

# エンドトキシン試験で何を測定しているのか —Low Endotoxin Recovery で考えさせられたこと—

土谷 正和

Charles River, Microbial Solutions

## What does the bacterial endotoxins test measure? —subjects that low endotoxin recovery raised—

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. LER raised a questions on the target of the Bacterial Endotoxins Test (BET). This includes endotoxin activity change by samples and undetectable endotoxin in samples. We have been measuring endotoxin activity, not the amount of endotoxin in a sample by the BET. Endotoxin activity in a sample can be changed by a different condition, like LER. There may be a status of endotoxin that cannot be detected by the BET. There was difference in LER resistance between purified endotoxin and naturally occurring endotoxin. Although there may be the highest endotoxin activity in a sample under a different condition, the highest activity is not the target of the BET. The endotoxin in a sample should be measured as is. There may be undetectable endotoxin, but we do not have enough information to discuss about its effects on human health. This should be studied in the future.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 13~16, 2019

**Key words** : Low Endotoxin Recovery (LER), エンドトキシン試験, リムルス試薬

### はじめに

近年、欧米のバイオ医薬品の分野で問題になっている Low Endotoxin Recovery (LER) の問題は、われわれに種々の問題を再提起してくれた<sup>1)</sup>。まず、リムルス試薬を用いたエンドトキシン試験法で測定しているエンドトキシンとは何かという問題である。エンドトキシン試験法で測定しているエンドトキシンとは、試料中に存在するエンドトキシンの活性であり、その重量(物質量)を測定しているわけではない。次に、エンドトキシンの活性は状態によって変化するという、さらには現在の測定法では検出できないエンドトキシンの状態が存在するかもしれないことを再確認することになった。その他、エンドトキシンの活性を発現するのがモノマーなのか凝集状態なのか、精製したエンドトキシンと天然エンドトキシンの違いなども、改めて議論されている。本稿

では、LER の研究で明らかになったことを踏まえ、これらの点について考えてみたい。

### 1. エンドトキシン試験法ではエンドトキシンの活性を測定している

エンドトキシン試験法は、カプトガニ由来のリムルス試薬を用いて、エンドトキシンの活性を測定する方法である。この点を理解しないと、測定結果の解釈を間違ってしまうかもしれない。精製したエンドトキシンが、対イオンや超音波処理によって、種々の生物活性を示すことは、以前から知られていた<sup>2,3)</sup>。すなわち、エンドトキシンの重量あたりの生物活性は一定ではないということであり、医薬品や医療機器の安全性試験としてのエンドトキシン試験法でも「エンドトキシンの活性」を測定するという、重量ではなくエンドトキシン単位(EU または IU)という単位を用いている。現在使用されてい

る国際エンドトキシン標準品 (USP Reference Standard Endotoxin, RSE と同等品) は大腸菌由来のエンドトキシン精製品を用いており、その比活性は約 10 EU/ng 程度で、10,000 EU/vial の標品が入手できる<sup>4)</sup>。二次標準品 (Control Standard Endotoxin: CSE) を使用する場合は、RSE に対して活性を評定し、その比活性 (EU/ng) を算出する。ここでも測定値を活性として表すために、このような換算が行われる。標準エンドトキシンの比活性をわれわれが知っているため、また以前から医学界ではエンドトキシンの重量が使用されていたため、エンドトキシン試験で試料中のエンドトキシン重量を測定できると思われているかもしれない。しかし、上記の理由で、エンドトキシン試験で測定しているのが「活性」であり、試料に含まれる由来のわからないエンドトキシンの重量を知ることができないのは明らかである。

## 2. エンドトキシンの活性は変化する

エンドトキシンの活性は、共存物質や環境の影響で変化する。鉄やアルミニウムといった金属イオンが、マイクロモルレベルの濃度でエンドトキシンの活性を低下させることが以前から報告されている<sup>5,6)</sup>。この中で、鉄はエンドトキシンの構造を変化させることが報告されているが<sup>7)</sup>、他のイオンについては、エンドトキシンそのものの構造を変化させるとは考えにくい。したがって、この活性変化は、エンドトキシンの凝集状態の変化によって起こると考えられる。LER においては、キレート剤と界面活性剤という 2 要素でエンドトキシンの活性低下が観察される。その活性低下の速度は、温度によって大きく影響を受ける他、pH や塩濃度の影響を受ける<sup>8,9)</sup>。当初、LER の機序として、キレート剤によって結合が弱まったエンドトキシン凝集体から、界面活性剤がエンドトキシン分子を引き剥がし、最終的には細かく分散させてしまうといったことが予想されていた<sup>8,10)</sup>。しかし、実際にその粒子分布を測定してみると、活性が低下し、長期間 (1 年以上) が経過しても、元のエンドトキシン粒子と同じサイズの粒子が観察された<sup>11)</sup>。すなわち、LER の機序として、エンドトキシンが細かい粒子になって分散することが活性低下の主たる原因ではないと考えられた。また、低温 (4℃ 程度) では、LER 条件下でも RSE の活性は 1 カ月以上安定であり、これを水で希釈すると活性の低下が起こることも明らかになった<sup>12)</sup>。この活性低下は、マグネシウム溶液で希釈することにより抑制することができることから、キレート剤で弱くなったエンドトキシン凝集体は、低温ではその形態を維持しており、希釈などによって条件が変化することで、活性の低下が起こると考えられた<sup>11)</sup>。これらの結果から、LER においては、エンドトキシン凝集体の表面でエンドトキシン分子と界面活性剤分子の入れ替えが起こると機序が考えられた<sup>11)</sup>。すなわち、エンドトキシン凝集体表面

のエンドトキシン分子の面積の減少が、主なエンドトキシン活性低下の原因と思われた。

## 3. 精製エンドトキシンと天然エンドトキシン

LER は、FDA ガイダンス<sup>13)</sup>で推奨されている試料中のエンドトキシンの安定性試験で明らかになった。この時、使用するエンドトキシンとしては、CSE か RSE が推奨されている<sup>14)</sup>。これらの標準エンドトキシンには、精製されたエンドトキシンが使用されている。一方、低栄養条件下で培養したグラム陰性菌から得られた天然エンドトキシンでは、LER が認められないことが報告されている<sup>15)</sup>。この原因の一つとして、低栄養時におけるグラム陰性菌の Lipid A 修飾が指摘されている<sup>16)</sup>。すなわち、低マグネシウム下で培養したグラム陰性菌では、Lipid A のリン酸基が、エタノールアミンやアミノ糖で修飾され、2 価の金属イオンの不足を補うことができるのである。このような Lipid A を持つリポ多糖 (LPS) では、キレート剤の影響を受けにくく、LER も起こりにくい。このようなエンドトキシンもエンドトキシン試験で検出できるので、バイオ医薬品の工程中に起こったグラム陰性菌の汚染によるエンドトキシンの増加を見逃すことはほぼないといえる<sup>16)</sup>。高栄養培地で培養したグラム陰性菌から精製したエンドトキシンは、リムルス試験の標準としては有用であるが、実際に製品に混入する可能性のあるエンドトキシンとは性質が異なるため、製品中のエンドトキシンの安定性試験には適さないと考えられる。しかし、欧米の規制当局が精製エンドトキシンを使用した標準エンドトキシンの添加を推奨していることから、これを使用せざるを得ない現状がある。どのような試験が、製品を投与される患者の安全性に寄与するかは、今後の研究によって明らかにされる必要がある。

## 4. エンドトキシン試験でどのようなエンドトキシン活性を測定すべきか

試料中のエンドトキシンの活性が、条件の変化によって変化することはすでに述べた。それでは、試料中のエンドトキシンの活性はどの状態のものを測定すべきであろうか。この問いは以前からあったのだが、LER の問題によって再度注目されることとなった。医薬品や医療機器の安全性試験としてのエンドトキシン測定で LER が提起した問題点は、「試料中のエンドトキシンの活性が現在の状況より高い値を取る可能性がある場合、試料中のあるがままの活性を測定すべきか、可能性のある最大活性を測定すべきか」ということである。LER では、添加した標準エンドトキシンの活性が低下するが、その条件はエンドトキシンを分解するような条件ではない。すなわち、試料中に標準エンドトキシンのような性質のエンドトキシンが汚染した場合、汚染前のエンドトキシン活性は試料中で低下し、試料中のエンドトキシン

活性は汚染前より低くなっていると考えられる。エンドトキシン自体は分解されたわけではないので、試料中のエンドトキシン重量は変わらないが、活性のみが低下した状態と考えられる。試料中のエンドトキシン活性として、どちらを取るべきであろうか。LERにおいては、試料に添加した標準エンドトキシンの比活性が分かっているため、添加前の活性を検出したいと思うのは人情であろう。しかし、実際に試料（製品）に混入してくるエンドトキシンは、精製されたものではないし、栄養培地で培養されたグラム陰性菌由来ではない。したがって、汚染したエンドトキシンが標準エンドトキシンと同じ挙動を示すとは言えず、元のエンドトキシン活性を知ることにはできない。しかも、標準エンドトキシンでさえ、条件によっては、その活性が上昇することも考えられることから、元の活性が最大活性とは限らない。これまでエンドトキシン試験では、試料中のエンドトキシン活性をあるがままに測定してきたのであり、試料中のエンドトキシンの最大活性については考慮してこなかった。リムルス試験を用いた「エンドトキシン試験法」が採用されてから39年が経ち、LERを引き起こすキレート剤と界面活性剤を含む製剤が開発されてから30年ほどが経過しているが、エンドトキシン試験の不具合による発熱事例は報告されていない<sup>17)</sup>。このことは、試料中のエンドトキシン活性をあるがままに測定することの有用性を示すものであり、エンドトキシン試験の有用性を支持するものである。

## おわりに

エンドトキシン試験法は、試料中のエンドトキシン活性をあるがままに測定する方法である。LERがこの点に疑問を投げかけ、いまだにどの活性を測定するのが良いのか、結論は出していない。工程検査におけるエンドトキシン試験で、LERが起これると、エンドトキシンの汚染を見逃すかもしれないという規制当局の意見もあり、実際にバイオ医薬品メーカー各社は、自社製品に対するLER検討を余儀なくされている。今後、LERをどのように解釈し、どのような試験を行うことが、製品の安全性に寄与するかを、科学的に明らかにしていかなければならない。

LERが提起した問題点の一つに、リムルス試験を使用したエンドトキシン試験では検出できないエンドトキシンの状態があるかもしれないということがある。この状態のエンドトキシンは、その測定方法がないことからこれまで測定されておらず、その生物活性も明らかではない。少なくとも、発熱性のような急性毒性はないと思われるが、慢性的に投与された場合の影響については全く分かっていない。すなわち、LERで検出できなくなったエンドトキシンについては、これまで何のデータもないため、その危険性については未知である。今後、このような状態のエンドトキシンの生物活性についての研究が

期待される。

## 文 献

- 1) 土谷正和：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). エンドトキシン・自然免疫研究 21 : 23-25, 2018
- 2) Galanos C, Luderitz O : Lipopolysaccharide : properties of an amphipathic molecule. In "Handbook of Endotoxin, Vol. 1 Chemistry of Endotoxin" ed Rietschel ET, Elsevier Science publishers BV, Amsterdam, 1984, pp46-58
- 3) Komuro T, Murai T, Kawasaki H : Effect of sonication on the dispersion state of lipopolysaccharide and its pyrogenicity in rabbits. Chem Pharm Bull 35 : 4946-4952, 1987
- 4) Poole S, Dawson RE, Gaines Das RE : Second international standard for endotoxin : calibration in an international collaborative study. J Endotoxin Res 4 : 221-231, 1997
- 5) 土谷正和：リムルス試験の利用とその現状. 防菌防黴 18 : 287-294, 1990
- 6) Duner KI : The importance of the quality of water in Limulus amebocyte lysate tests. PDA J Pharm Sci Technol 49 : 119-121, 1995
- 7) Fujita Y, Nabetani, T : Iron sulfate inhibits Limulus activity by induction of structural and qualitative change in lipid A. J Appl Microbiol 116 : 89-99, 2014
- 8) 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
- 9) Tsuchiya M : Factors affecting reduction of reference endotoxin standard activity caused by chelating agent/detergent matrices. PDA J Pharm Sci Technol 71 : 478-487, 2017
- 10) Tsuchiya M : Possible Mechanism of Low Endotoxin Recovery. Am Pharm Rev 17 : 18-23, 2014
- 11) Tsuchiya M : Mechanism of Low Endotoxin Recovery Caused by a Solution Containing a Chelating Agent and a Detergent. Immun Res, 2019 (in press)
- 12) Tsuchiya M : Sample treatments that solve Low Endotoxin Recovery issues. PDA J Pharm Sci Technol 73 : 433-442, 2019
- 13) Guidance for Industry. Pyrogen and Endotoxins Testing : Questions and Answers. Food and Drug Administration, Washington DC, 2012
- 14) "Low Endotoxin Recovery, Technical Report No. 82", Parenteral Drug Association, 2019
- 15) Bolden J, Platco C, Dubczak J, et al. : The Use of Endotoxin as an Analyte in Biopharmaceutical Product Hold-Time Study. United States Pharmacopeia : Stimuli to the Revision Process 41 (5), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD. 2015

- 16) Dubczak J, McCullough KZ : Environmental endotoxins are non-static structures. Why the LAL test continues to be efficacious. "Contamination Control in healthcare Product Manufacturing" Vol 5, eds Madsen RE, Moldenhauer J, Parenteral Drug Association, 2018, pp243-263
- 17) McCullough KZ : Current USP perspectives on low endotoxin recovery. Am Pharm Rev, Endotoxin Supplement : 4-7, 2016