

《技術報告》

プラス荷電フィルターを用いた PET 薬剤の 短時間エンドトキシン試験法

中沢 暢弥* 脇田 員男* 峯浦 一喜** 中村 勝*
 藤井 亮* 中西 裕智* 宇治 葉子*** 松浦 史良*
 伊谷 賢次* 金網 隆弘* 井戸 達雄**** 今堀 良夫**

要旨 PET 薬剤は半減期が短いため、事前にエンドトキシン試験を行うことが困難な場合がある。定量試験法にはリムルス試薬および比濁時間分析装置を用いたシステムが考案されているが、これにプラス荷電フィルターを組み合わせることで、試験に要する時間の短縮が可能であるか検討した。結果、プラス荷電フィルター濾過により、既知濃度のエンドトキシンを添加した $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ から 99.5% 以上が除去できると判明した。このフィルターと比濁時間分析法との組み合わせは、投与前 5 分間の検査にてエンドトキシン試験の適否を判断することを可能にした。薬剤の安全性確保に事前の確認検査は必須であると考えられるが、本法はこれに対応できる有効な方法であることが示唆された。

(核医学 39: 543-548, 2002)

I. はじめに

従来から、医薬品製造工程の中で各種フィルターがエンドトキシン除去の目的で使用されてきた。エンドトキシン除去方法には大きく分けて 2 通りの方法がある。一つはエンドトキシンのサイズ¹⁾に基づき除去する方法であるが、この方法で除去できる場合は限定される。他方、吸着作用によって除去する方法は、イオン結合や疎水結合を原理としている。プラスに荷電修飾されたフィルターは後者を利用したものである。これにはマイ

ナス荷電を持つ異物に対する吸着作用が与えてあり^{2,3)}、エンドトキシンが有するマイナスの電荷との間に発生するイオン結合に基づくと考えられている。

PET 薬剤においてエンドトキシン試験を行うとき、半減期が非常に短いため、投与前に確認検査を行うことが困難な場合が生じてくる。そこで、今回われわれはプラス荷電フィルターを用いて、エンドトキシンが確実に除去できるかを確認した。そしてこのフィルターと、エンドトキシン定量試験法である比濁時間分析法を組み合わせることにより、試験に要する時間を短縮できるか検討した。

II. 実験方法

1. 機器・試薬

プラス荷電フィルターとして、ディスポーザブルタイプのメンブランフィルターであるゼータポアディスポ (直径 25 mm, 膜孔径 0.20 μm ; キュノ) を用いた。リムルス試薬 (LAL) はエンドトキ

* 西陣病院

** 京都府立医科大学脳神経外科

*** 和光純薬工業株式会社

**** 東北大学サイクロトロン RI センター

受付: 14 年 2 月 25 日

最終稿受付: 14 年 8 月 5 日

別刷請求先: 京都市上京区五辻通六軒町

西入溝前町 1035 (☎ 602-8319)

西陣病院 PET 室

中沢 暢弥

シン-シングルテストワコー⁴⁾ (和光純薬, lot No. DM792) を, エンドトキシンは国立医薬品食品衛生研究所より頒布されている凍結乾燥 10,000 標準品 (Control 971) を用いた. エンドトキシンの測定にはトキシノメーター ET-201^{5,6)} (和光純薬) を用いた. トキシノメーターは, LAL とエンドトキシンとのゲル化反応⁷⁾ を透過光量の変化として捉え, 判定する. 反応開始からゲル化の判定がされるまで (透過光量比 95%) の時間をゲル化時間として測定した.

2. フラッシングの効果

プラス荷電フィルター (ゼータポアディスコ) を使用する際には, 濾過の初期にエンドトキシンが溶出する場合があるため, フラッシングで除去する必要がある. フラッシング液として注射用蒸留水を用い, 溶出がなくなる液量を確認した. 比濁時間分析法で測定し, 120 分以上でもゲル化が起こらないものをエンドトキシン・フリーとした.

3. 吸着効率と pH およびイオン強度の関係

上記フィルターの吸着原理はイオン結合によるので, 対象となる液体中のマイナスイオンの存在状態, すなわち pH とイオン強度の程度が吸着能力に影響を与える. そこで, pH およびイオン強度と吸着効率との関係を検討した. まず試料の pH を一定にさせるための緩衝液として, Britton-Robinson buffer を調製した. これは, リン酸・酢酸・ホウ酸の混合液中で NaOH 溶液の濃度を変えることによって pH 調整を行うものである. エンドトキシン溶液に濃度の異なる 4 種類の NaCl 水溶液, および Britton-Robinson buffer を加え, 終濃度 100 EU/mL としたものをサンプルとした. サンプル 5 mL をフラッシングしたフィルターを用いて濾過し, 比濁時間分析法で測定した.

4. PET 薬剤からのエンドトキシン除去

エンドトキシン・フリーの PET 薬剤に既知濃度のエンドトキシンを添加し, その除去率について検討した. 対象とした薬剤は 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG) と Sodium-[¹⁸F]fluoride ([¹⁸F]NaF) である. PET 薬剤 10 mL と 10,000 EU/mL のエンドトキシン溶液 0.1 mL を混

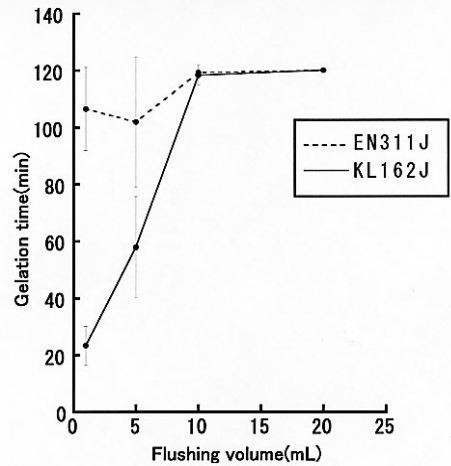


Fig. 1 Effect of flushing with distilled water. Measurement was performed with Toxinometer for 120 min (n = 4-6).

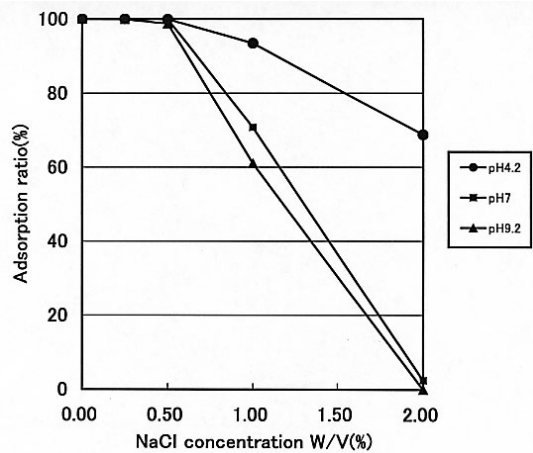


Fig. 2 Salt and pH effect on endotoxin adsorption by positively charged filter. 100 EU/mL endotoxin in 5 mL of 10 mM buffer added with NaCl of different percentage was passed through a filter (After flushing with 10 mL of distilled water).

合し, 終濃度 100 EU/mL としたものをサンプルとした. サンプル 5 mL をフラッシングしたフィルターを用いて濾過し, 比濁時間分析法で測定した.

Table 1 Endotoxin removal from PET radiopharmaceuticals [¹⁸F]FDG (A) and [¹⁸F]NaF (B) by positively charged filter

A			
Solution	Initial concentration (EU/mL)	Concentration in filtrate	
		EU/mL	Removal (%)
¹⁸ FDG	100	6.58 0.24**	93.42 99.76**
¹⁸ FDG dilution (5 ×) distilled water	100	0.001 >	99.99 <
¹⁸ FDG dilution (5 ×) NaCl (0.9%)	100	6.58 0.30**	93.42 99.70**
B			
Solution	Initial concentration (EU/mL)	Concentration in filtrate	
		EU/mL	Removal (%)
Na ¹⁸ F	100	7.74 0.15**	92.26 99.85**
Na ¹⁸ F dilution (5 ×) distilled water	100	0.001	99.99
Na ¹⁸ F dilution (5 ×) NaCl (0.9%)	100	6.58 0.13**	93.42 99.87**

Each solution was contaminated with the indicated concentration of endotoxin and passed through a filter (After flushing with 10 mL of distilled water). Results are averages of two experiments.

**passed through double filters.

III. 結 果

1. フラッシングの効果

フィルターからの濾過流量とゲル化時間の関係を Fig. 1 に示した。ロット間で大きく異なり、また同一ロットでも差異が認められた。しかしながら、前処置として約 10 mL の濾過があれば十分であると判断できたので、以下の実験は、すべて注射用蒸留水で 10 mL フラッシングしたフィルターを用いた結果である。

2. 吸着効率と pH およびイオン強度の関係

エンドトキシンの吸着率に対する塩濃度と pH の影響を Fig. 2 に示した。塩濃度、すなわちイオン強度が小さければ pH による影響を受けずに良好な吸着率が得られるが、塩濃度が上がるにつれて吸着率は低下することが確認できた。また、酸性側で吸着率がよいと判断された。

3. PET 薬剤からのエンドトキシン除去

PET 薬剤からのエンドトキシン除去率を Table 1 に示した。フィルター 1 個の場合、¹⁸F]FDG 原液では 93%、¹⁸F]NaF 原液では 92% の除去率であった。フィルターを 2 個連結させた状態で使用した場合、¹⁸F]FDG 原液では 99.7%、¹⁸F]NaF 原液では 99.8% の除去率が得られた。注射用蒸留水で希釈した ¹⁸F]FDG では 99.9% 以上の除去率が得られたが、生理食塩液で希釈した ¹⁸F]FDG は原液の場合とほぼ同等の結果となった。これは ¹⁸F]NaF についても同様であった。

IV. 考 察

1. フィルターの評価

フィルターから溶出されるエンドトキシンは製造工程中の問題であるが、以前よりは改善されている。最新ロット No. は EN311J で、旧ロット No. の KL162J よりも溶出物に対する安全性は高いが、同一ロットでも差異が認められたことから、使用前のフラッシングは必要であると思われる。通常メンブランフィルターは、生物学的に安全な素材を使用し清浄環境下で製造されるはずである。本フィルターにおいても理想に近づくよう品質向上が図られている。しかし、より安全で確実な濾過を行うためには、使用する際にフラッシング操作は必要である。

フィルターの材質は、プラスに荷電修飾されたナイロン 66 製のフィルターメディアとポリプロピレン製のカプセルにより構成されている。エンドトキシンの構造中⁸⁾、リン酸基部位はマイナスの電荷を持っているため、これらの間に発生するイオン結合によって吸着が起こる。pH がアルカリ性に傾くほど、液中には OH⁻ イオンが増え

る。このとき、マイナスの電荷を持つ粒子と競合し、フィルターへの吸着力が低下する。一方イオン強度が大きい場合、液中にある粒子の表面電荷が中和されやすくなる。フィルター上のプラスの官能基がすべて使われ飽和することも考えられるため、その結果、吸着作用が減弱する。イオン強度の大きい液やアルカリ側の液で吸着力が低下する傾向は判明したが、物質の種類・製造方法、その他の条件により異なってくるため、ある試料でエンドトキシンが必ず除去できるかどうかは、単純に推定することはできない。実際に濾過する条件に近づけた状態で通液試験を行うことが必要である。

今回用いた $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ では、イオン遅滞樹脂を充填したカラムからの溶出に生理食塩液が使用されており、フィルター 1 個の使用でエンドトキシンの完全な除去ができなかった要因は溶出液にあると考えた。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の注射用蒸留水による希釈液は、フィルター 1 個で 99.5% 以上のエンドトキシンを除去可能である。それに対し、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 原液および生理食塩液による希釈液ではこれより除去率が低い。また原液と希釈液での差がないことから、エンドトキシン除去に影響を与えるものは生理食塩液、すなわちイオン強度のみと考えてよい。なおフィルターを 2 個連結させて使用すれば、いずれも 99.5% 以上の除去率を得ることが可能である。この傾向は $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ についても同様である。

また、フィルターの膜孔径が $0.20\ \mu\text{m}$ であることから、通常考えられる細菌であれば問題なく除去できる。

2. LAL の反応干渉因子試験

薬剤中のエンドトキシンを測定する場合、既知濃度のエンドトキシンを添加しその回収率を調べ、薬剤が LAL に及ぼす影響⁹⁾ について確認しなければならない(陽性製品コントロール, positive product control)。今回はフィルターからの濾過液を用いたが、すべて日本薬局方の規定 (50–200%) の範囲内であった。よって、今回実験した PET 薬剤は LAL に影響しないと判断した。

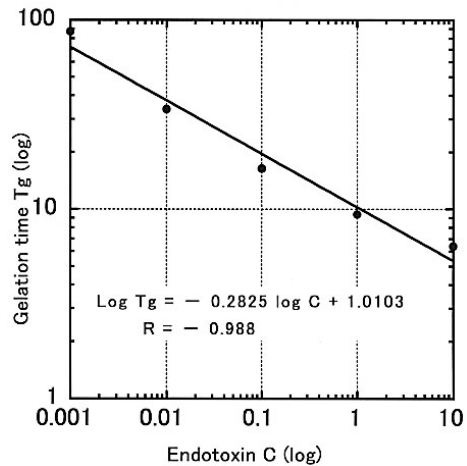


Fig. 3 Dose-dependent standard curve of endotoxin. NIHS reference endotoxin Control 971 was used as endotoxin standard.

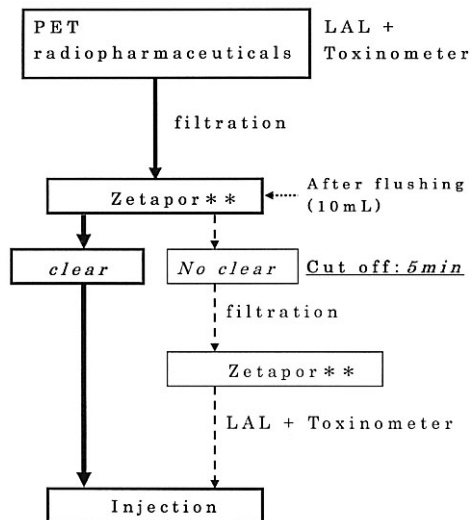


Fig. 4 A bacterial endotoxins test by Zetapor. ** passed through double filters.

また、L-3,4-dihydroxy-6- $[^{18}\text{F}]\text{fluorophenylalanine}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FDOPA}$) および 1- $[^{11}\text{C}]\text{butyryl-2-palmitoyl-rac-glycerol}$ ($[^{11}\text{C}]\text{DAG}$) において、LAL に影響を与えると思われるアスコルビン酸およびアルブミンについて、当院の使用条件下ではほぼ問題ない (data not shown)。

3. エンドトキシン試験に必要な時間

日本薬局方において、第十四改正より放射性医薬品のエンドトキシン規格値の設定が参考情報として記載され、 K/M (M は体重 1 kg 当たり 1 時間以内に投与する最大投与量) という式で表される。ここで、 K は発熱を誘起するといわれる体重 1 kg 当たりのエンドトキシン量 (EU/kg) で、放射性医薬品の場合は 2.5 と規定されている。また、体重 1 kg 当たりの最大投与量を算出するとき、平均体重として 60 kg を用いるため、エンドトキシン濃度は 150 EU/V (V : 最大投与量, 単位 mL) 未満と計算される。一回に院内で自家合成される PET 薬剤はおおよそ 20 mL 以下であり、また患者への最大投与量も 20 mL を超えることはないと思われる。そのときエンドトキシン濃度は、 7.5 EU/mL 未満であれば先の規定に適合する。実際の合成過程で 100 EU/mL ものエンドトキシンが混入することはありえないが、このような高濃度であっても 99.5% 以上除去できることが本実験の結果から判明している。このとき、薬剤中に残存しているエンドトキシンは 0.5 EU/mL 未満であり、放射性医薬品の規定に適合している。よって、 100 EU/mL の溶液が LAL のゲル化に要する時間が、エンドトキシン試験の適否に必要な時間であり、Fig. 3 の検量線より 5 分で判定可能である。

また、 $1,000\text{ EU/mL}$ での LAL のゲル化時間が 3 分であり、かつ $1,000\text{ EU/mL}$ の溶液でも 5 EU/mL 未満まで除去できることも確認済みである。これにより、通常は事後検定となる $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ にも本法を適応できることが示唆された。

今回われわれが提案する試験方法の概要を Fig. 4 に示す。手順は次の通りであるが、フィルターはあらかじめ 10 mL の注射用蒸留水でフラッシングしておく。合成された PET 薬剤をフィルター濾過する前に、トキシノメーターで測定開始する。測定時間中にフィルター濾過し、投与準備しておく (フィルターは 2 個連結させた状態で使用する)。5 分経過し LAL がゲル化しなければ、フィルター濾過した PET 薬剤はエンドトキシン試験に適合していると判断でき、即座に投与

開始する。もし 5 分後にゲル化の徴候があれば、再度フィルター濾過することで、応急的に対処できると考えられる。

V. まとめ

プラス荷電フィルター (ゼータポアディスコ) を用いて PET 薬剤のエンドトキシン試験に要する時間が短縮できるか検討した。その結果、プラス荷電フィルター濾過により、確実にエンドトキシンが除去できることが判明した。LAL およびトキシノメーターを用いた比濁時間分析法と組み合わせることによって、投与前 5 分間の検査にてエンドトキシン試験の適否を判断することが可能となった。このことより、 $[^{18}\text{F}]$ 製剤より半減期の短い PET 薬剤においても、安全性確保に有用であることが示唆された。

謝辞：本実験を遂行するにあたり、試料を提供していただきました和光純薬工業株式会社開発部：今村昭憲氏に感謝いたします。また、同社臨薬研究所：高岡文氏にご協力いただきましたことに、深く感謝いたします。

文 献

- 1) Sweadner KJ, Forte M, Nelsen LL: Filtration removal of endotoxin (pyrogens) in solution in different stages of aggregation. *Appl Environ Microbiol* 1977; 34: 382-385.
- 2) Hou K, Gerba CP, Goyal SM, Zerda KS: Capture of latex beads, bacteria, endotoxin, and viruses by charge-modified filters. *Appl Environ Microbiol* 1980; 40: 892-896.
- 3) Hou KC, Zaniwski R: Depyrogenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge. *J Parenter Sci Technol* 1990; 44: 204-209.
- 4) 土谷正和, 高岡 文, 時岡伸之, 松浦脩治: 大過剰のカルボキシメチル化カードランによる G 因子系阻害作用を利用したエンドトキシン特異的リムルステストの開発とその応用。日本細菌学雑誌 1990; 45: 903-911.
- 5) 大石晴樹, 畑山泰道, 白石浩己, 柳沢和也, 佐方由嗣: 並列比濁時間分析法によるエンドトキシンの自動測定。薬学雑誌 1985; 105: 300-303.
- 6) Oishi H, Takaoka A, Hatayama Y, Matsuo T, Sakata Y: Automated limulus amebocyte lysate (LAL) test for endotoxin analysis using a new Toxinometer ET-

201. *J Parenter Sci Technol* 1985; 39: 194-200.
- 7) Levin J, Bang FB: The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1964; 115: 265-274.
- 8) 川原一芳: エンドトキシンの分子構造. 中野昌

- 康, 小玉正智編, エンドトキシン 新しい治療・診断・検査. 講談社, 東京, 1995: 15-27.
- 9) 土谷正和: リムルス試験の利用とその現状. 防菌防黴 1990; 18: 287-294.

Summary

Short Time Bacterial Endotoxins Test for Positron Emission Tomography by Means of Positively Charged Filters

Nobuhiro NAKAZAWA*, Kazuo WAKITA*, Katsuyoshi MINEURA**, Masaru NAKAMURA*, Ryou FUJII*, Hiroto NAKANISHI*, Yoko UJI***, Shiyou MATSUURA*, Kenji ITANI*, Takahiro KANATSUNA*, Tatsuo IDO**** and Yoshio IMAHORI**

*Nishijin Hospital

**Department of Neurosurgery, Kyoto Prefectural University of Medicine

***Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

****Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University

Positron emission tomography (PET) radiotracers have very short physical half-lives. It is hard to complete a bacterial endotoxins test prior to release from medical institutes. For endotoxin quantitative determination, limulus ameocyte lysate (LAL) reagent and kinetic-turbidimetry system were previously developed. We investigated the possibility of a short time test by means of positively charged filters. As a result of this study, the effects of positively charged filters on endotoxin removal were over 99.5% for [^{18}F]FDG and [^{18}F]NaF, which were contaminated with the indicated

concentration of endotoxin. Combining this filter and the kinetic-turbidimetric method, it was possible to complete a bacterial endotoxins test in 5 min prior to the patient's administration. This test should be required prior to release for PET radiopharmaceutical quality control. It has been suggested that this combination is a good method for this purpose.

Key words: Positron emission tomography, Bacterial endotoxins test, Positively charged filters, Kinetic-turbidimetric method.