンドトキシン+製剤投与において、有意差があった（製剤による発熱抑制作用があった）。他2ロットについては、エンドトキシン単独投与とエンドトキシン+製剤投与における有意差は認められなかった。（9月に報告書を提出する予定となっています。）

・ 乾燥濃縮人アンチトロンビンIII：未実施

・ 抗破傷風人免疫グロブリン：未実施（2007年1月実施予定です）

3. 感染研からの報告

(1) 投与量の変更

感染研およびメーカーで実施した試験データを合わせて解析した。試験した製剤は、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、乾燥スルホ化人免疫グロブリン、乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン、乾燥 pH4 処理人免疫グロブリン）、乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子、乾燥人フィブリノゲン、人ハプトグロビン、人血清アルブミン（5%）である。検討したすべての製剤について、新投与量では、現投与量以上の体温上昇を伴う発熱が惹起された。したがって、投与量を増量するように変更することにより試験感度の向上を期待できると思われるが、今後さらにデータを集積する必要がある。

(2) 反応干渉因子試験

- これまでに試験した製剤（アンチトロンビン製剤を除く）は、最大でも 8-16 倍以上の希釈をすることで、反応干渉作用の除去が可能であった。エンドトキシン試験を適用するにあたり、反応干渉因子の問題は認められていない。
- これまでに報告していただいた製造所の成績は、感染研の成績とよく一致していた。
- アンチトロンビン製剤は、エンドトキシン試験に対する強い反応干渉（阻害）作用を有するが、限外ろ過及び加熱処理を組み合わせることで、反応干渉因子を除去し、製剤中のエンドトキシン測定の可能性が示された。
- 今後、感染研では引き続き、各製造所より提供していただいた製剤の反応干渉因子試験を実施する。また、アンチトロンビン製剤については製造所あるいはロットを増やして、上記の反応干渉因子除去法の有用性を確認する。各製造所では、反応干渉因子試験の実施、アンチトロンビン製剤については製造所やライセート試薬により反応干渉の程度に違いがあることが予想されるため、各製造所でも 1-2 ロットについて、反応干渉作用が認められた製剤のプロトコルにより、反応干渉作用の除去に必要な希釈倍数の確認をお願いしたい。
- また、発熱試験からエンドトキシン試験への代替には、製剤中に混入して実際に発熱を起こすエンドトキシン以外の発熱物質について確認しておく必要がある。そこで、これまでに製造過程あるいは最終製品において発熱試験で陽性が認められたもので、その原因がエンドトキシンの混入（エンドトキシン試験陽性）によるものであったか等の調査があれば報告していただきたい。

(3) 発熱増強活性試験

感染研およびメーカーで実施した試験データを合わせて解析した。試験した製剤は、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、乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン、乾燥 pH4 処理人免疫グロブリン、乾燥スルホ化人免疫グロブリン）、人免疫グロブリン、凝固因子製剤（乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子、乾燥濃縮人血液凝固第 IX 因子）、乾燥人フィブリノゲン、乾燥濃縮人アンチトロンビン III、人ハプトグロビンである。乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子、乾燥濃縮人血液凝固第 IX 因子、

乾燥人フィブリノゲンおよび乾燥濃縮人アンチトロンビン III は、エンドトキシンによる発熱を増強する傾向が認められ、増強率はそれぞれ 4.5、21、4.4、19 倍と算定された。静注用人免疫グロブリン製剤については、逆に発熱を抑制する傾向が認められた。人免疫グロブリンと人ハプトグロビンについては、影響は認められなかった。今後、未実施の製剤についてさらに解析を進める必要がある。

(4) 培養細胞試験

前回に引き続き「血液製剤によるエンドトキシン生物活性への影響の評価」を行った。今回は5社から提出された13種類32ロットの血液製剤について、ヒト株化細胞28SCにエンドトキシンと血液製剤を添加して18時間後の培養上清中のヒトIL-6産生量を定量した。その結果、9種類にエンドトキシンの生物活性の増強活性が認められた。しかし、ロット間の増強活性の差が認められたこと、また、発熱試験での結果とは必ずしも一致しなかったこと等があった。そこで、これらの製剤についてさらに試験を続けて管理手段を模索することが望ましいと考えられる。

4. 総括

以上の結果から、現時点では以下のように考えられる。

- 投与量の変更
投与量を増量することにより期待どおりの試験感度の向上を見込むことができる。
- エンドトキシン試験法の導入
 - アンチトロンビンを除いて、反応干渉による測定上の問題は見いだされていない。
 - アンチトロンビンについても、前処理により測定が可能かもしれない。
 - 凝固因子製剤、フィブリノゲンおよびアンチトロンビンについては、発熱増強活性に応じて規格値を補正することが必要と思われる。

別表に示すように順調にデータは集積しつつあるが、早期の発熱試験法の見直しを実現するために、今後もメーカーと感染研で協力して検討を進めて行くことが必要である。

以上

別表

試験進捗状況

2006.7.11

○: 3ロット以上実施 △: 3ロット未満実施

製剤名称	投与量 変更	エンドトキシン試験法の導入		
		反応干渉 因子試験	発熱増強 活性試験	細胞試験
人血清アルブミン(5%)	△			
静注用人免疫グロブリン製剤				
乾燥スルホ化人免疫グロブリン	△	○	○ 抑制?	○
乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン				
pH4 処理酸性人免疫グロブリン				
乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン	△	○	○ 抑制	○
ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン	○	○	○ 抑制	○
乾燥 pH4 処理人免疫グロブリン	△	○	○ 抑制	○
人免疫グロブリン		○	○	△
特殊人免疫グロブリン製剤				
抗 HBs 人免疫グロブリン		△		△
乾燥抗 HBs 人免疫グロブリン				
ポリエチレングリコール処理抗 HBs 人免疫グロブリン		△		△
乾燥抗 D(Rho)人免疫グロブリン				
抗破傷風人免疫グロブリン				
乾燥抗破傷風人免疫グロブリン		△		△
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		△		△
凝固因子製剤				
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子	○	○	○ 増強	○
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子		○	○ 増強	△
乾燥人血液凝固第Ⅸ因子複合体				
乾燥人フィブリノゲン	○	○	○ 増強	○
乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ		○ 強阻害	○ 増強	○
人ハプトグロビン	○	○	○	○
実施/未実施	8/2	14/6	10/10	14/6

血液製剤に対する発熱試験法の見直し第3回 メーカー・国立感染症研究所合同会議 議事要旨

日時：2007年2月15日（木）13:30-15:40

場所：国立感染症研究所村山庁舎第1会議室

出席者：只隈邦彦、矢上一英（化血研）、小林幸子（バクスター）、古山和弘、中川敏信、小野 豊、竹内繁美（ベネシス）、外山幸司（日本赤十字）、因幡正代（ZLB ベーリング）、浜口功、内藤 誠之郎、前山順一、益見厚子（感染研 血液・安全性研究部）、堀内善信、山本明彦（感染研 細菌第二部）

（敬称略、順不同）

議事

1. 各メーカーからの報告

（1）バクスター

アルブミンおよびイオン交換樹脂処理IGの各1ロットの投与量変更のバリデーションを計画している。また、それぞれ2ロットを感染研にサンプル提供する予定である。

（2）ZLB ベーリング

- a. 反応干渉因子 乾燥 pH4 処理 IG 10ロット、抗破傷風 IG 3ロットについては平行性が成立し回収率 50-200%であったことからエンドトキシン試験法の適用が可能と考えられた。アンチトロンビン III については強い反応干渉が認められた。
- b. 投与量の変更 乾燥 pH4 処理 IG において、両投与量での発熱反応に有意差は認められなかった。
- c. 発熱増強活性 乾燥 pH4 処理 IG において、3ロット中2ロットでは有意差なし、1ロットでは有意な低値を示した。したがって、乾燥 pH4 処理 IG には発熱増強活性はないと評価した。
- d. 今後の予定 アンチトロンビン III および抗破傷風 IG について発熱増強活性試験を行ない、4月以降に報告の予定。

（3）日本赤十字

- a. 発熱増強活性 第 VIII 因子および抗 HBs-IG 各 3ロット、pH4 処理酸性 IG 2ロットについて試験を実施し、第 VIII 因子および pH4 処理酸性 IG で有意な発熱増強、抗 HBs-IG で有意な発熱抑制を認めた。
- b. 反応干渉因子 第 VIII 因子 10ロット、抗 HBs-IG 1ロットについて試験を実施し、いずれも良好な添加回収率を得た。
- c. 投与量の変更 3月以降、第 VIII 因子および pH4 処理酸性 IG に対するバリデーションに着手する予定である。

（4）化血研

スルホ化 IG に対する投与量変更バリデーション、発熱増強活性試験、反応干渉因子試験を実施した。

- a. 投与量の変更 新投与量では現投与量以上の体温上昇が惹起された。したがって、投与量の増量により

試験感度の向上が期待できると考えられる。

- b. 発熱増強活性 試験した3ロットとも発熱抑制傾向を示し、1ロットでは有意な発熱抑制を認めた。
- c. 反応干渉因子 測定者/測定日を変えて測定した結果、日差変動は見られなかった。10ロットの測定では、添加回収率は53.4%-91.0%であった。以上より製剤中のエンドトキシンの定量は可能であると考えられた。
- d. 今後の予定 4月以降、第VIII因子に対する試験を開始し、順次他の製剤についても試験をしていく予定である。

(5) ベネシス

- a. 投与量の変更 PEG処理IG、ハプトグロビン、フィブリノゲン、第VIII因子に対してバリデーションを実施し、いずれも体温上昇が現行投与量<新投与量であり、これらの製剤については投与量を変更することに問題はないと考えられた。
- b. 発熱増強活性 PEG処理IG、IG、特殊IG5品目、第VIII因子、第IX因子、フィブリノゲン、アンチトロンビン、ハプトグロビン、以上12品目について試験を行った。グロブリン系の製剤は発熱を抑制する傾向があり、凝固因子系の製剤では発熱増強を認めた。
- c. 反応干渉因子 PEG処理IG、IG、特殊IG5品目、第VIII因子、第IX因子、フィブリノゲン、ハプトグロビン、以上11品目では、強い反応干渉は認められず、エンドトキシン試験法の適用が可能と考えられた。一方、アンチトロンビンでは強い反応干渉が認められたので、感染研のプロトコールにしたがって、限外ろ過と加熱を組み合わせた干渉因子除去を行った。その際サンプルリザーバーからの回収を「手振り」と「ボルテックス使用」の2種類の方法で行ったところ、それぞれエンドトキシン回収率の平均は165%と102%であった。
- d. 今後の予定 投与量変更のバリデーションは一通り完了している。発熱増強については6月までに完了の予定。反応干渉については全製剤で少なくとも2ロット以上のデータを得ているが、10ロットに満たない製剤についてはさらに試験を続行する。

2. 感染研からの報告

(1) 投与量の変更

投与量見直しの目的は、「発熱試験でのウサギへの検体投与量について、ヒトへの臨床投与量および欧米基準との整合性を図る」ことである。この目的にしたがって全血液製剤について調査したところ、アルブミン(5%)、IVIG、第VIII因子、ハプトグロビン、フィブリノゲンの5品目について、投与量を増量した方がよいと考えられた。そこで、メーカーと協力して共通のプロトコールを用いて、実際に投与量を増量することにより現投与量以上の体温上昇を示すようになるかを確認することにした。これまでに得られたメーカーのデータと感染研のデータを合わせて解析したところ、IVIG、第VIII因子、ハプトグロビン、フィブリノゲンについては、投与量を増量することにより有意に体温上昇が増加した。アルブミン(5%)については感染研での1ロットのみのデータであり、有意差は認められていない。アルブミン(5%)およびその他の品

目でまだバリデーションを実施していないメーカーの製剤については、さらに試験を実施する必要があるが、これまでのところ、投与量を増量することに問題はなさそうである。

(2) 発熱増強活性試験

この試験の目的は「血液製剤にエンドトキシン試験法を導入するにあたり、製剤によるエンドトキシン発熱活性に対する（増強の）影響を明らかにし、エンドトキシン規格値の設定に反映させる」ことである。発熱増強を評価するのに適当なエンドトキシン添加量として、予備試験により 10EU/kg を選定し、メーカーと感染研で共通のプロトコールを用いて試験を実施している。これまでに得られたメーカーのデータと感染研のデータを合わせて解析したところ、第 VIII 因子、第 IX 因子、フィブリノゲン、アンチトロンビンでは、4 倍から 20 倍のエンドトキシン発熱活性の増強が認められた。したがって、これらの製剤については発熱増強率に応じてエンドトキシン規格値を補正する必要があると思われる。一方、免疫グロブリン製剤（PEG 処理、pH4 処理、イオン交換樹脂処理、免疫グロブリン、抗破傷風、抗 D、PEG 処理抗破傷風、PEG 処理抗 HBs）では、エンドトキシン発熱活性の抑制が認められた。スルホ化-IG とハプトグロビンでは有意差が認められなかった。

(3) 反応干渉因子試験

実験動物を用いる発熱試験法（ウサギ）に替えて、精度、感度、再現性、簡便性などの点に優れたエンドトキシン試験法を導入することを目的に検討を行っている。検討項目の一つとして、各種の血液製剤のエンドトキシン試験に対する反応干渉作用を検討した。共通のプロトコールを用いて、メーカーと協力してカイネティック比濁法およびカイネティック比色法について反応干渉因子試験を実施した。これまでに得られたメーカーのデータと感染研のデータを合わせて解析したところ、一部のグロブリン製剤およびアンチトロンビンを除いて、カイネティック比濁法では 2-8 倍以上の希釈で、カイネティック比色法では 2-4 倍以上の希釈で、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を平行性定量法により算出できた。一部のグロブリン製剤については、カイネティック比濁法で測定した場合に反応阻害が認められたが、16 倍以上に希釈することにより除去が可能であった。感染研のデータとメーカーのデータを比較したところ、成績はよく一致していた。アンチトロンビンについては強い反応阻害が認められた。限外ろ過と加熱処理を組み合わせた方法により測定できる可能性があるが、プロトコールや測定施設の違いにより添加回収率に大きな差が見られるので、さらに検討が必要である。

(4) 培養細胞試験

製剤のエンドトキシン発熱活性に対する影響を評価する一環として、よりヒトでの反応性を反映する可能性がある系として、ヒト株化細胞 28SC からの IL-6 産生を指標とする方法を試みている。今回は 5 社 8 種類 11 ロットについて検討を行ない、2 種類（PEG 処理抗 HBs-IG、抗 D-IG）の製剤に増強活性を認めた。しかし、ロット間の増強活性の差が認められたこと、また、発熱試験での結果とは必ずしも一致しなかったこと等があった。そこで、これらの製剤についてさらに試験を続けて管理手段を模索することが望ましいと考え

られる。

3. 欧州での *in vitro* Pyrogen Test の開発状況

ヨーロッパでは、ウサギを用いる発熱試験法およびエンドトキシン試験法に替わる第3の発熱試験法として、全血やPBMC、モノサイト系の細胞株からのサイトカイン産生を指標とする発熱試験法 (*in vitro* Pyrogen Test) のバリデーションが進められている。ドイツのポール・エールリッヒ研究所で見聞した *in vitro* Pyrogen Test の開発状況について概説した。

4. その他

メーカーと感染研でさらに協力して試験を進め、厚労科研費補助金の研究期間が満了する2007年度末には基準化にむけて一定の結論を出すことを確認した。基準化の対象としては「投与量の変更」と「エンドトキシン試験法の導入」の2項目がある。また、対象となる製剤も多岐にわたるが、ある程度まとめて基準改正の提案するほうがよいとの意見が出された。

以上

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 ベーリング）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人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な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、感染研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。

エンドトキシン試験（反応干渉因子試験）プロトコール（2005.6.7）

1. 試験の概要

エンドトキシン試験法の適用を検討する製剤に、反応を促進または阻害する因子が含まれているかどうかを確認するために、反応干渉因子試験を行う。エンドトキシン添加及び非添加の製剤について2倍間隔で4濃度の希釈系列をつくって測定を行い、エンドトキシン標準品に対する相対力価として平行線定量法を用いて、それぞれのエンドトキシン濃度を算出する。エンドトキシン添加製剤で測定されたエンドトキシン濃度と非添加製剤で測定されたエンドトキシン濃度の差にもとづいて、添加エンドトキシンの回収率を計算する。添加エンドトキシンの回収率から、反応干渉因子の有無を判定する。

2. 試験ロット数

品目ごとに10ロット以上。

3. 材料

- ① ライセート試薬：カイネティック比濁法－Wako ES-III（和光純薬）またはカイネティック比色法－Endospecy（生化学工業）
- ② エンドトキシン 100 または 10000 標準品（日局）
- ③ エンドトキシン試験用水（日局）
- ④ 少なくとも 250℃で 30 分間の乾熱処理を行ったガラス製品、またはエンドトキシンが検出されずエンドトキシン試験に対する干渉作用のないことが確認されたプラスチック製品
- ⑤ 製剤（血液製剤）

4. 方法

1) エンドトキシン標準品の溶解

エンドトキシン標準品は室温にて溶解し、溶解後は4℃で冷蔵保存して14日以内に使用する。

○ 10000 標準品

10,000 EU/mL となるようにエンドトキシン試験用水を加え、vortex ミキサーで連続的に5分間攪拌することにより溶解し、10,000 EU/mL の標準品原液を調製

する。

○ 100 標準品

100 EU/mL となるようにエンドトキシン試験用水を加え、vortex ミキサーで連続的に2分間攪拌することにより溶解し、100 EU/mL の標準品原液を調製する。

2) 標準品原液の希釈

1) で調製した標準品原液について、下記の濃度段階に従って希釈系列を調製する。各希釈段階では vortex ミキサーを用いてよく攪拌する。作業はすべて氷上で行う。

○ 10000 標準品

10,000 EU/mL \Rightarrow 1,000 \Rightarrow 100 \Rightarrow 10 \Rightarrow 2 (ES-III 添加用) \rightarrow 1 \rightarrow

または \Rightarrow 1 (Endospecy 添加用) \Rightarrow 0.25 \rightarrow

○ 100 標準品

100 EU/mL \Rightarrow 10 \Rightarrow 2 (ES-III 添加用) \rightarrow 1 \rightarrow

または \Rightarrow 1 (Endospecy 添加用) \Rightarrow 0.25 \rightarrow

☆ 各ライセート試薬の標準品測定濃度 (6 濃度、EU/mL) :

Wako ES-III

1 \rightarrow 0.5 \rightarrow 0.25 \rightarrow 0.125 \rightarrow 0.0625 \rightarrow 0.03125

Endospecy

0.25 \rightarrow 0.125 \rightarrow 0.0625 \rightarrow 0.03125 \rightarrow 0.015625 \rightarrow 0.0078125

※希釈方法：10倍希釈の場合、エンドトキシン試験用水 900 μ L にエンドトキシン溶液 100 μ L を加えて 1,000 μ L とする。4倍希釈の場合、エンドトキシン試験用水 750 μ L にエンドトキシン溶液 250 μ L を加えて 1,000 μ L とする。2倍希釈の場合、エンドトキシン試験用水 500 μ L にエンドトキシン溶液 500 μ L を加えて 1,000 μ L とする (添加用の希釈液量等は適宜変更すること)。

3) 製剤の希釈

下記の濃度段階に従って希釈系列を調製する。各希釈段階では vortex ミキサーを用いてよく攪拌する。作業はすべて氷上にて行う。

○ Wako ES-III

試料溶液 (4 濃度) 単位 μL

製剤 500 μL をエンドトキシン試験用水 500 μL に加えて、2 倍希釈液を作製する。Vortex ミキサーを用いてよく攪拌した後、2 倍希釈液 500 μL をエンドトキシン試験用水 500 μL に加えて、4 倍希釈液を作製する。以下同様にして、8 倍希釈液、16 倍希釈液を作製する。

500 (製剤) - 500 (エンドトキシン試験用水) : 2 倍希釈液
 500 (2 倍希釈液) - 500 (エンドトキシン試験用水) : 4 倍希釈液
 500 (4 倍希釈液) - 500 (エンドトキシン試験用水) : 8 倍希釈液
 500 (8 倍希釈液) - 500 (エンドトキシン試験用水) : 16 倍希釈液

エンドトキシン添加試料溶液 (4 濃度) 単位 μL

製剤 500 μL に、2) で調製した添加用エンドトキシン希釈液 (2EU/mL) 250 μL 、エンドトキシン試験用水 250 μL を加えて、2 倍希釈液を作製する。Vortex ミキサーを用いてよく攪拌した後、2 倍希釈液 500 μL をエンドトキシン試験用水 500 μL に加えて、4 倍希釈液を作製する。以下同様にして、8 倍希釈液、16 倍希釈液を作製する。

500 (製剤) - 250 (2EU/mL*) - 250 (エンドトキシン試験用水) : 2 倍希釈液
 500 (2 倍希釈液) - 500 (エンドトキシン試験用水) : 4 倍希釈液
 500 (4 倍希釈液) - 500 (エンドトキシン試験用水) : 8 倍希釈液
 500 (8 倍希釈液) - 500 (エンドトキシン試験用水) : 16 倍希釈液

* 2) で調製した添加用エンドトキシン希釈液を用いる。

○ Endospecy

試料溶液 (4 濃度) 単位 μL

製剤 250 μL をエンドトキシン試験用水 750 μL に加えて、4 倍希釈液を作製する。Vortex ミキサーを用いてよく攪拌した後、4 倍希釈液 500 μL をエンドトキシン試験用水 500 μL に加えて、8 倍希釈液を作製する。以下同様にして、16 倍希釈液、32 倍希釈液を作製する。