

1. Low Endotoxin Recovery (LER) における影響因子

土谷 正和

Charles River, Microbial Solutions

はじめに

Low Endotoxin Recovery (LER) は、製品に添加した標準エンドトキシンの活性が十分に回収できない現象であり、主としてキレート剤と界面活性剤を含む製剤で観察されている^{1,2)}。米国食品医薬品局 (FDA) がこれを患者に対するリスクと考えていることから³⁾、現在、医薬品業界で問題となっている。LER における影響因子については、温度、pH、緩衝液や界面活性剤の種類、攪拌方法などが報告されているが^{4,5)}、その影響に関する動力学的な解析はみあたらない。今回、LER における影響因子として温度、pH、塩濃度、クエン酸濃度、リン酸濃度、ポリソルベート 20 濃度について、これらの LER に対する影響を動力学的に調べた⁶⁾。

1. LER 溶液中のエンドトキシン活性の動力学的解析

LER 条件における米国標準エンドトキシン (RSE) の活性変化の反応速度定数を測定した。LER におけるエンドトキシン活性の変化を活性型 (LPS_a) から不活性型 (LPS_i) への一次反応と見なせると仮定し、反応速度を v 、反応速度定数を k とすると、

$$v = -d [LPS_a] / dt = k [LPS_a]$$

LPS_a の初期濃度を c 、時間 t における LPS_a の減少濃度を x とすると、

$$-d (c - x) / dt = dx / dt = k (c - x)$$

上式を積分すると、 $t=0$ のとき $x=0$ なので、

$$k = 1/t * \ln (c / (c - x))$$

この式を変形して、

$$\ln (c / (c - x)) = kt$$

LPS_a が回収率で表されるとき、 $c=1$ 、 $c-x$ は時間 t における回収率となるので、時間 t とエンドトキシン回収率の逆数の自然対数をプロットし、その傾きを k として得た。このプロットにおける相関係数は、傾きが小さい (0.1 以下) のもの (30 測定中 3 例) を除き、すべて 0.97 以上と良好であった。すなわち、LER を見かけの一次反応とする仮定は妥当と考えられた。

LER の程度を評価するため、RSE 活性が 50% になるまでの時間を、半減期 (LER50) として次式で求めた。

$$LER50 = \ln (1/0.5) / k = 0.693 / k$$

RSE 活性の経時的変化の測定は、以下の方法で行っ

た。LER 条件の溶液を設定温度で保温した後、エンドトキシンを添加して反応を開始した。この反応液から 0.01 mL の試料を採取し、あらかじめ等量のエンドトキシン試験用水を添加したリムルス試薬 (LAL) 0.2 mL に添加し、トキシノメーター (和光純薬) で活性を測定した。この方法は、試料を別途希釈する必要がないため、経時的変化の測定に適していた。

2. LER における影響因子

温度、pH、塩濃度が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響を図 1~3 に示す。RSE 活性の低下には、温度の影響が大きく、温度が高いほど半減期は短かった (図 1)。室温 (約 25°C) と冷蔵 (約 3°C) では、半減期が 100 倍程度の差を示した。また、半減期は pH が高いほど短く、クエン酸とリン酸で影響の程度が異なった (図 2)。この原因として、クエン酸がキレート剤であるのに対し、リン酸は LPS のリン酸基と競合的に二価イオンを奪い合っているため、違いが生じた可能性が考えられる。温度および pH が示した傾向は、Reich らの報告⁴⁾と同様であった。塩濃度と半減期には正の相関が認められ、濃度が低いほど半減期は短かった (図 3)。

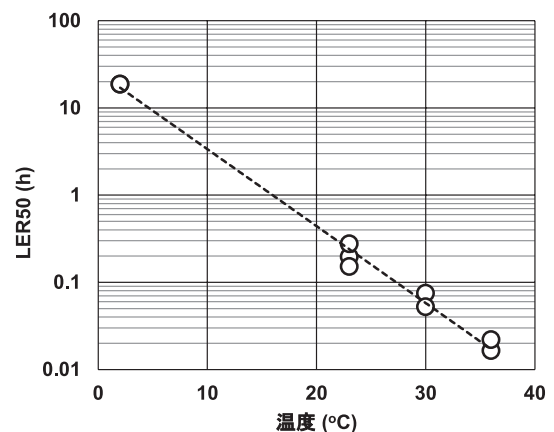


図 1 温度が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響

LER 溶液として、0.2~5.0 EU/mL の RSE を含む 10 mM クエン酸ナトリウム、0.05% ポリソルベート 20 (pH 7.3~7.4) を使用した。点線は回帰直線を表し、回帰係数が -0.996 と良好な直線性を示した。

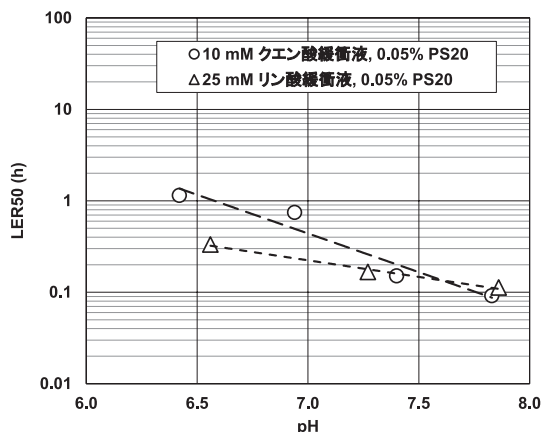


図 2 pH が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響

LER 溶液として、5.0 EU/mL の RSE を含む 10 mM クエン酸ナトリウム、0.05 %ポリソルベート 20 (pH 6.4~7.8, ○) ならびに 25 mM リン酸緩衝液、0.05 %ポリソルベート 20 (pH 6.6~7.9, △) を使用した。点線は回帰直線を表し、回帰係数も -0.967 (クエン酸), -0.994 (リン酸) と良好な直線性を示した。

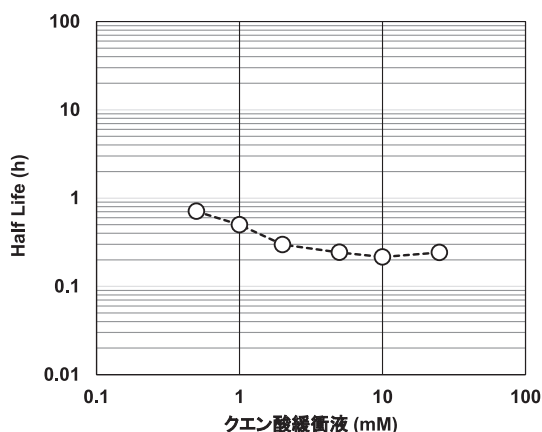


図 4 クエン酸濃度が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響

LER 溶液として、5.0 EU/mL の RSE を含む 0.5~25 mM クエン酸ナトリウム、0.05 %ポリソルベート 20、0.8%塩化ナトリウム (pH 7.4) を使用した。

LER 溶液の成分として一般的に用いられるクエン酸、リン酸、ポリソルベート 20 (PS20) の濃度が、LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響を調べた。クエン酸は、低濃度で半減期が長い傾向があったが、通常の使用濃度(5~25 mM)では変化が認められなかった(図 4)。リン酸濃度の対数と半減期の対数には負の直線関係が認められた (図 5)。この違いも、リン酸とクエン酸の二価イオンに対する作用の違いに起因する可能性が考

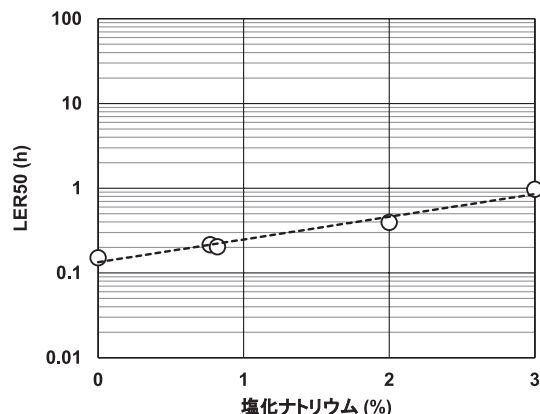


図 3 塩化ナトリウム濃度が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響

LER 溶液として、5.0 EU/mL の RSE を含む 10 mM クエン酸ナトリウム、0.05 %ポリソルベート 20 (pH 7.4) を使用した。点線は回帰直線を表し、回帰係数が -0.986 と良好な直線性を示した。

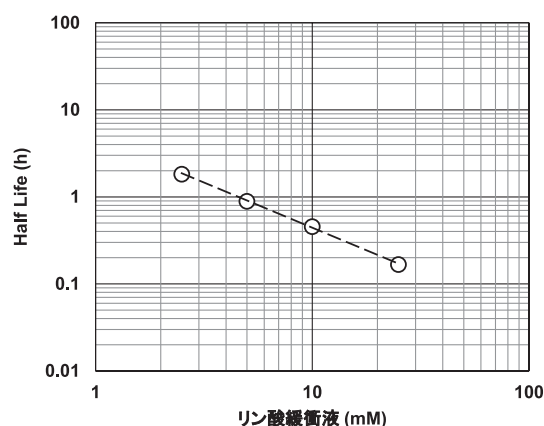


図 5 リン酸濃度が LER 溶液中の RSE の半減期に及ぼす影響

LER 溶液として、5.0 EU/mL の RSE を含む 2.5~25 mM リン酸緩衝液、0.05 %ポリソルベート 20 (pH 7.1~7.4) を使用した。点線は両対数グラフの回帰直線を表し、回帰係数が -1.00 と良好な直線性を示した。

えられる。ポリソルベート 20 濃度は、低濃度で長い半減期を示したが、通常の使用濃度 (0.01%~0.2%) ではほぼ一定であった (図 6)。

おわりに

エンドトキシン試験法は、ウサギを用いた発熱性試験法の代替法であり、試料中のエンドトキシン活性を測定するものである。エンドトキシン活性は、エンドトキシン単位 (EU) で表される。エンドトキシン試験法は、エンドトキシンの活性を測定しており、エンドト

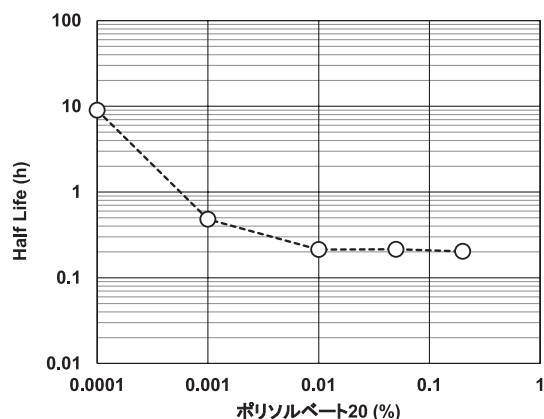


図6 ポリソルベート20濃度がLER溶液中のRSEの半減期に及ぼす影響
LER溶液として、5.0 EU/mLのRSEを含む10 mMクエン酸ナトリウム、0.0001%~0.2%ポリソルベート20 (pH 7.4)を使用した。

キシンの重量や絶対量を測定しているわけではない。われわれは、標準エンドトキシンの重量を知っているため、その比活性 (EU/ng) を計算できるし、これを標準品の品質検査に用いることができる。しかし、実際の試料中のエンドトキシンはその由来も分からず、比活性を知ることはほぼ不可能である。試料に添加した標準エンドトキシンの活性が変化することは、その試料の条件が通常使用される標準品の状態と異なっているために起こる現象である。エンドトキシン試験法が、試料中のあるがままのエンドトキシン活性を測定するための試験であることを考えると、LERはエンドトキシン試験法自体の問題とは考えにくい。仮に、エンドトキシン試験法で検出できないLPSがあるとすれば、それは新しい研究対象であり、その生体への影響は今

後調べていく必要のあるものかもしれない。いずれにしても、測定できないLER条件下のLPSは、これまでエンドトキシン試験法で検査してきた対象とは異なるものであることは間違いない。この点で、FDAがLERをエンドトキシン試験法上の問題として捉えているとすれば、大きな間違いである。ただ、エンドトキシン試験法で検出できないLPSのリスクについては、これまで全く研究されておらず、人体への影響がないとはいえない。この点については、今後の研究が期待される。今回の結果は、LPSのLER条件下における挙動を理解するために役立つものと思われる。また、LERを抑えることが必要な場合は、低いpH、高い塩濃度が好ましく、試料をできるだけ低温で保存することがとくに重要と考えられる。

文 献

- 1) Eaton J : LER : The Challenge of Meeting Regulatory Expectations. PDA Lett 51(10) : 22, 2015
- 2) Chen D, Wintzingerode F, Eaton J, et al : PDA LER Task Force Holds its First Workshop. PDA Lett 52(8) : 16-18, 2016
- 3) Hughes PF, Thomas C, Suvarna, K, et al : Low Endotoxin Recovery : An FDA Perspective. BioPharma Asia 4 : 14-25, 2015
- 4) Reich J, Lang P, Grallert H, et al : Masking of endotoxin in surfactant samples : Effects on Limulus-based detection systems. Biologicals 44 : 417-422, 2016
- 5) Bolden JS, Warburton RE, Phelan R, et al : Endotoxin recovery using limulus amebocyte lysate (LAL) assay. Biologicals 44 : 434-440, 2016
- 6) Tsuchiya M : Factors affecting reduction of reference endotoxin standard activity caused by chelating agent/detergent matrices. (To be published)