

非経口投与薬のエンドトキシン規格の設定方法案

小川 義之

A Proposal by the Japanese Pharmacopoeia for a Method to Set an Endotoxin Limit for Parenteral Drugs to be Tested

Yoshiyuki Ogawa

The Bacterial Endotoxins Test has been extensively revised in the JP 13. In addition to the limit test with gelation, adopted in the JP 12, quantitative methods using gel-clot, turbidimetric and chromogenic techniques have been adopted in the JP 13. As for the endotoxin limit for monographs, it was specified for Water for Injection alone in the JP 12. Since the issue of the JP 13 Supplement is under consideration, the possibility of replacing the Pyrogen Test (which is required for some main products in the current JP 13 monographs) with the Bacterial Endotoxins Test is now being discussed. For international harmonization of the Bacterial Endotoxins Test, it seems to be preferable to follow (if acceptable) the FDA method that was established in 1987 to set an endotoxin limit for products intended for parenteral use. This would then be followed by both the USP and EP. Thereby a draft for the Method to set the Endotoxin Limit, which is to be described in the Information chapter of the JP 13 Supplement, is being prepared. This report details an explanation of the draft, the definition of the endotoxin unit (EU) and its defined process, and the compliance with the replacement of the Pyrogen Test by the Bacterial Endotoxins Test, etc.

Keywords : bacterial endotoxins test, pyrogen test, endotoxin limit, parenteral drug, international harmonization

(Received May 30, 1997)

日局12の各条でエンドトキシン規格値が設定されていたのは注射用水のみであったが、日局13の各条において発熱性物質試験法が適用されている注射剤を主な対象として、日局13の第1追補でエンドトキシン試験法に切り替えるように作業が進められている¹⁾。

各条のエンドトキシン規格値を定めるための方法は、既

に USP と EP で準拠して行われている1987年のFDAのガイドライン²⁾の方法に日局も準拠することが国際調和の観点からも望ましいものと考えられる。したがって、現在、日局の参考情報に収載するエンドトキシン規格の設定方法の作成作業がなされている。

まず最初にエンドトキシン規格値の設定法(案)の説明を行い、次いで「エンドトキシン規格」についての理解を容易にするために若干の解説を行う^{*)}。

エンドトキシン規格値の設定法

非経口投与薬のエンドトキシン規格値は、下記の方法に従って設定される。

$$\text{エンドトキシン規格値} = \frac{K}{M}$$

ただし、K値(EU/kg)は、発熱を誘起するといわれる体重kg当たりのエンドトキシンの量であり、投与経路による区分に基づき、次のように設定される。

脊髄腔内投与薬を除く非経口投与薬では5.0EU/kgであり、脊髄腔内投与薬では0.05EU/kgである。

また、M値は体重kg当たり1時間以内に投与する最大量である。M値の単位は、投与量が製剤の容量に基づく場合はmL/kg、主薬の質量に基づく場合はmg/kg又はmEq

^{*)} 本ステートメントは、日本薬学会第117年会レギュラトリーサイエンス討論会(1997.4 東京)にて発表した内容をまとめたものである。

²⁾ 脊髄腔内投与薬のK値は、USPとEPのガイドラインではそれぞれ0.2 EU/kg及び0.2IU/kgとなっているが、日局はこの値を0.05 EU/kgとするように提案している。
なお、USPとEPのガイドラインには放射性医薬品のK値についても2.5 EU/kg(通常非経口投与薬の1/2)と定めているが、この1/2に定めた根拠が明確に示されていないことと、放射性医薬品の規格設定については日局の担当ではないことから、放射性医薬品についての提案はなされていない。さらに、USPでは体表面積に基づいて投与される抗癌剤については、次の式によりエンドトキシン規格値が設定されている。

$$\text{Endotoxin Limit} = \frac{K}{M \times 1.80 \text{sq.m}}$$

where K = 5 EU/kg and M = Maximum dose/kg/hour.

³⁾ 3局がそれぞれ有するエンドトキシン標準品の整合性を図るため、1998年11月から翌年の2月末にかけてWHOの主催により国際共同研究が行われた。これには13カ国から26機関が参加し、我が国からは7機関が参加した。この国際共同研究結果に基づいてUSPの新ロットエンドトキシン標準品(lot F=EC-6)がWHOの第2回目のエンドトキシン標準品として設定され、IUとEUは等しい単位であると定められた。WHOは現行のUSP、JP及びEPのエンドトキシン標準品は新規のWHO標準品に対して、[continuity of unitage]を有しているとの見解を示している。

/kg, 主薬の単位に基づく場合は Unit/kg でそれぞれ表す^{*2)}。

M 値は、それぞれの製剤につき「体重 kg 当たり 1 時間以内に投与される最大量」と定義されることから、主薬含量の単位表現の差異 (mg, mEq, Unit) により、各条におけるエンドトキシンの限度規格は異なる単位で表現されることになる (EU/mg, EU/mEq, EU/Unit)。その他、注射液量に基づいて投与される注射剤の場合は、限度規格は EU/mL の単位で表現される。

M 値の設定に関しては、FDA 及び EP のガイドラインを参考にした。1987 年の FDA ガイドライン²⁾では、ウサギによる発熱試験での投与量と臨床での投与量とを比較して、より多い方の投与量を選択していた。しかし、1992 年にこのガイドラインはヒト投与量にのみ基づくように修正がなされている。また、EP のガイドライン³⁾もヒト投与量に基づいている。したがって、ウサギ投与量との関係は原則的には考慮されていない。

K 値 (EU/kg) は、本案では FDA 及び EP のガイドラインと同様に、末梢からの投与のときは 5.0 となっている。しかし、脊髄腔内投与薬の K 値は、本案では 0.05 であり、これは FDA 及び EP のガイドラインにおける 0.2 よりもさらに 4 倍厳しくなっている。エンドトキシンを中枢へ投与すると末梢からの投与に比較して、発熱作用は数百分の一の量で認められることが古くから知られている。リムルス試薬のエンドトキシンに対する測定感度は、その開発当初よりも飛躍的に高まっており、また、比色法や比濁法で行えばゲル化法よりも測定感度がよいことより、脊髄腔内投与薬の K 値を末梢投与の場合の 1/100 に設定しても測定上での問題はないものと考えられる。

K/M に基づいて設定されるエンドトキシン規格値は、体重 kg 当たりに基づいて投与される注射剤の場合は、欧米人の平均体重 (70kg) と日本人の平均体重 (60kg) との差は、エンドトキシン規格値に影響しない (注射剤のエンドトキシン規格値は欧米と同じでよい)。全量を投与する形態の注射剤の場合は、本案の方が FDA 及び EP のガイドラインによる規格値よりも 1 割程度 (日本規格値 = 欧米規格値 $\times$ 60/70) 厳しくなる。

輸液等の大容量の注射剤については、日局のエンドトキシン規格値は USP23 及び FDA ガイドラインの規格値と同様に 0.5 EU/mL と設定される。これは、M 値は「体重 kg 当たり 1 時間以内に投与される最大量」という定義には必ずしも当てはまっていない。しかし、これは生理食塩液やブドウ糖注射液等のいわゆる大用量注射剤 (LVP) の品質確保が、ウサギを用いた発熱性物質試験法によって長年の間行われた実績と関連している。

エンドトキシン規格値は、エンドトキシンの最小発熱量に相当するものである。したがって、規格値未満を適合と

する判定基準でなければならない。

以下に、「エンドトキシン規格」についての理解を容易にするために若干の解説を行う。

エンドトキシン単位

エンドトキシン単位 (Endotoxin Unit: EU) は、米国 FDA が定めたものである。エンドトキシンの発熱活性は、抽出したグラム陰性菌の基原、エンドトキシンの精製度、あるいはエンドトキシンの分散状態などによっても異なるが、ウサギに対する最小発熱量は 0.001 ~ 2 μ g/kg である。

FDA は 1980 年に *E. coli* O113:H10K から抽出精製した第 2 回目のロット (EC-2, バイアル当たり 1 μ g) を製造して、これを 5,000 EU/vial (5 EU/ng) と定めた。FDA の第 5 回目のロット (EC-5) から第 1 回 WHO エンドトキシン標準品が設定されたが、USP も EC-5 を原料として製造したものを lot F のエンドトキシン標準品として販売するようになった。しかし、このときのエンドトキシン単位は、バイアル当たりのエンドトキシン充てん量は EC-2 のときと同じく 1 μ g であったが、エンドトキシン試験 (ゲル化法による) の結果、EC-5 は EC-2 よりもおよそ 2 倍活性が強いことが示された。したがって、USP のエンドトキシン標準品は 10,000 EU/vial (10 EU/ng) として販売されている^{*3)}。日局の RSE は、*E. coli* UKT-B 株から抽出精製されたエンドトキシンであり、日局の RSE の力価は EC-5 を基準にしてゲル化法により 16,000 EU/vial と標定されたものである⁴⁾。

エンドトキシン試験法と発熱性物質試験法の関連性

医薬品原薬及び注射剤に対するエンドトキシン汚染の危険性は、従来より、エンドトキシンの発熱活性を指標として試験されるウサギを用いた *in vivo* の発熱性物質試験法によってチェックされてきた。発熱性物質試験法が開発されて 1942 年の USP 12 に収載されたのは、当時の輸液等の大容量注射剤 LVP による発熱事故の多発の原因が、LVP の製造に用いられた水のエンドトキシン汚染に起因することが解明されたためであった。発熱性物質試験法の当初の目的が主として LVP を対象としたエンドトキシンの汚染チェックであったことと、この試験法の感度が十分ではないため、ウサギに対して原則的には 10 mL/kg を投与して試験が行われた。したがって、発熱を惹起しやすい投与経路である静脈内投与による注射剤で、かつ、比較的投与量の多い注射剤 (10 mL 以上の容量のもの) が発熱試験の対象とされてきた。

化学合成医薬品よりなる注射剤の投与によって惹起される発熱事故の原因は、大部分が溶剤として用いられる水のエンドトキシン汚染によることが多いという事実と、さらに、容量が 10 mL 未満の注射剤をウサギに 10 mL/kg を投与すれば、その薬理作用によってエンドトキシンの発熱作用を修飾したり、ウサギが死亡することがあるために、局方

の製剤総則では10mL以上の容量の注射剤が発熱試験の対象となっている。しかし、医薬品各条において、例えば、ヘパリンナトリウム注射液の場合のように2.0mL/kgの投与量で行うように規定されている場合もあり、注射剤の安全性確保のために容量が10mL未満の注射剤についてもエンドトキシン試験法を将来的には適用することが望ましいであろう（USPではエンドトキシン試験法の適用に対する容量規定はなく、また、注射剤原末についてもエンドトキシン規格値を設定しているものがある）。

従来よりエンドトキシンがパイロジェンの同義語として用いられるほど注射剤による発熱原因物質はエンドトキシンと見なされている。グラム陽性菌由来の発熱性外毒素あるいはウイルスなどの発熱性因子は、熱に対する抵抗性が弱いので加熱滅菌された製剤では失活してしまう。グラム陽性菌の菌体成分による発熱は、細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンであることが明らかにされているが、その発熱活性はエンドトキシンの数千～数万分の一である。加熱死菌を発熱性物質試験法で比較した場合、グラム陰性菌で発熱が認められるのは $10^3 \sim 10^5$ cells/mLであるのに対して、グラム陽性菌では 10^6 cells/mLないしはそれ以上を必要とする。黴、酵母の場合は発熱因子の本体は、なお明らかではないがグラム陽性菌よりもさらに弱い活性を示す。

上述の根拠により、エンドトキシン試験法と発熱性物質試験法の測定原理は異なるものの、医薬品自体の薬理作用による体温調節機構の障害等に起因する発熱（これは当然発熱試験により医薬品の開発段階でチェックされるが）を除いて、原薬及び製剤中に混入するかも知れない微量のエンドトキシンを検出しようとする試験目的は同一である。したがって、エンドトキシン試験の適用性に関する十分なバリデーションが行われるなら、発熱性物質試験法の代替試験法として、エンドトキシン試験法を採用することができる。

エンドトキシンの発熱活性はエンドトキシンの溶解状態（主としてエンドトキシンのミセルサイズの大きさの変化）によって変動することより、注射剤の組成成分によって発

熱活性が増強または減弱される可能性もありうる。このようなエンドトキシンの分散状態の変化による発熱活性の変化はエンドトキシン試験法におけるリムルス反応性とよく並行していることよりほとんど問題とはならない。

しかし、注射剤がエンドトキシンに対する生体反応性を高める場合もあり得る。例えば、抗癌剤 Actinomycin D や Cyclophosphamide などはエンドトキシンの致死活性を著明に増強させる⁵⁾ので、エンドトキシン規格値の設定に際しては単純に本エンドトキシン規格の設定方法（日局では「参考情報」、USPとEPではガイドラインとして記載されており、いずれも non-mandatory な取扱となっている）を適用して規格値を設定することは避けなければならない。医薬品各条に収載されている注射剤のように、これまで既に長年の間発熱性物質試験法によって担保されてきたものについては、反応の阻害或いは促進作用の有無に関する詳細な検討を行った上で、エンドトキシン試験法に切り替えていくことは妥当であると考えられる。しかし、発熱性物質試験法での実績が乏しい注射剤や新規の注射剤にエンドトキシン試験法の適用を図るに際しては、それらの注射剤にはエンドトキシン以外の発熱性物質の存在が否定できるということだけではなく、生体機能を修飾することによって、エンドトキシンの発熱性や毒性に対する増強作用が無いかについても検討する必要がある。

文 献

- 1) 日本薬局方フォーラム, 6 (1), 14~30 (1997)
- 2) U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration (1987): Guideline on validation of the limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices.
- 3) Official announcement (1994). VIII. 16 Test for bacterial endotoxins. PHARMEUROPA, 6, No. 4, December, 389~394.
- 4) 日本薬局方フォーラム, 2 (1), 46~51 (1993)
- 5) Bradley, S. G.: Interactions between endotoxin and protein synthesis. In Handbook of Endotoxin, Vol. 3, pp 340~371, Berry, L. J. (Ed), Elsevier Science Publishers B. V. (1985)