

## 1 エンドトキシン試験法と測定試薬に遺伝子組換えタンパク質を用いる代替法

3 エンドトキシンは、グラム陰性細菌の細胞壁外膜に存在する  
4 リポ多糖(Lipopolysaccharide)であり、様々な生物活性を示す。  
5 エンドトキシンは直接血中に入ると極微量で発熱を惹起し、大  
6 量ではエンドトキシンショックから死に至らしめるような強い  
7 毒性を発揮する。また、環境中に広く存在しているグラム陰性  
8 菌に由来すること、耐熱性を示し容易に失活しないことから、  
9 エンドトキシンは医薬品の製造工程などにおいて混入する可  
10 能性があり、更に混入の可能性がある発熱性物質の中で特に強力  
11 な作用を示すことから、医薬品などの安全性確保のために管理  
12 すべき物質として位置づけられている。エンドトキシン試験法  
13 (4.01) は、カプトガニの血球抽出成分より調製されたライセ  
14 ート試薬を用いて、エンドトキシンを高感度に検出できるイン  
15 ビトロ試験法であり、注射剤などに適用される。一方、カプト  
16 ガニの保護、試薬の安定供給、試薬ロット間差の解消及び試験  
17 の安定性の向上を目的に、ライセート試薬に代わるものとして  
18 遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬が開  
19 発された。

20 本参考情報では、エンドトキシン試験法におけるライセート  
21 試薬及び測定方法に加え、遺伝子組換えタンパク質を利用した  
22 エンドトキシン測定試薬を用いて代替法とする際の測定及び測  
23 定上の留意点を示す。

### 24 1. エンドトキシン試験法の測定原理

25 エンドトキシン試験法は、カプトガニ (*Limulus*  
26 *polyphemus*又は*Tachypleus tridentatus*)の血球抽出成分より  
27 調製されたライセート試薬を用いて、エンドトキシンを検出又  
28 は定量する方法である。これは、カプトガニの血球抽出成分が  
29 エンドトキシンにより凝固する反応を利用した試験法であり、  
30 その凝固反応はエンドトキシンにより引き起こされる複数のセ  
31 リンプロテアーゼによる連鎖反応に基づいている(図1)。エン  
32 ドトキシンがカプトガニの血球抽出成分に含まれるC因子を活  
33 性化して活性型セリンプロテアーゼに変換し、それが次のB因  
34 子、更に凝固酵素前駆体を連続的に活性化して、最後に凝固性  
35 タンパク質であるコアギュローゲンがコアギュリンに加水分解  
36 されると、不溶性のゲルが形成されて凝固する。また、カプト  
37 ガニの血球抽出成分は、エンドトキシンだけでなくβ-グルカ  
38 ンにも反応し、G因子から始まる連鎖反応により凝固する。

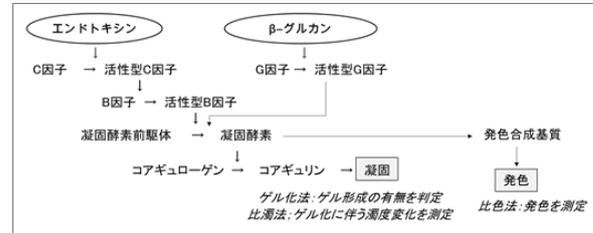
### 39 2. エンドトキシン試験法における測定方法

40 エンドトキシン試験法(4.01)には、ライセート試液のゲル  
41 形成を指標とするゲル化法及び光学的变化を指標とする光学  
42 的定量法がある(図1)。

43 ゲル化法は、ゲルの形成の有無を目視で確認する方法であり、  
44 判定には特別な機器を必要としない。ゲル化法には限度試験法  
45 及び定量試験法があり、前者は被検試料が各条に規定されたエン  
46 ドトキシン規格を超えるエンドトキシンを含むか否かを、ライ  
47 セート試薬の表示感度を指標として判定することを目的とす  
48 る方法で、後者は被検試料中のエンドトキシン量を、ゲル化反  
49 応を示した最大の試料希釈倍数(エンドポイント)を求めること  
50 により定量する方法である。

51 光学的定量法には、比濁法及び比色法がある(図1)。いずれ  
52 もライセート試液と試料溶液を混和し、一定時間後又は経時的

53 に反応液を分光光度計で測定する。比濁法は、ライセート試液  
54 のゲル化に伴う濁度変化を吸光度又は透過率を用いて測定する  
55 方法で、比色法は、エンドトキシンとライセート試液との反応  
56 により、発色合成基質から遊離される発色基の量を吸光度又は  
57 透過率を用いて測定する方法である。



58 図1 エンドトキシン試験法における測定原理及び測定法  
59

### 60 3. エンドトキシン試験法に用いる試薬

61 エンドトキシン試験法に用いるライセート試薬は、各測定法  
62 に対応した複数の試薬がある。エンドトキシン及びβ-グルカ  
63 ンに対する反応性から試薬を分類すると、C因子から始まる反  
64 応系及びG因子から始まる反応系の両方を含む試薬と、G因子  
65 を除去、又はG因子系の反応を抑制し、C因子から始まる反  
66 応系によりエンドトキシンのみを検出する試薬に分類され、被  
67 検試料や試験の目的に応じて選択する。

68 ゲル化法に用いるライセート試薬には、凝固(ゲルの形成)を  
69 呈する最小濃度のエンドトキシン濃度が表示感度(エンドトキ  
70 シン単位(EU)/mL)として試薬メーカーにより設定され、表示  
71 されている。その表示感度を指標として被検試料の適否が判定  
72 される。正確な試験結果を得るために、エンドトキシン試験法  
73 (4.01)の4.1.予備試験 4.1.1.ライセート試薬の表示感度確認  
74 試験により、表示感度が適切であることを確認する。幾何平均  
75 エンドポイント濃度が規定の範囲内でない場合は、試験条件を  
76 整備して再試験を行う。再試験においても幾何平均エンドポ  
77 イント濃度が規定の範囲内でない場合は、そのライセート試薬は  
78 使用できない。

79 光学的定量法に用いるライセート試薬は、比濁法、比色法の  
80 いずれにおいても、定量濃度範囲内で3濃度以上の標準溶液に  
81 より検量線を作成するが、エンドトキシン試験法(4.01)の5.3.  
82 予備試験 5.3.1.検量線の信頼性確認試験により、試験者の試  
83 験操作及び試験条件が適切であることを確認する。光学的定量  
84 法に用いるライセート試薬には、表示感度は表示されていない  
85 が、検量線に用いた最小の標準溶液濃度が表示感度に相当する。

86 医薬品の多くは、エンドトキシン試験において、程度には差  
87 はあるが何らかの反応干渉作用を示す。一般に、試料溶液に存  
88 在する反応干渉因子の影響は希釈により回避できることが多い  
89 が、その場合、エンドトキシン試験用水などで最大有効希釈倍  
90 数を超えない範囲で希釈して測定する。最大有効希釈倍数は、  
91 許容される試料溶液の最大の有効希釈倍数であり、エンドトキ  
92 シン試験法(4.01)の3.最大有効希釈倍数の求め方に示されて  
93 いる通り、ゲル化法に用いるライセート試薬については表示感  
94 度、光学的定量法に用いるライセート試薬については検量線の  
95 最小濃度が $\lambda$ であり、 $\lambda$ が小さいほど最大有効希釈倍数が大き  
96 くなる。光学的定量法に用いるライセート試薬の $\lambda$ は、ゲル化  
97 法に用いるライセート試薬の $\lambda$ より小さい試薬が多い。被検試  
98 料に含まれる反応干渉因子が明確な場合は、それを取り除く処  
99 理を行う。取り除くことができない、あるいは反応干渉因子が

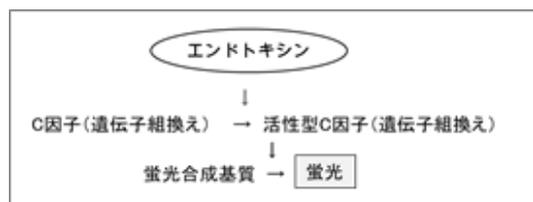
100 明確でなく、反応干渉作用が回避できない場合は、他のライセ  
101 ート試薬を用いるか、測定法を変更することを検討する。

#### 102 4. 遺伝子組換えタンパク質を利用したエンドトキシン測定試 103 薬を用いて代替法とする際の測定及び測定上の留意点

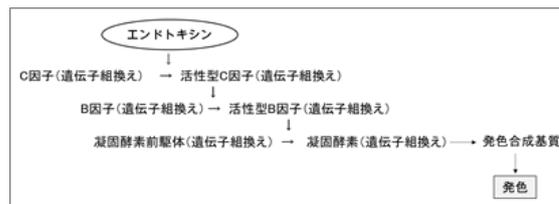
104 遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬は、  
105 カプトガニ(*Carcinoscorpius rotundicauda*又は*T. tridentatus*)  
106 の血球抽出成分に含まれるC因子の遺伝子組換えタンパク質を  
107 主体とした試薬、カプトガニ(*T. tridentatus*)の血球抽出成分  
108 に含まれるC因子、B因子及び凝固酵素前駆体の遺伝子組換え  
109 タンパク質で構成される試薬の2種類に分類される。前者のC  
110 因子(遺伝子組換え)を主体とした試薬は、エンドトキシンがC  
111 因子(遺伝子組換え)を活性化し、活性化C因子(遺伝子組換え)  
112 が蛍光合成基質に作用することにより生じる蛍光量を測定する  
113 (図2a)。後者の三種類の遺伝子組換えタンパク質で構成される  
114 試薬は、比色法の測定法と同様に、エンドトキシンがC因子  
115 (遺伝子組換え)を活性化し、それがB因子(遺伝子組換え)更に  
116 凝固酵素前駆体(遺伝子組換え)の連続的な活性化により、発色  
117 合成基質から遊離される発色基の量を測定する(図2b)。いず  
118 れの試薬も、試液と試料溶液を混和し、37±1℃で保ち、一定  
119 時間後又は経時的に反応液を光学的に測定する方法で、蛍光強  
120 度又は吸光度を測定する。

121 遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬は、  
122 エンドトキシン試験法(4.01)で規定されている「カプトガニ  
123 の血球抽出成分より調製されたライセート試薬」には該当しな  
124 い。エンドトキシン測定試薬を用いて代替法とする際は、ライ  
125 セート試薬を用いたエンドトキシン試験法(4.01)と比較して、  
126 同等以上の真度、精度、感度、特異性などが得られることを確  
127 認する。遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定  
128 試薬のうち、感度、特異性などがライセート試薬を用いた方法  
129 と同等以上であることが報告されているものがある。医薬品な  
130 どのエンドトキシン試験を遺伝子組換えタンパク質試薬を用い  
131 て行う際は、エンドトキシン試験法の光学的定量法と同様に、  
132 検量線の信頼性確認試験も実施する必要がある。その場合、検  
133 量線の最小濃度がλ(EU/mL)に相当する。また、反応干渉作  
134 用について留意する必要がある。反応干渉因子試験も実施する。  
135 特に、蛍光量を測定する方法では、蛍光の発生を阻害するよう  
136 な、ライセート試薬での測定では影響のなかった物質が干渉作  
137 用を示すこともあるため注意が必要である。また、エンドトキ  
138 シン試験法で規定されているカプトガニ(*L. polyphemus*又は  
139 *T. tridentatus*)と異なるカプトガニのC因子の遺伝子情報をを用  
140 いて作製した試薬については、そのC因子(遺伝子組換え)の違い  
141 がエンドトキシンに対する反応性に影響を及ぼす可能性につ  
142 て留意すべきである。

143  
144  
145



143 図2a 遺伝子組換えC因子を主体とするエンドトキシン測定  
144 試薬  
145



146 図2b 遺伝子組換えタンパク質3種類で構成されるエンドト  
147 キシン測定試薬  
148  
149