

# キレート剤と界面活性剤によるエンドトキシンの活性低下 (Low Endotoxin Recovery の機序)

土谷 正和

Charles River, Microbial Solutions

## Decrease of endotoxin activity in solutions containing a chelating agent and a detergent (Mechanism of Low Endotoxin Recovery)

Masakazu Tsuchiya

Charles River, Microbial Solutions

### Abstract

Low Endotoxin Recovery (LER) is a phenomenon of endotoxin activity decrease in a matrix containing a chelating agent and a detergent, and is a controversial topic in the biopharmaceutical field. The mechanism of LER is not fully elucidated. When endotoxin in LER solutions was diluted with water, the activity was decreased. The activity was maintained for a long time at 4°C, and was recovered by magnesium dilution and direct addition to the Limulus amoebocyte lysate (LAL). The size of endotoxin in LER solution was not changed after the activity was decreased. Considering these results, a new LER mechanism was proposed. A chelating agent removes divalent cations from the surface of endotoxin aggregates, and endotoxin molecules on the surface of the aggregates are replaced with detergent molecules. The reduction of the surface area of endotoxin aggregates causes decrease of the endotoxin activity to the LAL.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 23~25, 2018

**Key words** : Low Endotoxin Recovery, リムルス試薬, エンドトキシン, キレート剤, 界面活性剤

### はじめに

現在、医薬品業界で問題となっている 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<sup>1,2)</sup>。LER は米国医薬品食品局 (FDA) も注目しており<sup>3)</sup>、業界内では議論も活発に行われているが、その機序については十分に明らかにされていない。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おり<sup>4,5)</sup>、筆者もその影響に関する動力学的な解析を報告している<sup>6,7)</sup>。今回、LER 溶液の希釈方法によってその活性が異なる現象を発見し、その結果より LER の機序を推定した。

### 1. 希釈方法の違いによる LER 溶液中のエンドトキシン活性への影響

典型的な LER 溶液として、10 mM クエン酸ナトリウム、0.05% ポリソルベート 20 (PS20) を含む生理食塩水を用い、図 1 に示す 3 種類の方法 (DAM, WDM, MDM) でエンドトキシン活性を測定した。200 EU/mL の米国標準エンドトキシン (RSE) を添加した LER 溶液の活性は、25°C で 30 分後、WDM で 25% であったのに対し、DAM および MDM では 67% の活性を維持していた。4°C 保存では、4 時間後でも、DAM および MDM で 99% および 109% の活性を示したのに対し、WDM では 11% の活性となった。4°C 保存では、RSE の活性は DAM および MDM でよく保存され、15 日後でも 145% および 112% の活性を示した。この時、WDM では 0.06% の活性しか示さなかった。

エンドトキシン試験において一般的に使用される水

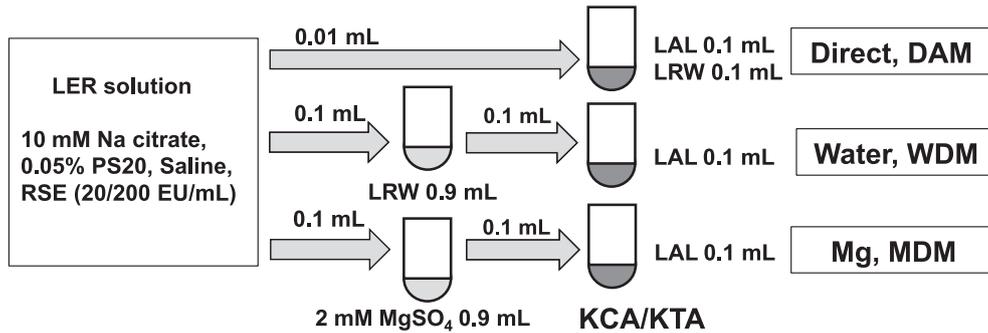


図 1 3種類の希釈方法

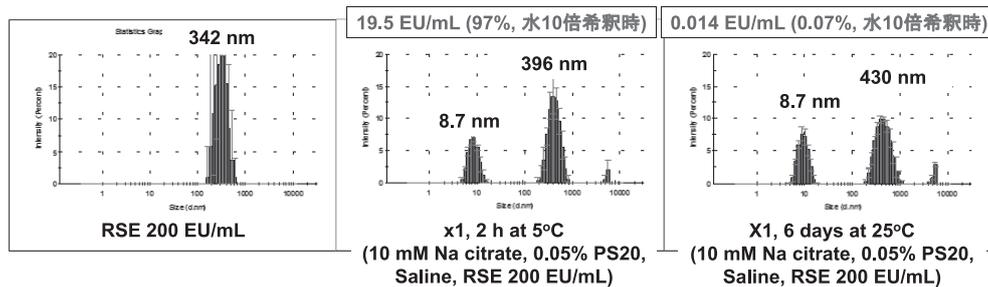


図 2 LER 溶液中の RSE 粒子分布の変化

活性が異なるにもかかわらず、LER 溶液中に RSE と同程度 (300~400 nm) のピークが観察された。

希釈である WDM と試料を直接リムルス試薬 (LAL) に添加する DAM では、その反応液の組成は同じとなることから、反応液が LAL の活性化に及ぼす影響の程度は同じはずである。それにもかかわらず、LER 溶液中の RSE 活性では、DAM と WDM で違いが認められた。この原因として、RSE 活性が水で希釈されることにより低下した場合と、試料を直接 LAL に添加したときに RSE 活性が上昇した場合の 2 つの可能性が考えられる。しかし、室温では、DAM でも RSE 活性が低下すること、MDM でも DAM と同様の挙動が認められることから、水で希釈された時に RSE 活性が低下している可能性が高い。すなわち、LER 溶液中の RSE 活性は、とくに低温では、長期にわたり維持されており、これを水で希釈すると活性が低下すると考えられる。

## 2. LER におけるエンドトキシン粒子の大きさの変化

LER の機序として、2 価イオンをキレート剤で奪われて不安定になったエンドトキシンミセルが界面活性剤で分散されて活性が低下するという機構が提唱されている<sup>4)</sup>。今回、種々の条件で保存した LER 溶液中の RSE について、動的光散乱式分布測定装置 (DLS, Malvern 社製 Zetasizer Nano ZS) を用いてその粒子分布を測定した。その結果、LER 溶液中の RSE の粒子分布は、低温で 2 時間保存した場合および室温で 6 日間

保存した場合とも、約 300~400 nm のピークが認められた。活性は低温保存で 97% 保存されていたのに対し、室温 6 日後では 0.07% となっていた (図 2)。RSE 水溶液のピークが同様のサイズに認められることから、エンドトキシンミセルが分散して活性のない小粒子になるというモデルは、この観察結果を説明しにくいと思われた。

## 3. LER の機序

データを踏まえて、エンドトキシン凝集体のサイズがあまり変わらないにもかかわらず、その活性が低下する LER の機序を考える必要がある。可能性の一つとして、下記の機序が考えられる (図 3)。

キレート剤がエンドトキシン凝集体表面の 2 価金属イオンを奪う。これだけでは、エンドトキシン凝集体の崩壊や分散は起こらない。界面活性剤はエンドトキシンに対して大過剰であるため、エンドトキシン凝集体の表面にあるエンドトキシン分子と入れ替わる。入れ替わったエンドトキシン分子は界面活性剤と小さいミセルを作る。一方、エンドトキシン凝集体の表面に入った界面活性剤は、エンドトキシンの表面積を減らし、これが活性低下の原因となる。凝集体の大きさは、エンドトキシン分子と界面活性剤分子が入れ替わるだけなので、あまり変わらない。エンドトキシン凝集体内部の 2 価イオンはキレート剤の影響を受けにくく、

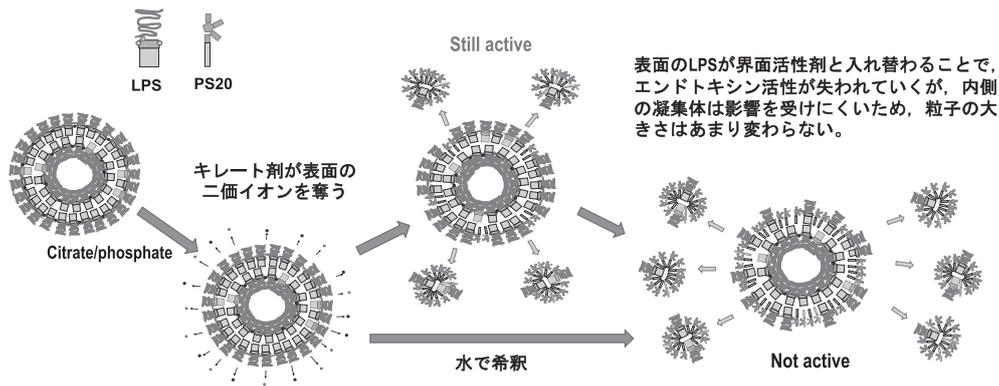


図 3 データから推定される LER の機序

凝集体の崩壊は非常に遅い。

### おわりに

LER で活性の低下したエンドトキシンの生体への影響は、現在のところ不明である。このエンドトキシンは、リムルス試薬に対する比活性が低く、発熱性などの急性の生物活性は発現しないと思われる。ただ、LER 条件下のエンドトキシンが分解されるとは考えにくいことから、エンドトキシンの分子自体はそのまま溶液内に残っていると思われる。このような状態のエンドトキシンが生体に及ぼす影響については、これまで研究されたことがなく、測定されたこともない。将来的には、このような状態のエンドトキシンの研究が必要と思われる。その意味で、LER の機序を明らかにすることは有意義と考えられるが、その機序は十分に明らかにはなっていない。今回、これまでの実験結果を基に、実験結果を説明できる機序を提起した。すなわち、キレート剤によって 2 価の金属イオンを失ったエンドトキシン凝集体の表面のエンドトキシン分子が界面活性剤分子と入れ替わり、活性を発現できるエンドトキシンの表面積が減少するというものである。今後、LER 条件下のエンドトキシンの状態について、さらにデータが発表され、活性低下の機序が明らかにされる

ことが期待される。

### 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 amoebocyte 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 : Kinetic analysis of low endotoxin recovery. PDA J Pharm Sci Technol 71 : 478-487, 2017
- 7) 土谷正和 : Low Endotoxin Recovery (LER) における影響因子. "エンドトキシン・自然免疫研究 20" 隅田泰生, 長岡功編. 医学図書出版, 2017, pp19-21