

エンドトキシン試験法

概 説

エンドトキシンは物理化学的性状が安定で、環境中に普遍的に存在し、ごく微量で発熱、ショック、免疫異常等を惹起することから、医薬品への混入は安全性にとって重要な問題となる。特に生物学的製剤は、生体内でエンドトキシンの活性増強を示す物質を含む場合がある。そのため少量のエンドトキシン混入であっても、ヒトで強い毒性を示す可能性が否定できない。エンドトキシンはウサギでの発熱試験、あるいはカプトガニ血球抽出物の高感度凝固を利用したエンドトキシン試験で管理されている。ただ、カプトガニ、ウサギ、ヒトでは各種のエンドトキシンに対する反応性や生物製剤の増強作用に対する反応性に違いがあり、安全性管理のためにはヒトのエンドトキシン反応性を反映した規格値が必要となる。将来的には、ヒト末梢血と相同の反応性を有する培養細胞などを用いた規格値設定を行う必要がある。

解 説

生物学的製剤のエンドトキシン試験には特異試薬を用いる。エンドトキシン特異試薬とは、カプトガニ血球抽出液の真菌細胞壁成分(1-3-β-D-glucan)との反応性を除去あるいは不活化し、エンドトキシン(LPS)との反応性のみを残した試薬である。エンドトキシンフリーの注射用水を用いてエンドトキシン標準品、検体の適当な段階希釈を作成する。希釈間隔及び希釈段階数(用量数)は、相対力価の信頼区間の式をもとに、より高い精度の測定値を効率よく得るように選ぶ。また、適当な濃度のエンドトキシン標準品を検体に添加したものを同様に希釈して測定し、測定値について有意な反応阻害がない(添加エンドトキシンの用量反応と一致する)ことを確認する。対数用量に対して直線性及び各用量での分散の一樣性が成立するように測定値について適当な変換を行い、平行線定量法によりエンドトキシン標準品に対する相対力価を計算し、その結果からエンドトキシン単位(EU)を求める。このとき、検体の反応が、例えば横軸にほぼ平行のように用量依存的でない場合、後述の反応干渉因子試験で反応干渉のみられない最大濃度の測定値を用い、その点を標準品と平行な用量反応線が通るものとして計算する。この場合、得られた結果の信頼区間の上限以下とするのが正確であるが、用量反応のみられない程度の含量であり、あえて信頼区間によらず得られた単位以下としても問題ないと思われる。規格値はあらかじめ測定値の変動を考慮してあり、結果が規格値を超えない場合に合格となる。

試験法

1) 反応干渉因子試験における阻害

特異試薬の場合でも生物製剤による阻害が見られる場合がある。この場合、混入エンド

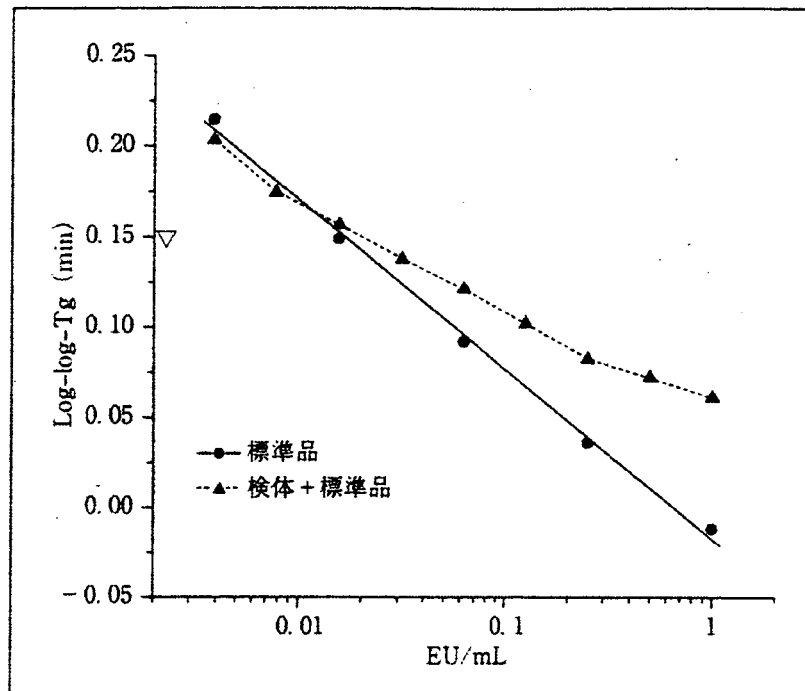


図1 比濁時間法における用量依存的阻害

トキシンが正しく検出できるのは、阻害のみられない用量範囲（図1で1/64希釈以降の3用量）のみということになり、検体のエンドトキシン含量も1/64希釈以下の濃度についての測定値から計算することになる。

また、添加エンドトキシンの回収率は、この範囲の結果により計算した値と添加エンドトキシンの比ということになる。こうした反応干渉作用は同一製剤でもロット毎に違いがみられ、試験時の反応阻害に関するバリデートが重要となる。

2) 試験法のバリデーション

反応干渉因子に関するバリデーションは、検体毎に必要となるので、試験時に行うほかない。また前述のように、カプトガニのエンドトキシン反応性はウサギやヒトと異なることから、安全性試験としては、ヒトのエンドトキシン反応性を考慮した規格設定が必要となる。ヒトのエンドトキシン反応性は末梢血で確認する以外にない。ただ実際には反応性に大きな個人差がある。しかし、各種エンドトキシンに対する反応性を、例えば標準品のような特定のエンドトキシンに対して相対的に評価することにより個人差が消去できる。こうしてさまざまな由来の異なるエンドトキシンに対して、ヒト末梢血と相同の反応性を示す培養細胞が同定できた。

今後、こうした測定系を用いた評価により、エンドトキシン試験や発熱試験のエンドトキシンの規格をより副反応の制御のような臨床面の安全性向上に結びつけるための検討が望まれる。

[国立感染症研究所 細菌第二部：堀内 善信]

加熱人血漿たん白

概 説

【製剤について】 本剤は、本質的にはアルブミン製剤と考えてよい。BPではPlasma Protein FractionのほかHuman Albumin Fractions (Saline)という別名も掲げられている。BPの定義は次のとおりである。

“Plasma Protein Fraction is a solution of the proteins of liquid human plasma, containing albumin and globulins that retain their solubility on heating. It exerts a colloid osmotic pressure approximately equivalent to that of pooled human plasma containing 5.2 percent w/v of protein; it contains no fibrinogen or antibodies.....”

この定義からも、本剤の第一の使用目的が血漿浸透圧の維持であることが知られよう。

また、現在の製造工程ではヒトパルボウイルスB19等のウイルスを完全に不活化・除去することは困難であり、感染症伝播の危険性を完全に排除することはできない。

【適応症】 アルブミンの喪失（熱傷、ネフローゼ症候群など）及びアルブミン合成低下（肝硬変など）による低アルブミン血症、出血性ショック（「人血清アルブミン」（p176）参照）。

解 説

1 本質及び性状

ヘム含量の少ない精製度の高い製品は、黄色傾向にあり、高品質であるため、色調に関する記載が「黄色ないし黄褐色」に変更された。

2 製法：2.3 最終バルク及び小分

安定剤の濃度とその組み合わせについて、改正前は詳細に規定されていたが、より優れた配合への変更若しくは新規安定剤の導入の妨げとなるのを避ける目的で、現行の「原画分に適当な安定剤、等張化剤等を含む液を加えて最終バルクを作り、分注する。最終バルク工程又は分注後直ちに60.0±0.5℃で10時間以上加熱する。この際、アルブミン濃度が4.4w/v%以上になるようにする」と変更された。

3 小分製品の試験

「振とう試験」は、現在の技術レベル並びに工程管理による品質保証から振とう試験で不合格となる可能性はない、との判断から削除された。また「異種たん白否定試験」も、改正前の「その他の動物種」の表現では不適切であり、採血管理及びGMPの管理体制で異種動物のたん白が混入する可能性はない、との判断から削除された。「熱安定性試験」は現在の技術レベル並びに工程管理による品質保証から熱安定性試験で不合格となる可能性はないとの理由により削除された。

3.2 カリウム含量試験

カリウム塩は、採血後赤血球から血漿中に移行する。保存血液では血漿カリウム値は1日約1mMの割合で上昇し、採血後21日で約23mMに達する。WHO基準は本剤と人血清アルブミンのカリウム濃度の上限をいずれも2mMと規定し、CFRは本剤について同じく2mEq/L以下と規定しており、これらの値(0.0782mg/mL以下)はこの基準の値(0.1mg/mL以下)より厳しい規格といえる。

3.3 ナトリウム含量試験

もとは1mL中に3mg以下という規定であったが、のちに1mL中に3.7mg以下で、かつ表示量の90～110%という規定となり、今回の基準改正により、「表示量の90～110%」が削除された。

3.4 塩素含量試験

濃度の規定のない規格は意味がないとの理由により、塩素含量試験の対表示量の規定が削除された。

3.5 ヘム含量試験

この試験は、この生物学的製剤基準の各条医薬品のうち、本剤と「人血清アルブミン」だけに規定した。

これらの製剤又は両製剤では、製造に加熱などの操作が行われるため、ヘモグロビンはヘムとグロビンとに分かれたのち、ヘムがアルブミンと結合してヘマルブミンなどの形をとっていることが多いので、ヘモグロビン分子としてではなく、ヘムとして測定することにした。

一般試験法のヘム定量法に規定する条件〔E₄₀₃(403nm)〕=0.25は、アルブミン1gにつきヘム0.185mgに相当する。

両製剤とも、アルブミンがビリルビンその他の物質と結合する性質を持つことを利用して解毒などの目的に用いられることがあるが、アルブミンが初めからヘムと結合した状態にあれば、他の物質と結合する活性はそれだけ乏しくなるはずであり、その意味でヘム含量が多いことは好ましくない。

従来の原血漿についてのヘモグロビン含量の規定は除かれた(一般試験法A「ヘム定量法」(p268)参照)。

3.6 アルブミン含量試験

表示のアルブミン含量が2.3最終バルク及び小分の項に定めた最低濃度である1mL中44mgの場合は、実測値がその90～110%、すなわち39.6～48.4mg/mLであれば適合とする。

もとは(昭和35年厚生省告示第117号)、アルブミン含量を直接に規定せず、総たん白質量が100mL中5.0±0.3g、総たん白質の80%以上がアルブミンであることを定めていたが、当時の製品のアルブミン含量の平均値が44.36mg/mLで、大部分は39.6～48.4mg/mLの範囲にあったことを参考としてこの基準の規定が設けられた。純度の下限の規定は従来の80%がなお踏襲されているが、実際の製品では87～88%か、あるいはそれ以上である。BPは概説で述べたように、たん白質量が5.2w/v%の血漿と同等の膠質浸透圧を示すことのほか、本剤のたん白質量を

4.3w/v%以上と規定している。

基準では、たん白窒素定量法で総たん白質量を求め、それに電気泳動試験法におけるアルブミン画分の比率を乗じてアルブミン含量を求めるように規定している。

3.7 同定試験

免疫電気泳動法で異常な沈降線という中には、製剤の本質に基づくものは含まない。しかし、正常の人血漿たん白質でも、製剤中に含まれていてはならない成分の沈降線は、異常な沈降線とみなす。例えば、3.6の「免疫グロブリンG画分は総たん白質の1%を著しく超えてはならない」という規定には適合していても、免疫グロブリンGの沈降線が明瞭に認められることは望ましくないといえる。

5 その他：5.2 添付文書等記載事項

本剤は、その性状として「澄明な液剤」と述べられているため、過去にはこの性状の記載を満たしていないという理由で、国家検定に不合格とすべきか否かの判断が論議をよんだ。BPはPlasma Protein FractionのDescriptionとして“An amber liquid which may produce a slight deposit on storage”と記載している。この添付文書の記載事項は使用時の判断が医師に任されていることを明らかにしたものである。

[国立感染症研究所 血液・安全性研究部：浜口 功]

人血清アルブミン

概 説

【製剤について】 もとの製剤では（昭和35年厚生省告示第117号）、アルブミン濃度が20w/v%以上のものだけであったが、この基準では5w/v%のものと20～25w/v%のものとの2種類を規定した。したがって、低濃度のアルブミン製剤は、5w/v%の「人血清アルブミン」と4.4w/v%以上の「加熱人血漿たん白」の二本立てとなった。

また、現在の製造工程ではヒトパルボウイルスB19等のウイルスを完全に不活化・除去することは困難であり、感染症伝播の危険性を完全に排除することはできない。

【適応症】 アルブミンの喪失（熱傷、ネフローゼ症候群など）及びアルブミン合成低下（肝硬変など）による低アルブミン血症、出血性ショック。

本剤及び加熱人血漿たん白、すなわちアルブミン製剤は血液製剤の中で、過剰使用と製剤及び原料血漿の形での輸入への依存が最も問題になっている製剤である。そのため厚生省の委託を受けた血液事業検討委員会は、1986年6月に適正使用のガイドラインを公表した。それによると、アルブミン製剤は急性の低たん白血症などに用いることを基本方針とし、適正な使用例として、出血性ショック、外傷性ショック、熱傷などをあげ、一方、「不適正な使用」として単なる栄養補給に用いたり、赤血球の再浮遊メデイウムとして用いることがあげられている。詳細は同委員会第二次中間報告及び第33回日本輸血学会総会におけるD. W. Huestisの特別講演 The Usage of Plasma and Albumin（日本輸血学会雑誌、第31巻第5号p 398, 1985年）を参照されたい。

解 説

1 本質及び性状

本剤では澄明度が問題になったことはあまりないが、外国では色調が問題にされたことがあるようである。BPはAlbuminのDescriptionとして、“A clear liquid. The colour ranges from amber to deep orange-brown with increasing protein concentration”と述べている。Cohnの冷エタノール法以外の製法で製造された場合、胆汁色素による緑色の色調を帯びたもの、あるいは暗褐色（通称コーラ色）の製品も認められたというが、わが国でそのような例に遭遇したことはない。またヘム含量の少ない精製度の高い製品は、黄色傾向にあり、高品質であるため、色調に関する記載が「黄色ないし黄褐色」に変更された。

2 製法：2.3 最終バルク及び小分

安定剤の濃度とその組み合わせについて、改正前は詳細に規定されていたが、より

優れた配合への変更若しくは新規安定剤の導入の妨げとなるのを避ける目的で、現行の「原画分に適当な安定剤、等張化剤等を含む液を加えて最終バルクを作り、分注する。最終バルク工程又は分注後直ちに $60.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で10時間以上加温する。この際、アルブミン濃度が5あるいは20～25 w/v%になるようにする」と変更された。

3 小分製品の試験：3.2 ナトリウム含量試験

もとはアルブミン1gにつき14mg以下と規定されていたが、アメリカでCFRに定められた130～160mEq/Lという規格に合わせる必要が生じたため、昭和53年厚生省告示第125号によって、本剤及び加熱人血漿たん白のナトリウム含量を「1mL中に3.7mg以下で表示量の90～110%」と一律に規定した。更に、今回の基準改正により「表示量の90～110%」が削除された。WHO基準も160mM以下という上限規定のみである。

3.3 塩素含量試験

濃度の規定のない規格は意味がないとの理由により、塩素含量試験の対表示量の規定が削除された。

3.4 ヘム含量試験

「加熱人血漿たん白」3.5 ヘム含量試験の項 (p174) 参照。

3.5 アルブミン含量試験

もとはアルブミンは総たん白質の97%以上という規定であったが、諸外国並みに96%以上に改めても製品の品質に本質的な影響はないという理由で、現行のように改められた。

3.9 発熱試験

発熱試験の項目の中に、エンドトキシン試験法が含まれる。エンドトキシン試験法は1980年代に加納、赤間らにより導入が試みられ、1993年より生物学的製剤基準に記載されている。エンドトキシン活性定量のために用いられる平行線定量法とは、試験の度ごとに測定値が変動する場合に、標準品と検体（試験品）の活性を同時に測定し、検体の活性量を標準品に対して測定することにより、制御が困難な測定値変動を除こうとするものである。

4 貯法及び有効期間

従来は本剤の貯法には通則33が適用され、常温保存は認められていなかったが、製造者の長期安定性試験の成績を認めて、貯法を 30°C 以下、有効期限は3年から2年に改められた。したがって、「加熱人血漿たん白」との間に差異はなくなった。更に、今回の基準改正で貯法は室温とされた。

[国立感染症研究所 血液・安全性研究部：浜口 功]

1. 血液製剤の発熱性物質管理

山本 明彦

国立感染症研究所・細菌第二部

はじめに：血液製剤における発熱性物質管理の歴史

不活化細菌ワクチンは、1896年にドイツの Pfeiffer と Kolle およびイギリスの Wright らによって同時期に、加熱処理チフス菌ワクチンとして作製されたのが最初である。このワクチンのヒトへの接種により、特異抗体の産生を証明したことによってヒトへの実用化が始まった¹⁾。チフス菌ワクチンの作製以降から1920年頃までは、加熱死菌ワクチンが数多く作製された。当時は Pasteur らの *in vitro* 長期継代による弱毒化生ワクチンも作製され、これらの投与によって細菌感染症に対して劇的な予防効果が示された²⁾。しかし感染症の予防効果が期待されるワクチンの投与によって、投与後に発熱が惹起されるという新たな問題が生じた。すなわち感染した細菌が体内で増殖して生じると考えられていた発熱が、死菌ワクチンの投与によっても起きることが示された³⁾。さらに同時期に、静脈注射の普及に伴い、生理食塩水、ブドウ糖注射液などの静脈注射により、注射後30～60分にしばしば悪寒戦慄を伴う発熱現象が認められた。その原因として細菌汚染の可能性が指摘され、1923年に Seibert によって汚染細菌の代謝産物が原因であり、ウサギを用いてこの細菌代謝産物の発熱活性を測定できることが報告された⁴⁾。この死菌ワクチンや生理食塩水、ブドウ糖注射液などによる発熱の原因は、これらに含まれていたグラム陰性菌の細胞膜に由来する耐熱性毒素によることが確認された。これが「身体を燃やす物質」という意味のピロジェンまたは発熱性物質と呼ばれるようになった⁵⁾。薬

剤の発熱性物質管理は、1942年米国薬局方にウサギ発熱試験法が採用されたことに始まった⁶⁾。

日本においては1969年の「生物学的製剤発熱試験法」の厚生省告示によって、生物学的製剤基準にウサギ発熱試験法が記載されたことに始まった⁷⁾。この試験法は、1923年に Seibert が報告した発熱性物質の感受性が強い実験動物であるウサギを用いて、その体温上昇を発熱物質測定法に応用したものである⁴⁾。この試験法を用いてほとんどの血液製剤に含まれる発熱物質の測定が長年なされてきた。この試験法に対して、最近その代替法として *in vitro* pyrogen test (IPT) が欧米で提唱されるようになった。本稿では、この代替法の概要と問題点を述べ、昨年より日本で試みられている代替法を紹介する。

1. ウサギ発熱試験法の問題点

血液製剤の安全性試験として長年行われてきたウサギ発熱試験法は、1群3匹のウサギにそれぞれの血液製剤を定められた投与量を静脈注射し、注射後3時間直腸内温度を計測して注射前と比較して発熱性物質の混入を測定する方法である。製剤1ロットに3匹のウサギを用いるため、多くの動物を長時間拘束する試験法である点から欧米を中心とする動物愛護運動の標的とされ、また発熱性物質の検出感度が悪い点も問題とされた。

動物実験を減らすための動物実験代替法開発は、欧米では早くから始められた。EU議会は動物愛護運動と動物実験に対する反対運動の高まりに対応して、代替法開発の拠点とし、代替法評価の調整や代替法についてのデータベースを構築・維持するため、また、行政、産業、生物・医学分

野の科学者、消費者、および動物愛護運動グループの対話を促進することを目的に1991年に代替法バリデーションセンター (European Centre for the Validation of Alternative Methods: ECVAM) を設立した。アメリカでは1994年に同様の組織がICCVAMとして発足した。ウサギ発熱試験法は、これらの組織による代替法のバリデーションの標的として、*in vitro* 試験法への切り替えが提案された⁹⁾。実際には、今後欧州薬局方への掲載が決定した後に試験が実施されるが、欧米での合意がなされることにより実際の血液製剤の発熱性物質の測定法の代替法として採用される可能性が高い。

ウサギ発熱試験法は、前述のように静脈より投与される薬品中の発熱性物質の測定法として1923年に開発され、1942年に薬局方に収載されて実施されてきた方法である。当時は、発熱性物質の主要成分であるエンドトキシンの存在が不明な時期であった。その後、この試験のエンドトキシン検出感度がヒトに発熱を引き起こす最低限のエンドトキシン量である約5エンドトキシン単位 (Endotoxin Unit: EU)/kg であり、検出感度が低いことが明らかにされた。また1群3頭のウサギを用いることになっており、ウサギの個体差や実施施設ごとの飼育環境の相違などの条件が統一できず、またこれらの検出感度や再現性に影響を与える可能性がある。さらにその測定精度自体も低いという報告がある¹⁰⁾。ウサギ発熱試験法の測定精度向上のために、1群の頭数を増加することが必要であるが、実験施設を増設しなければならず多くの制限があり、また多くのウサギを用いることは動物愛護と倫理の観点から、困難である。この試験を代替法に置き換えることによって、EUだけで年間約20万頭ものウサギの使用を減らすことが出来ると予想されている⁹⁾。

一方、以上述べてきたウサギ発熱試験法で測定してきた発熱性物質の主要成分として、エンドトキシンが挙げられる。20世紀半ばからの Westphal⁵⁾ に始まるエンドトキシン研究の中で、その多彩な作用の解析が進み、活性を担う Lipid A 構造が判明した。また近年、エンドトキシン受容体やシグナル伝達経路解析等にめざましい進

展が見られる。測定法に関しては、Levin および Bang の発見したカプトガニ血球抽出液 (Limulus Ameabocyte Lysate: LAL)¹¹⁾ を用いた検出法 (LAL 試験法) とその改良により、エンドトキシンの高感度、高精度測定法が確立し¹²⁾、広く普及してきた。その後、世界の主要な薬局方に収載され、近年、日、米、欧で薬局方エンドトキシン試験法 (LAL 試験法) の国際調和が図られた。

日本においては血液製剤の発熱性物質測定は、ウサギ発熱試験法を用いて行われてきた⁷⁾。このうちのヒト血清アルブミンと人血漿蛋白の2製剤は1996年より、LAL 試験法に代替されて現在まで問題なく管理されている^{13,14)}。

2. 海外 (ECVAM, ICCVAM) から提唱された代替法とその問題点

EUにおいては、血液製剤の発熱性物質の測定法としてLAL 試験法が導入されなかった。ここで、LAL 試験法は、エンドトキシンを特異的に検出する方法として改良されてきた。ところが、血液製剤中に混入されるおそれのある発熱性物質の主要成分はエンドトキシンであるが、それ以外にも細菌由来ではペプチドグリカン (Peptidoglycan: PGN) や β -glucan などの成分が活性は弱いが含まれている。LAL 試験法では、エンドトキシン以外の発熱性物質の測定が出来ないことと、この試験法は酵素を用いたカスケード反応であり、阻害物質によって反応阻害が起きやすいため、血液製剤の発熱性物質の測定には適さないとの結論を ECVAM が下した⁹⁾。

さらに、ウサギ発熱試験法の測定原理である発熱は、近年そのメカニズムが明らかにされてきた。すなわち、発熱は発熱性物質が体内に取り込まれ末梢血中の単球から炎症性サイトカインの産生と分泌を促す。このサイトカインが血液を介して視床下部などの生体反応を調節する中枢に運ばれて刺激をすることにより、プロスタグランジン E₂ の分泌を促す。この濃度上昇が、発熱中枢を刺激することによって発熱を誘起する¹⁵⁾。この発熱性物質の標的細胞である単球、マクロファ-

ジ、血管内皮細胞、好中球等のマウスやヒトの株化細胞を用いて、エンドトキシン刺激後の培養上清中のサイトカイン、ケモカイン等のメディエーターやその mRNA の測定およびエンドトキシンの誘導する一酸化窒素の定量、さらにウサギやヒトの末梢血液を用いた同様のメディエーターの定量等が報告されている^{16,17)}。前述の欧州の動物実験代替法の評価機関である ECVAM は、ヨーロッパ連合 (EU) 25 カ国の共同体であるが、これらの中から 5 つの方法を評価し IPT として提案した^{8,9)}。IPT は、この発熱の原理を応用してヒト末梢血およびヒト単球由来の細胞株 MM6 を用いてそこに発熱性物質を加えて一定時間培養し、その培養上清中に産生される炎症性サイトカインとして Interleukin 1 beta (IL-1 β) または Interleukin 6 (IL-6) を定量する方法である¹⁸⁻²⁰⁾。

具体的な IPT の実施方法としての SOP が提案されている²¹⁾。その内容は、IPT は、1) ヒト末梢血での IL-1 β 産生、2) ヒト末梢血での IL-6 産生、3) ヒト末梢血単球での IL-6 産生、4) ヒト由来細胞株 MM6 での IL-6 産生と 5) 凍結ヒト末梢血による IL-1 β 産生の 5 種類である。エンドトキシンを 0.5、1.0、2.0 EU/ml の 3 用量加えて刺激する。これによって産生される IL-1 β または IL-6 を ELISA 法にて定量し標準とし、検体によるサイトカイン産生量がエンドトキシン 0.5 EU/ml によるサイトカイン産生量よりも低ければよいとする限度試験法を提唱している^{8,9)}。

このように IPT として提案されている 5 つの方法のうち 4 つはヒトの血液を用いている。血液を用いる測定法は、いくつかの問題点が存在する。それは、1) 同じ量のエンドトキシン刺激による炎症性サイトカイン産生量に、個人差があり大きいこと。我々は、この点について、エンドトキシンを段階希釈してヒト末梢血に添加し、培養上清の Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)、IL-6、IL-1 β 量を、それぞれ標準品を用いて平行線定量法により定量した。その結果、試験に供した 5 人の末梢血液の反応性には同じエンドトキシンによる刺激で最大 4 倍の個人差がみられた。サイトカイン産生量は著しく個人の感受性の

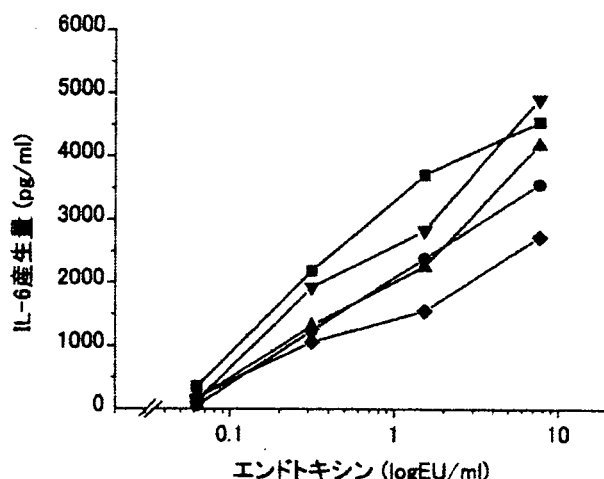


図1 ヒト末梢血のエンドトキシン刺激によるヒト IL-6 産生

影響を受け、必ずしもエンドトキシン活性のみを反映しない (図1)。2) したがって、使用するヒトの血液によって 0.5、1.0、2.0 EU/ml のエンドトキシンに対して反応を示さない物も含まれる可能性がある。そうすると実験自体が成り立たない場合がある。3) さらに、ヒトの血液を用いることは、その血液が病原体に汚染されている場合、検査を行う人にとって危険である。4) また、血液の供給者の病歴によって、治療や予防のために抗体の投与や異なるワクチン接種がなされており、発熱性物質の測定に影響を及ぼすことが予想される。5) さらに、海外では救急救命以外目的で血液を集める組織が存在するが、日本においては日本赤十字が無償で集めており、輸血以外の目的での使用は血液製剤などに限定されている²²⁾ ため実際に発熱性物質の試験に使用する材料とするのは難しい。6) 最後に IPT の 5 つの方法に共通する問題点として、限度試験としている点がある。限度試験では、血液製剤に含まれる発熱性物質の定量を行うことができず、ある量以上か以下かの判定のみが可能である。そのため血液製剤の製造工程での測定には適さない。この点は重要で、発熱性物質製剤の品質向上のためにはマイナスとなる。以上のような問題点を持つためにヒトの血液を用いる方法は、ウサギ発熱試験法の代替法として適さないと考えられる。

ただし、ECVAM の IPT はウサギ発熱試験法の代替法としてヒト由来の測定系を提唱した点は

評価される。それは、発熱性物質の主要成分であるエンドトキシンや血液製剤に対する反応性に種差が存在する可能性が指摘されているからである²³⁾。特にインターフェロン (IFN) 製剤は高い種特異性を示し、かつエンドキシンの生体内作用を強く増強する。このような製剤の安全性管理のためには、特にヒトの反応性を反映する試験法が重要となる²⁴⁾。そのためにヒトに用いられる医薬品の副反応測定には、ヒトの反応性を有する測定系が必要となる。

それでは、代替法の候補としてはどのような方法が考えられるであろうか？ 我々は、ヒト由来の株化細胞を用いる方法を提唱した。ヒト由来の株化細胞であれば、品質が均一な材料が常に準備できるし、培養条件をそろえれば、世界中どこにおいても測定材料として供給が可能である。また、ヒト由来の細胞株であればヒトでの発熱性物質に対する反応性を有していて、ヒトでの発熱を予想できる測定系が構築可能であろう。

3. ヒト由来株化細胞を用いた試験

それでは、ヒト由来の細胞株であれば全てヒトでの発熱性物質に対する反応性を有していて、ヒトでの発熱を予想できる測定系が構築可能であろうか？ ヒト由来の細胞株であっても、どの種類の細胞を用いているか？ その分化のどの時期を用いたかによって、樹立された細胞株の性質は当然異なってくる。また、「ヒトでの発熱性物質に

対する反応性」についても、前述したようにランダムに選んだ5人の末梢血のエンドトキシンに対するサイトカイン産生量が最大4倍もの違いが存在するとどのようにして基準とするかが問題となる。

ここで、我々は、良く研究され多くの細菌由来の標品の存在するエンドトキシンについて、ヒトでの反応性の特徴を捉えるための解析を行った。由来の異なるエンドトキシン市販品10種類を用意し、秤量して段階希釈してヒト末梢血に添加し、培養上清中のTNF- α 、IL-6、IL-1 β 量を、それぞれ標準品を用いて平行線定量法により定量した。前述のように末梢血液の反応性にはかなりの個人差がみられた。そこで供血者毎に、各エンドトキシンのサイトカイン産生能をエンドトキシン標準品 (Reference Standard Endotoxin: RSE) に対する相対値として求めたところ、図2に示したように供血者によらずエンドトキシン毎に固有の値となった。また種々のエンドトキシンによるTNF- α 、IL-6、IL-1 β の産生量の間には、互いに良い相関が認められた (図2)。すなわち、この各種のエンドトキシンによるサイトカイン産生能相互の相関は、正常なヒト末梢血の特徴であると考えられた。

そこで、上記のヒト末梢血のサイトカイン産生に関する性状を指標に、今までに樹立されたヒト由来の単球株化細胞であるTHP-1, P31/FUJ, P39/TSU, MD, 90196 B, EL1, 28 SC, KMAとECVAMの提案するIPTの候補

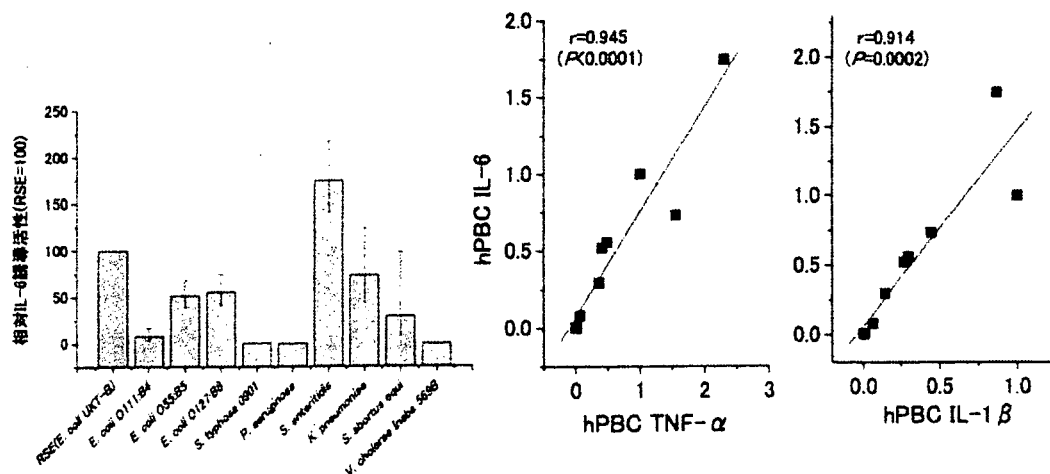


図2 由来の異なるエンドトキシンに対するヒト末梢血のサイトカイン産生反応

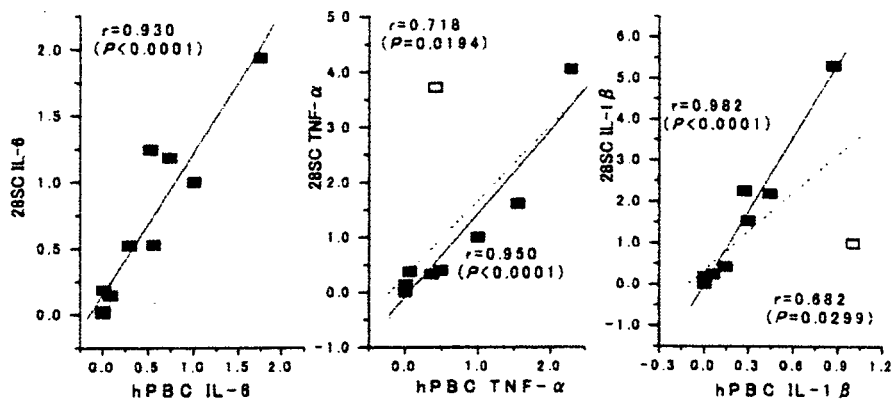


図3 ヒト末梢血と28SC細胞との関係

のMM6を加えて9種類の単球株化細胞より、至適細胞の選択を試みた。0.1~1,000 EU/mlのエンドトキシンに対するIL-6産生を調べ、THP-1, MM6と28SC細胞で高感度の用量依存的な反応を認めたが、他の細胞はほとんど用量反応を示さなかった。そこでTHP-1, MM6および28SC細胞について、さらに種々のエンドトキシンに対するTNF- α , IL-6, IL-1 β 産生の性状を調べた。28SC細胞についてはヒト末梢血の場合と同じく、TNF- α , IL-6, IL-1 β 産生の間的良好な相関が確認された(図3)。一方THP-1とMM6はサイトカイン産生の間にはこうした関係が認められず、明らかにヒト末梢血の反応性とは異なる反応性を持っていた。ヒトIFNは、エンドトキシンの*in vivo*活性に対して増強作用を示す。IFN- α , β , γ によるエンドトキシン活性への増強作用についても、28SC細胞とヒト末梢血で一致した結果が得られた。したがって、28SC細胞を用いたIL-6産生を指標にした測定により、ヒト末梢血と同様の反応性を持つ高感度*in vitro*エンドトキシン試験法が可能になると思われる²³⁾。

4. エンドトキシン以外の発熱性物質の管理法の試み

血液製剤についてエンドトキシンの管理法は、上述のように確立されつつあるが、エンドトキシン以外の発熱性物質に関しては、どのような方法が存在するであろうか？ 発熱性物質の由来は細

菌、ウイルス、環境中の化学物質など多岐に亘るが、エンドトキシン以外の主な物質としては、細菌外膜由来のPGNと β -glucanが挙げられる。これらは環境中に大量に存在し、原材料の血液の汚染や、製剤の製造工程中での混入の可能性が存在する。そこでPGNや β -glucanについて、筆者らが行った結果を基に管理法の提案をしてみたい。

PGNと β -glucanは、その化学構造が単純な構成要素が重合した多量体構造を有することが特徴である。それぞれ、PGNはグラム陽性菌の β -glucanは真菌の外膜を形成し安定で高い強度を持つ。菌種により構成要素の違いによりいくつかの種類が存在する。また、市販されている標品がある。PGNと β -glucanについて、エンドトキシンで行ったと同様にヒト末梢血での反応性の特徴を調べた。まず、PGNを5種、 β -glucan5種の市販品を集め、それぞれ秤量して段階希釈し、ヒト末梢血に加えて培養し、その培養上清中のIL-1 β , IL-6とTNF- α を定量した。その結果、PGNと β -glucanによる刺激によって、ランダムに採取した5人のヒト末梢血によるサイトカイン産生量は、約10倍の差が存在した。そこで、エンドトキシンの場合と同様な標準品に対する相対値を求めようとしたが、それぞれ標準品が存在しないために、暫定的にPGNは、*Staphylococcus aureus* (Sa)由来のものを、 β -glucanは、CM-curdranを基準としてそのサイトカイン産生量に対する相対値を求めた。図4にはIL-6についてのデータを示したが、他のサイトカイ

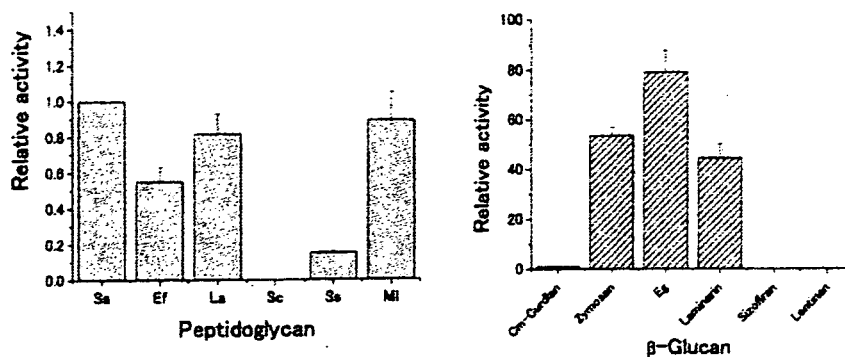


図 4 由来の異なる Peptidoglycan および β -glucan によるヒト末梢血でのヒト IL-6 産生活性の相対値

ンも同様の反応を示した。この図に示すように、相対値で表すことによって、エンドトキシンの場合と同様に個人差は解消され、ヒトでの反応性の特徴を捉えることができたと考えられる。この方法を用いて、ヒト由来の細胞株、MM6と28SCについて比較したところ、ECVAMのIPTとして提案されたMM6ではなく、28SC細胞がヒトの末梢血と同様のPGNや β -glucanへの反応性を示した。したがって、28SC細胞を用いたIL-6産生を指標にした測定により、ヒト末梢血と同様の反応性を持つ高感度 *in vitro* PGN, β -glucan 試験法が可能になると思われる。

おわりに：日本において検討されている血液製剤の発熱性物質試験代替法

以上述べてきたように、血液製剤の発熱性物質の試験法としては、ウサギ発熱試験法は長年実施されてその安全性管理に貢献してきたが、臨床投与量の増加や動物愛護のための実験動物の使用制限などで代替法への要請が高まってきている。その代替試験法候補として海外のECVAMやICCVAM等の評価機関によって評価され、提案されているIPTについては上述のような問題点があり、かつ日本においては検査方法の原料となるヒトの血液供給が困難な状況では到底受け入れる事ができない。

そこで、我々はヒト末梢血での発熱物質への反応性を指標として、ヒト由来単球株化細胞を用いた測定系で同様の反応を示す細胞株として28SC細胞を選択し、その培養上清のIL-6を定量する

測定法を開発した。この細胞は、ヒトでの反応性を反映することから、臨床関連性の期待するエンドトキシン規格値策定に有用であると考えられる。すなわち、現在一律に規定されているエンドトキシンの規格値を、エンドトキシンの由来によりその活性が異なるのでRSEに対して比活性を算定し、さらに、各血液製剤に特有のエンドトキシン活性の増強を示す場合もありうることから、この点も考慮に入れてその係数を与えて規格値を決定する必要がある。このようにして決定した規格値に従って血液製剤のエンドトキシン汚染を監視することがその安全性の確保に有効な方法であると考えられる。

個々のエンドトキシンの測定には、現在簡易で最も高感度に測定が可能な *in vitro* 試験法であるLAL試験法の利用があげられる。我々は1996年より血液製剤のうち2製剤についてウサギ発熱試験法の代替法としてLAL試験法の導入を行った。その後10年間LAL試験法にてこの2製剤の発熱性物質を管理した結果、その混入量が著しく改善されてきた。このような経緯から血液製剤での発熱性物質の管理にこの方法が有用であると考えられる。

そこで、5社より提供された13種類32ロットの製剤を対象として、LAL試験への代替の可否を決めるための検討を行った。まず、血液製剤を段階希釈し一定量のエンドトキシン標準品を添加した場合の回収率が50~200%までの範囲であると適用可能と判定することとした。その結果、14製剤中ATⅢを除いて13製剤は、適用が可能であることが明らかとなった(表1)。LAL試験で

表1 血液製剤のLAL試験適用検討の結果

製剤名	検体数	カイネティック比濁法		カイネティック比色法	
		希釈倍数 ^{*1}	添加回収率	希釈倍数 ^{*1}	添加回収率
液状製剤					
ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン	3	8	75.0%	4	97.2%
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	1	8	70.2%	4	92.7%
人ハプトグロビン	4	8	74.1%	4	86.7%
人免疫グロブリン	2	16	68.5%	4	77.1%
ポリエチレングリコール処理抗HBs人免疫グロブリン	1	2	77.5%	4	98.4%
抗HBs人免疫グロブリン	2	16	82.7%	8	72.1%
乾燥製剤					
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅳ因子	4	2	81.3%	4	79.4%
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅴ因子	1	2	86.0%	4	84.0%
乾燥抗破傷風人免疫グロブリン	1	8	56.9%	4	79.0%
乾燥人フィブリノゲン	4	8	84.8%	4	96.9%
乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ ²	2	64	51.6%	256	52.6%
乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン	3	4	75.4%	4	83.6%
乾燥pH4処理人免疫グロブリン	3	8	81.5%	4	75.0%
乾燥スルホ化人免疫グロブリン	2	8	73.9%	4	68.2%

*1 平行性が否定されない最小希釈倍率

*2 添加回収率が50%以上の希釈倍率(ES-Ⅲ:128倍希釈時 73.1%、エンドスピーシー:512倍希釈時 54.0%)

の欠点として、その反応を阻害する物質の存在が指摘されているが、今回の検討で血液製剤には、阻害物質が存在するが、そのほとんどが希釈によって除去することができた。また、28 SC細胞を用いてエンドトキシン活性の増強作用を測定すると9種類に増強活性が認められたが、その程度は2倍以下であった。これらの検討から、血液製剤のウサギ発熱試験法の代替法として28 SC細胞による基準作成を伴うLAL試験法の使用は十分適用が可能な試験法である。

一方、エンドトキシン以外の発熱性物質のPGNや β -glucanについては前述のように28 SC細胞による測定系が適用可能であるが、これらの試験法については、今後、それぞれの標準品を規定し、エンドトキシン試験におけるLAL試験法の様な特異的で簡易な*in vitro*測定法が開発されれば、それぞれの血液製剤での混入の監視のための試験法として位置づけられると予想される。現在のところ、 β -glucanの定量法は、LALに含まれるGカスケードを利用した試薬を用い

て測定する方法が開発されたところである。

文 献

- 1) Bockemuhl J: Typhoid vaccination yesterday and today. *Immun Infekt* 11: 16-22, 1983
- 2) Plotkin SA, Orenstein WA: Vaccines 3rd edition, Philadelphia. W. D Saunders. 1999
- 3) Westphal O, Luderitz O: The history of pyrogen research In D. Schlessinger (ed.), *Microbiology American society for microbiology* Washington D. C. 1977, p 221-238
- 4) Seibert FB: Introduction to the symposium on bacterial pyrogens. *Trans N Y Acad Sci* Feb 14: 157-159, 1952
- 5) Westphal O: Bacterial endotoxins. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 49: 1-43, 1975
- 6) U. S. Pharmacopeia, 12 rd, Pyrogen test 1942
- 7) 生物学的製剤発熱試験法基準, 厚生省公告第378号 1969
- 8) Hartung T, Aaberge I, Berthold S, et al.:

- Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. The report and recommendations of ECVAM Workshop 43. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *Altern Lab Anim* 29 : 99-103, 2001
- 9) Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, et al. : International validation of novel pyrogen tests based on the human fever reaction. *J Immunol Meth* 298 : 161-173, 2005
 - 10) Weary ME, Wallin RF : The rabbit pyrogen test. *Lab Anim Sci* 23 : 677-681, 1973
 - 11) Levin J, Bang FB : The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 115 : 265-274, 1964
 - 12) Daoust DR, Orłowski SJ, McMahon G, et al. : Limulus amoebocyte lysate test as a method for detection of endotoxins and endotoxin-like materials. *Bull Parenter Drug Assoc* 30 : 13-20, 1976
 - 13) 朝川貞雄, 藤原博, 内藤誠之郎, 他 : ヒト血清アルブミン製剤中のエンドトキシン量の測定に対するリムルス試験の応用. *薬学雑誌* 114 : 888-893, 1994
 - 14) 内藤誠之郎, 藤原博, 朝川貞雄, 他 : 加熱ヒト血漿たん白製剤に含まれるエンドトキシンの定量へのリムルス試験の応用. *薬学雑誌* 112 : 551-556, 1992
 - 15) Soszynski D : The pathogenesis and the adaptive value of fever. *Postepy Hig Med Dosw* 57 : 531-554, 2003
 - 16) Salvemini D, Mollace V, Pistelli A, et al. : Metabolism of glyceryl trinitrate to nitric oxide by endothelial cells and smooth muscle cells and its induction by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89 : 982-986, 1992
 - 17) Jagielo PJ, Thorne PS, Watt JL, et al. : Grain dust and endotoxin inhalation challenges produce similar inflammatory responses in normal subjects. *Chest* 110 : 263-270, 1996
 - 18) Poole S, Thorpe R, Meager A, et al. : Detection of pyrogen by cytokine release. *Lancet* 8577 : 130, 1988
 - 19) Taktak YS, Selkirk S, Bristow AF, et al. : Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. *J Pharm Pharmacol* 43 : 578-582, 1991
 - 20) Schindler S, Asmus S, von Aulock S, et al. : Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing. *J Immunol Meth* 294 : 89-100, 2004
 - 21) SOP for Five In Vitro Pyrogen Tests : <http://ecvam.jrc.it/index.htm>, 2006
 - 22) 厚生労働省 : 安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律施行規則 (昭和三十一年六月二十五日厚生省令第二十二号) 1956
 - 23) Yamamoto A, Ochiai M, Kamachi K, et al. : A cell line assay system for predicting the response of human blood to endotoxin. *Jap J Infect Dis* 56 : 93-100, 2003
 - 24) Terrell TG, Green JD : Comparative pathology of recombinant murine interferon-gamma in mice and recombinant human interferon-gamma in cynomolgus monkeys. *Int Rev Exp Pathol* 34 Pt B : 73-101, 1993