

- 250 (製剤) — 750 (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
 500 (16倍希釈液) — 500 (エンドトキシン試験用水) : 32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 250 μL に、2) で調製した添加用エンドトキシン希釈液 (1EU/mL) 250 μL 、エンドトキシン試験用水 500 μL を加えて、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。

- 250 (製剤) — 250 (1 EU/mL*) — 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
 500 (16倍希釈液) — 500 (エンドトキシン試験用水) : 32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。

4) エンドトキシンの測定

2) および3) で作製した希釈系列について、下記の方法でエンドトキシンの測定を行う。

- Wako ES-III - カイネティック比濁法
- Endospecy - カイネティック比色法

測定にあたっての操作方法等は、用いる試薬の使用方法に従う。

5. 判定

生物学的製剤基準のエンドトキシン試験法に準じて判定する。すなわち、試料溶液及びエンドトキシン添加試料溶液のエンドトキシン量は、標準品に対する相対値として平行線定量法を用いて算出する。エンドトキシン標準品希釈液のエンドトキシン濃度及び試料溶液の希釈濃度は対数変換、Wako ES-IIIの比濁時間(min)は二重対数変換、Endospecyの吸光度変化率(mAbs/min)は対数変換して計算に用いる。エンドトキシン添加試料溶液のエンドトキシン量を計算する際には、各希釈濃度における反応干渉を考慮し、適当な希釈濃度を用いて計算する。たとえば、エンドトキシン標準液の検量線と希釈検体液の回帰直線に平行性が否定された場合は、ある希釈濃度を除いて再度統計処理する。試料溶液で測定されたエンドトキシン濃度とエンドトキシン添加試

料溶液で測定されたエンドトキシン量の差に基づいて、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が50～200%の範囲にあるとき、反応干渉因子が試料溶液に存在しないと判定する。

6. 反応干渉因子が認められた場合

製剤の最大有効希釈倍数（製剤の臨床最大投与量と発熱増強活性試験の結果から算定されるエンドトキシン暫定規格値とライセート試薬の感度から算出される）を考慮して、可能ならば製剤を更に希釈して試験を行い、反応干渉作用が除かれる希釈倍数を求める。このとき、試料溶液及びエンドトキシン添加試料溶液の最小希釈倍数は前回の測定で最大希釈倍数とした希釈倍数を用いて、エンドトキシン添加試料溶液の場合、この希釈液が、3) 製剤の希釈で最小希釈倍数液に添加したエンドトキシン濃度と等しいエンドトキシン濃度となるように調製し、2倍間隔希釈系列を作製する。

7. 試験結果の報告

試験結果については、報告書にまとめたものの他に、生データを本プロトコールで定めた形式に従いデータ入力用シート(Excel ファイル、別紙)に入力して提出する。

7. 試験サンプルの提出

感染研での試験の実施のために、メーカーで試験を実施したものと同一のロットの製剤を感染研に提出する。

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

人血清アルブミン、加熱人血漿たん白以外の血液製剤に対して、発熱試験の代替試験法としてエンドトキシン試験を適用できるかどうかを検討する一環として、反応干渉因子試験を実施する。

1. 試験の概要

エンドトキシン試験の適用を検討する製剤に、LAL 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。反応干渉因子試験は、人血清アルブミン及び加熱人血漿たん白で実施されている方法に準じて行う。すなわち、検討対象の製剤及びエンドトキシン試験用水に規定量のエンドトキシンを添加して2倍間隔で4濃度の希釈系列をつかって測定を行い、製剤の結果とエンドトキシン試験用水の結果を平行線定量法によって解析して、反応干渉因子の有無を判定する。

2. 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）

3. 方法

1) エンドトキシン標準品の溶解（室温にて溶解し、溶解後は 4℃で冷蔵保存する）

○ 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。

Wako ES-III

2) エンドトキシン標準溶液の調製方法 (氷上にて行う)

○ 10000 標準品

10,000 EU/mL ⇒ 1,000 ⇒ 100 ⇒ 10 ⇒ 1.25* (ES-III添加用)
⇒ 1

○ 100 標準品

100 EU/mL ⇒ 10 ⇒ 1.25* (ES-III添加用)
⇒ 1

☆ 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 → 0.5 → 0.25 → 0.125 → 0.0625 → 0.03125

3) 試料溶液の調製方法 (氷上にて行う)

試料溶液 単位 μL

500 (製剤) — 1500 (エンドトキシン試験用水) : 4倍希釈液 (希釈用)
1000 (4倍希釈液) — 1000 (エンドトキシン試験用水) : 8倍希釈液
1000 (8倍希釈液) — 1000 (エンドトキシン試験用水) : 16倍希釈液
1000 (16倍希釈液) — 1000 (エンドトキシン試験用水) : 32倍希釈液
1000 (32倍希釈液) — 1000 (エンドトキシン試験用水) : 64倍希釈液

エンドトキシン添加試料溶液 (最終濃度 0.125 EU/mL) 単位 μL

500 (4倍) — 100 (1.25 EU/mL*) — 400 (エンドトキシン試験用水) : 8倍
500 (8倍) — 100 (1.25 EU/mL*) — 400 (エンドトキシン試験用水) : 16倍
500 (16倍) — 100 (1.25 EU/mL*) — 400 (エンドトキシン試験用水) : 32倍
500 (32倍) — 100 (1.25 EU/mL*) — 400 (エンドトキシン試験用水) : 64倍

* 2) で調製した添加用エンドトキシン希釈液を用いる。

Endospecy

2) エンドトキシン標準溶液の調製方法 (氷上にて行う)

○ 10000 標準品

10,000 EU/mL ⇒ 1,000 ⇒ 100 ⇒ 25 ⇒ 6.25 ⇒ 0.625* (Endospecy 添加用)
⇒ 10 ⇒ 1 ⇒

○ 100 標準品

100 EU/mL ⇒ 25 ⇒ 6.25 ⇒ 0.625* (Endospecy 添加用)
⇒ 10 ⇒ 1 ⇒

☆ 各ライセート試薬の標準品測定濃度 (6 濃度、EU/mL) :

Endospecy

0.25 → 0.125 → 0.0625 → 0.03125 → 0.015625 → 0.0078125

3) 試料溶液の調製方法 (氷上にて行う)

試料溶液 単位 μL

250 (製剤) — 1750 (エンドトキシン試験用水) : 8 倍希釈液 (希釈用)
1000 (8 倍希釈液) — 1000 (エンドトキシン試験用水) : 16 倍希釈液
1000 (16 倍希釈液) — 1000 (エンドトキシン試験用水) : 32 倍希釈液
1000 (32 倍希釈液) — 1000 (エンドトキシン試験用水) : 64 倍希釈液
1000 (64 倍希釈液) — 1000 (エンドトキシン試験用水) : 128 倍希釈液

エンドトキシン添加試料溶液 (最終濃度 0.0625 EU/mL) 単位 μL

500 (8 倍) — 100 (0.625 EU/mL*) — 400 (エンドトキシン試験用水) : 16 倍
500 (16 倍) — 100 (0.625 EU/mL*) — 400 (エンドトキシン試験用水) : 32 倍
500 (32 倍) — 100 (0.625 EU/mL*) — 400 (エンドトキシン試験用水) : 64 倍
500 (64 倍) — 100 (0.625 EU/mL*) — 400 (エンドトキシン試験用水) : 128 倍

* 2) で調製した添加用エンドトキシン希釈液を用いる。

発熱予備実験プロトコール (2005.12.9)

「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」および「発熱増強活性試験プロトコール」における予備実験のプロトコールを以下のように変更する。

4. 予備実験 (エンドトキシン投与量の決定)

ウサギに 10EU/kg、40EU/kg、160EU/kg の量のエンドトキシンを静脈内注射して、発熱反応を測定する。

① エンドトキシン標準品の溶解

エンドトキシン 10000 標準品に 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。標準品は、室温にて溶解し、溶解後は 4℃ で冷蔵保存して 1 4 日以内に使用する。

② 標準品原液の希釈

標準品原液 (10,000EU/mL) を、生理食塩液で以下のように希釈する。

$$10,000 \rightarrow 1,000 \rightarrow 160 \rightarrow 53.3 \rightarrow 13.3 \rightarrow 3.3 \text{ (EU/mL)}$$

10X 3X 4X 4X

たとえば、体重 3kg 以下のウサギを使用する場合には、以下のように希釈すれば各濃度 3羽のウサギに投与するのに十分な量の希釈系列を作製できる。

$$10,000\text{EU/mL} \rightarrow 0.4\text{mL} \rightarrow 3.2\text{mL} \rightarrow 15\text{mL} \rightarrow 12\text{mL} \rightarrow 12\text{mL}$$

生理食塩液 3.6mL 16.8mL 30mL 36mL 36mL

(1,000EU/mL) (160EU/mL) (53.3EU/mL) (13.3EU/mL) (3.3EU/mL)

作業はすべて氷上にて行う。

③ ウサギへの投与

濃度 53.3EU/mL、13.3EU/mL、3.3EU/mL のエンドトキシン希釈液および対照として生理食塩液を、それぞれ 3羽のウサギに、体重 1kg 当たり 3mL の量を静脈内に注射する。

④ 体温の測定

検体の注射前に直腸体温を測定して、これを対照体温とする。さらに注射後 3 時間、少なくとも 30 分ごとにウサギの直腸体温を測定する。この測定値と対照体温との差を差体温とし、差体温の最大値をその試験動物の発熱反応とする。

⑤ エンドトキシン添加量の決定

エンドトキシン各希釈についての各 3羽のウサギの発熱反応を用いて最小自乗法により、対数エンドトキシン量に対する回帰直線を推定する。その回帰直線を

用いて0.5℃発熱用量および1.0℃発熱用量を有効数字1桁(例:5.3EU→5EU, 16EU→20EU)で推定する。推定した0.5℃発熱用量が5EU/kgから20EU/kg、1.0℃発熱用量が20EU/kgから80EU/kgの範囲にある場合には、0.5℃発熱用量を10EU/kg、1.0℃発熱用量を40EU/kgとみなして、各社共通の投与量で本試験を行なう。推定した用量が上記の範囲内に入らなかった場合には、感染研と協議して投与量を決定する。

以上

発熱増強活性試験プロトコール (2005.7.12)

1. 試験の概要

製剤の影響により、エンドトキシンによる発熱が増強される場合がある。このような発熱増強活性のある製剤にエンドトキシンが混入した場合、発熱増強活性のない製剤に混入した場合に比べて、より微量のエンドトキシンによって発熱反応が引き起こされることになる。本プロトコールは、エンドトキシンを添加した製剤をウサギに投与したときに惹起される発熱と、同量のエンドトキシンを生理食塩液に溶解して投与したときに惹起される発熱とを統計学的に比較して、試験対象製剤における発熱増強活性の有無を明らかにすることを目的とする。

2. 試験ロット数

品目ごとに3ロット以上。

3. 材料

- ① 体重 1.5kg 以上の健康なウサギ。エンドトキシンを投与されたことのある動物および試験品と共通の抗原物質を含む検体を投与されたことのある動物は用いない（生物学的製剤基準に準ずる）。
- ② エンドトキシン 10000 標準品（日局）
- ③ 生理食塩液（日局）
- ④ 発熱試験陰性の血液製剤

4. 予備実験（エンドトキシン添加量の決定）

本プロトコールにおけるエンドトキシン添加量としては、投与されたほとんどのウサギで有意な発熱（0.5℃以上の体温上昇）を示しはじめる程度の添加量が適切と考えられる。そこで、まず予備実験を行って、本実験で製剤に添加するエンドトキシン量を決定する。

① エンドトキシン標準品の溶解

エンドトキシン 10000 標準品に 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。標準品は、室温にて溶解し、溶解後は 4℃ で冷蔵保存して 1 4 日以内に使用する。

② 標準品原液の希釈

①で作製した標準品原液を、生理食塩液で 10 倍以内の希釈幅で希釈してゆき、ウサギに投与する対数等間隔の適当な希釈 3 用量以上を作製する。その際に、中点が 0.5℃程度の発熱が期待できる用量を選択する。作業はすべて氷上にて行う。

③ ウサギへの投与

作製したエンドトキシンの希釈液および対照として生理食塩液を、それぞれ 3 羽のウサギに、体重 1 kg 当たり 3mL の量を静脈内に注射する。

④ 体温の測定

検体の注射前に直腸体温を測定して、これを対照体温とする。さらに注射後 3 時間、少なくとも 30 分ごとにウサギの直腸体温を測定する。この測定値と対照体温との差を差体温とし、差体温の最大値をその試験動物の発熱反応とする。

⑤ エンドトキシン添加量の決定

エンドトキシン各希釈についての各 3 羽のウサギの発熱反応を用いて最小自乗法により、対数エンドトキシン量に対する回帰直線を推定する。その回帰直線を用いて 0.5℃発熱用量を有効数字 1 桁（例：5.3EU→5EU, 16EU→20EU）で推定し、本実験でのエンドトキシン添加量とする。

注：以上の予備実験は、投与量変更のバリデーション試験における予備実験と共通な方法です。投与量変更のバリデーション試験ですでに行っている場合には、繰り返す必要はありません。

5. 本実験

予備実験で決定した量のエンドトキシンを添加した製剤および生理食塩液をウサギに投与して、惹起される発熱反応を比較する。

① エンドトキシン標準品の溶解

エンドトキシン 10000 標準品に 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。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。

② 標準品原液の希釈

①で作製した標準品原液を、生理食塩液で 10 倍以内の希釈幅で段階希釈して、

予備実験で決定したエンドトキシン添加量の100倍の濃度のエンドトキシン溶液を作製する。作業はすべて氷上にて行う。

③ 検体へのエンドトキシンの添加

100倍濃度のエンドトキシン溶液を100倍希釈になるように製剤または生理食塩液に加えて、ウサギに投与する試料とする。

④ ウサギへの投与

エンドトキシンを添加した血液製剤およびエンドトキシンを添加した生理食塩液を、それぞれ3羽のウサギに、体重1kgあたり現行の生物学的製剤基準の投与量を静脈内に注射する。その際に、エンドトキシン添加量は0.5℃発熱用量となるように濃度を調整する。コントロールとして、生理食塩液のみを別の3羽のウサギに同様に注射する。

⑤ 体温の測定

検体の注射前に直腸体温を測定して、これを対照体温とする。さらに注射後5時間、少なくとも30分ごとにウサギの直腸体温を測定する。この測定値と対照体温との差を差体温とし、差体温の最大値をその試験動物の発熱反応とする。

⑥ 判定

エンドトキシンを添加した製剤を投与されたウサギで惹起された発熱反応と、エンドトキシンを添加した生理食塩液を投与されたウサギで惹起された発熱反応とを、統計学的に比較して、5%の危険率で有意差が認められない場合、製剤中には発熱増強活性は無いと判定する。発熱増強活性が有ると判定された製剤については、さらに詳細な検討を行って、発熱増強率を求める。

6. 試験結果の報告

試験結果については、報告書にまとめたものの他に、生データを本プロトコールで定めた形式に従いデータ入力用シート(Excelファイル、別紙)に入力して提出する。

7. 試験サンプルの提出

感染研での試験の実施のために、メーカーで試験を実施したものと同一のロットの製剤を感染研に提出する。

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 (2005.7.12)

1. 試験の概要

新投与量での試験が現行の投与量での試験と比較して、統計学的に同等以上の精度と感度を有することを確認するために本プロトコールを実施する。検討対象の血液製剤に低用量と高用量のエンドトキシンを添加して、エンドトキシン非添加の検体を含めて3用量の検体を、それぞれ新投与量および現行の投与量でウサギに投与して体温上昇度を測定する。新投与量での体温上昇度と現行の投与量での体温上昇度を統計学的に比較して、同等以上の精度と感度を有することを確認する。

2. 試験ロット数

品目ごとに、3ロット以上。

3. 材料

- ① 体重 1.5kg 以上の健康なウサギ。エンドトキシンを投与されたことのある動物および試験品と共通の抗原物質を含む検体を投与されたことのある動物は用いない（生物学的製剤基準に準ずる）。
- ② エンドトキシン 10000 標準品（日局）
- ③ 生理食塩液（日局）
- ④ 発熱試験陰性の血液製剤

4. 予備実験（エンドトキシン投与量の決定）

① エンドトキシン標準品の溶解

エンドトキシン 10000 標準品に 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。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。

② 標準品原液の希釈

①で作製した標準品原液を、生理食塩液で 10 倍以内の希釈幅で希釈してゆき、ウサギに投与する対数等間隔の適当な希釈 3 用量以上を作製する。その際に、中点が 0.5℃ 程度の発熱が期待できる用量を選択する。作業はすべて氷上にて行う。

③ ウサギへの投与

作製したエンドトキシンの希釈液および対照として生理食塩液を、それぞれ3羽のウサギに、体重1kg当たり3mLの量を静脈内に注射する。

④ 体温の測定

検体の注射前に直腸体温を測定して、これを対照体温とする。さらに注射後3時間、少なくとも30分ごとにウサギの直腸体温を測定する。この測定値と対照体温との差を差体温とし、差体温の最大値をその試験動物の発熱反応とする。

⑤ エンドトキシン添加量の決定

エンドトキシン各希釈についての各3羽のウサギの発熱反応を用いて最小自乗法により、対数エンドトキシン量に対する回帰直線を推定する。その回帰直線を用いて0.5℃発熱用量および1.0℃発熱用量を有効数字1桁(例:5.3EU→5EU, 16EU→20EU)で推定し、本実験での、現行の検体投与量でのエンドトキシン投与量とする。

注：以上の予備実験は、エンドトキシン試験の導入を検討する際の発熱増強活性試験での予備実験と共通な方法です。発熱増強活性試験で行っているならば、繰り返す必要はありません。

5. 本実験

予備実験で決定したエンドトキシン濃度(現行の投与量で投与した時に0.5℃発熱用量と1.0℃発熱用量となる濃度)となるようにエンドトキシンを添加した製剤およびエンドトキシン非添加製剤を、新投与量および現行の投与量で、それぞれ3羽のウサギに投与して、体温上昇度を測定する。

① エンドトキシン標準品の溶解

エンドトキシン10000標準品に10,000EU/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、10,000EU/mLの標準品原液を調製する。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。

② 標準品原液の希釈

①で作製した標準品原液を、生理食塩液で10倍以内の希釈幅で段階希釈して、予備実験で決定したエンドトキシン濃度(現行の投与量でウサギに投与し

た時に 0.5℃発熱用量と 1.0℃発熱用量となる濃度) の 100 倍濃度のエンドトキシン溶液を作製する。作業はすべて氷上にて行う。

③ 検体へのエンドトキシンの添加

100 倍濃度のエンドトキシン溶液を 100 倍希釈になるように製剤に加えて、ウサギへの投与試料とする。

④ ウサギへの投与

エンドトキシンを添加した製剤(2用量)とエンドトキシン非添加製剤を、新投与量および現行の投与量で、それぞれ3羽のウサギに静脈内注射する。

⑤ 体温の測定

検体の注射前に直腸体温を測定して、これを対照体温とする。さらに注射後5時間、少なくとも30分ごとにウサギの直腸体温を測定する。この測定値と対照体温との差を差体温とし、差体温の最大値をその試験動物の発熱反応とする。

6. 判定

新投与量での体温上昇度と現行の投与量での体温上昇度を統計学的に比較して、5%の危険率で同等以上の精度と感度を有することを確認する。

7. 試験結果の報告

試験結果については、報告書にまとめたものの他に、生データを本プロトコールで定めた形式に従いデータ入力用シート(Excel ファイル、別紙)に入力して提出する。

8. 試験サンプルの提出

感染研での試験の実施のために、メーカーで試験を実施したものと同一のロットの製剤を、感染研に提出する。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	題名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
前山順一	発熱試験法	生物学的製剤基準研究会	図説：生物学的製剤基準解説 2007年版	(株)じほう	東京	2007	263-266
落合雅樹、山本明彦、堀内善信	エンドトキシン試験法	生物学的製剤基準研究会	図説：生物学的製剤基準解説 2007年版	(株)じほう	東京	2007	243-244
浜口 功	加熱人血漿たん白	生物学的製剤基準研究会	図説：生物学的製剤基準解説 2007年版	(株)じほう	東京	2007	173-175
浜口 功	人血清アルブミン	生物学的製剤基準研究会	図説：生物学的製剤基準解説 2007年版	(株)じほう	東京	2007	176-177
山本明彦	血液製剤の発熱性物質管理	日本エンドトキシン研究会	エンドトキシン研究10 基礎と臨床の最新知見	医学図書出版(株)	東京	2007	51-58
内藤誠之郎	発熱性物質試験法	佐々木次雄、棚元憲一、川村邦夫	GMP微生物試験法	(株)じほう	東京	2008	in press

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	14	in press	2008

III. 研究成果の刊行物別刷

発熱試験法

概 説

ここに規定した試験法は、1969年に制定された生物学的製剤基準発熱試験法（昭和44年厚生省告示第378号）に採用された方法を踏襲したものであって、本質的な点は第15改正日本薬局方（日局15）に記載されている発熱性物質試験法と同様である。検体の注射量が異なっているが、日局14第二追補から判定方法において逐次検定法が採用されたため、大きな相違点はなくなった。注射量に関しては、1kgに対して10mLを限度として製剤ごとにヒトに対する接種量を考慮して検討する必要があるものと考えられる。

この基準の方法と日局15の方法の概要は表1のとおりである。差の理由については、それぞれ当該項を参照し、特に記載のないものは、日局15のように規定する必要を認めないもの、あるいは科学的常識に属するものとして省略している。

表1 生物学的製剤基準と日局15の発熱性試験の概要

	生物学的製剤基準	日局15
動物体重	1.5kg 以上	1.5kg 以上
使用前条件		1週間以上規定条件で飼育 試験前1～3日に注射を除く全操作を 含む偽試験
室温	前2日以上20～27℃ なるべく恒温恒湿	前48時間以上及び試験中20～27℃
温度計	0.1℃までの測温装置	0.1℃までの直腸体温計又は体温測定 装置
検体 (試験用量)	1kgにつき3mL 別に規定するものあり	1kgにつき10mL 同左
対照体温	注射前15分以内の体温 39.8℃を超えるときは使わない	40分前と10分前2回平均 同左
差体温	負のときは0とする	同左
判定法	逐次検定法（3回まで）	同左

発熱を引き起こす物質は多種あるが、いたるところに存在し、最も活性が高く、混入の可能性が最も高い発熱物質は、グラム陰性細菌由来の内毒素（エンドトキシン）である。そのために現在、発熱試験からエンドトキシン試験への転換が進められている。この試験は、検出感度及び精度に優れ、動物実験も必要ないが、検体中に含まれる可能性のある反応干渉因子を考慮して評価する必要がある。この点からヒトと同等の反応性を示すヒト培養細胞等を用いる方法が検討されている。一方で発熱試験は、内毒素以外の発熱物質も検出可能であること、反応干渉因子等によりエンドトキシン試験を適用できない場合に用いることができる

ことなどから、有用な試験法として現在も世界的に用いられている。

WHOの国際参照品に“Pyrogen”がある。これは1958年に採択されたもので、*Shigella dysenteriae*の精製O菌体抗原を含むと記載されている。国内では、エンドトキシン標準品として、日本薬局方エンドトキシン標準品を用いてエンドトキシン試験を行うと定められているが、発熱試験用の標準品は存在しない。しかしながら、発熱試験のバリデーション、例えば、異なったコロニーのウサギの発熱感受性を比較するような場合には、そのようなものがあるほうがよいと思われる。この場合の使用目的は、この「生物学的製剤基準」に規定されている他の参照品の使用目的とは必ずしも一致しないが、現状では、エンドトキシン試験用の標準品及びそれと同等のものを用いるのが比較するうえでも有用であろう。

解 説

1 動物

発熱試験陽性と判定された検体に使用された動物は、発熱物質に耐性となって、次に発熱物質を含む検体を注射しても発熱を示さない可能性がある。この耐性は時の経過とともに低下消失するが、その期間を定めがたいので、再使用はできないものとなっている。また、この規定では発熱陰性と判定される程度の量の発熱物質を含む検体であっても、反復注射すれば動物が発熱耐性になることがあるので注意しなければならない。

生物学的製剤は抗原性物質を含み、この物質によって動物が感作されるので、次に同一又は共通の抗原物質を含む検体を注射するとき、抗原抗体反応に基づくアナフィラキシー様ショック死、血圧・体温の下降などのショック様症状、あるいは遅延性過敏症の反応に伴う発熱などのために試験結果が混乱する危険性がある。したがって、生物学的製剤に関する限り、同じ動物を2回以上試験に使用しないほうが無難である。

試験に使用できる動物の対照体温は上限のみが規定されている。以前は下限も規定されていたことがあるが、少なくともそれを38.9℃とすることは意味がない。この下限の規定は、EPでは38.0℃であるが、USPなどでは行われていない。しかし、体温が極端に低い動物は健康とはみなしえない（実際に下痢、下血などの症状を示すものがある）ので、試験には使用すべきではない。また体温変動幅の大きい動物や、その他の異常を示す動物も同様である（通則33項（p12）参照）。

1969年まで実施されていた発熱試験法（人血漿基準付録A、昭和25年厚生省告示203号）に規定されていた予備体温の測定は、動物の健康管理に属するものであって、1971年基準改正以来規定されていない。しかし、通則33項の前段を満たしていることを確かめるためには、この予備体温の測定は当然実施すべきものと考えられる。また、局方にあるように、注射を除くすべての操作を含む偽試験を行い、試験に馴化するのは、本試験時での動物の興奮などによる試験結果の変動をより少なくするためにも必要である。

試験に使用する動物の飼育室及び試験を行う室の温度は20～27℃の範囲で、しかもできるだけ変動の少ないことが必要である（湿度については規定していないが、恒湿であることが望ましい）。室温が28℃以上又は17℃以下の場合は信頼できる試験成績が得られ

ない。また、ウサギは室温の変動にも過敏に反応し、試験の成績を乱すため、測定室と同じ環境条件の飼育室にあらかじめ一定期間飼育観察して、健康管理するとともに、環境に順応させることが必要である。

2 装置

測温装置には、水銀などを用いた膨張温度計、熱電対を使用した電気温度計などがあり、いずれでも0.1℃まで測定でき、3 操作の項に規定した方法で使用できる検定済みのものなら使える。ただし、標準温度計を用いて定期的に点検して、狂いのないことを確かめておかなければならない。また、あらかじめ直腸体温測定に要するその装置に固有な時間を求めておく必要がある。

内毒素などの耐熱性発熱物質を壊すために、必ず250℃で30分以上の加熱操作を行っておかなければならない。また、プラスチック製注射筒等を使用する場合は、発熱物質の汚染がないことはもちろんであるが、プラスチックへの発熱物質の吸着が多く認められるなどの本法に対する干渉のないことを確認する必要がある。

3 操作

動物は、4 判定の項に定めたように、1回に3匹ずつを用いる。試験を繰り返す場合も、そのたびごとに3匹を用いる。

ウサギに飼料を与えないのは、摂食に伴って体温が上昇する可能性があるからである。ウサギを固定するとき、拘束に対しても敏感に反応して試験結果を乱すことがあるから、拘束する場合にはできるだけ軽度にし、また、拘束後、動物が落ち着いてから試験を始める。その他、騒音や人の出入りなどが試験結果を乱すことがある。

測温装置の測温部分の直腸内への挿入の深さは、浅過ぎても深過ぎても体温の変化の測定には不適當である。60～90mmの範囲内で、なるべく一定の深さに挿入して測定することにより、再現性の高い測定結果を得ることができる。

この試験法は、主として内毒素などの細菌由来の発熱物質で、動物の発熱が検体注射後2～3時間以内に最高に達するような物質を対象にしている。「インフルエンザワクチン」「インフルエンザHAワクチン」に規定された発熱試験もその対象として細菌由来の内毒素を考えている（医薬品各条「インフルエンザワクチン」3.1.4 発熱試験の項（p 23）参照）

他の発熱物質を対象とする場合には、ここでの規定がそのまま適用できるとは限らないことも考えられる。

4 判定

この判定の方法は逐次検定法の方式を採用したもので、各回ごとに、それまでに使用された動物の発熱反応の総和の数の数値について表に従って陽性と陰性との別を判定し、中間の場合には試験を繰り返し、第3回の試験で、合計9匹の動物の発熱反応の和で最終の判定をするものである。

1969年まで実施されていた発熱試験法の判定にも繰り返し試験の規定があったが、その規定にはいささか不備な点があり、しばしば判定に疑義を生ずることがあったため、旧生物学的製剤基準発熱試験法（昭和44年厚生省告示378号）でこの逐次検定法が取り入れられ、以来これを踏襲している。

このような発熱試験における逐次検定法はBP、TSGRに採用されていた方法で、現在

のEPにも採用されており、判定の規定の根拠に動物の発熱反応の個体差をも組み込んであること、試験を繰り返した場合にそれまでの試験結果をすべて判定のよりどころにすること、判定に疑義を生ずる場合のないことなど、はるかに合理的である。

表2に規定した各試験回数ごとの陰性又は陽性判定水準の数値は、国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）における実験成績から計算された動物の発熱反応のバラツキ、及びBPの判定規定の各水準から逆に推定された動物の発熱反応のバラツキ（この推定値は前記の国立予防衛生研究所の実験値から得られた数値とほとんど一致した）並びに発熱試験陽性とみなす平均発熱反応などを参照して求めたものである。

参考までに、発熱試験陽性とみなす平均発熱反応の値を外国の規定と比較して次の表に示す。

表2 各国の平均発熱反応値の比較

	発熱試験陽性とみなす 平均発熱反応	判 定
生物学的製剤基準	0.56℃	最終判定 9匹合計 5.00℃
EP	0.55℃	〃 12匹合計 6.60℃*
USP	0.41℃	1回目3匹 (0.5℃及びそれ以上の上昇を示すウサギがあつてはいけない) 2回目5匹追加く合計3.3℃合格 (ただし0.5℃及びそれ以上の上昇を示すウサギが8匹中3匹より多くてはならない)

* 4回目に最終判定

[国立感染症研究所 血液・安全性研究部：前山 順一]