

《技術報告》

エンドトキシン測定法における検量線の保存利用の妥当性： 測定値の真値からの乖離と分散の検証

脇 厚生 *1,*2 森 哲也 *2 西嶋 剣一 *3 本城 和義 *4
 萱野勇一郎 *5 矢野 良一 *5 白石 浩巳 *6 高岡 文 *6
 清野 泰 *2 藤林 靖久 *1

要旨 院内製造 PET 薬剤の規格項目であるエンドトキシン測定を、品質と簡便性を両立して実施する方法として、保存した検量線の利用が挙げられる。今回、保存検量線を使用した場合に得られる測定値の真値からの乖離とその分散性を検討することで、保存検量線使用の妥当性を検討した。

保存検量線は、1日1本、3日間で作成した3本の検量線用データを使用して作成した。保存検量線作成者がエンドトキシン測定を実施した場合、保存検量線作成者と異なる実施者が測定した場合、ライセートロットが異なる場合について、標準溶液を使用し真値との関係性を確認したところ (n=108)、それぞれ真値に対して 85–127%、86–124%、64–156% を示した。

本検討により、詳細なプロトコルを厳密に適用することで、保存検量線の使用によりエンドトキシン測定値は真値に比較し大きく変動しないことが予想された。一方、ライセートロットの相違は大きく影響すると考えられた。

(核医学 50: 289–296, 2013)

I. 目 的

院内製造 PET 薬剤のエンドトキシン試験法は日本薬局方（以下、局方と記す）に準拠した方法で実施することが望ましいと考えられるが（日本

アイソトープ協会や日本核医学会の指針では「準用」とされている^{1,2)}）、毎日ロット製造される院内製造 PET 薬剤の場合、局方準拠法での実施はコスト負担も大きく、短時間での実施が困難であるケースもあり、完全準拠を行うのは現実的でない。これらの問題点の解決策として、局方で毎測定時に作成することが求められている検量線に代わり、あらかじめ保存した検量線を利用することが考えられるが、検量線を保存して別の日に使用するためには、保存した検量線が妥当な真度と精度でエンドトキシン濃度を与えられることが必要となる。本検討では、エンドトキシン試験法において保存検量線を使用した場合に得られる測定値の真値からの乖離とその分散の幅について検討した。また、検量線を保存して使用する場合に測定値に影響を与える因子について考察した。

今回使用する保存検量線は、米国 FDA (Food

-
- *1 放射線医学総合研究所
分子イメージング研究センター
 - *2 福井大学高エネルギー医学研究センター
 - *3 北海道大学大学院医学研究科先端医学講座
トレーサー情報分析学分野
 - *4 日本医科大学健診医療センター
 - *5 福井大学医学部附属病院薬剤部
 - *6 和光純薬工業株式会社 BMS 開発部

受付：25 年 3 月 26 日

最終稿受付：25 年 7 月 8 日

別刷請求先：

千葉県稲毛区穴川 4-9-1 (☎ 263-8555)

(独) 放射線医学総合研究所

分子イメージング研究センター

脇 厚生

and Drug Administration) が 1991 年に提出したガイダンス³⁾に従い、1 日 1 本、連続する 3 日間で構成される 3 本の検量線用データにより作成するものとした。本検討では、保存検量線作成者がエンドトキシン測定を実施した場合（併行再現性条件）、保存検量線作成者と異なる実施者がエンドトキシン測定を実施した場合（空間再現性条件）、ライセートロットが異なる場合（空間再現性条件）を想定し、3 施設、計 5 名の実施者が保存検量線を作成した。それぞれの条件で、保存検量線から得られたエンドトキシン濃度の、既知濃度からの乖離の度合い（エンドトキシンを添加して作製された標準溶液の濃度を既知濃度とし、それを 100% としたときの回収率）を求め散布図で示すことにより、変動幅について確認できるようにした。

なお本検討では、日本薬局方に準拠したエンドトキシン試験法を実施可能な機器・試薬を販売しているメーカーすべてに本検討に対する参加を打診し、参加の意向を示した和光純薬工業株式会社の機器および試薬を用いて検討した。

II. 方 法

(1) 使用機器

エンドトキシン測定装置として稼働性能適格性評価を実施した ET-6000/J およびその拡張モジュール、または ET-2000（両者とも和光純薬工業株式会社）を用いた。マイクロピペッターも校正を実施したものを使用した。

(2) 試薬・材料

希釈用のエンドトキシンフリーテストチューブ（292-32751 リムルステストチューブ-S（アルミキャップ付）、和光純薬）、エンドトキシンフリーのチップ 1000 μ l 用（294-31351 バイオクリンチップワコー 1000、和光純薬）、エンドトキシンフリーのチップ 200 μ l 用（298-32851 バイオクリンチップワコーエクステンド、和光純薬）、ライセート試薬（LAL、295-51301 リムルス ES-II シングルテストワコー、和光純薬、使用ロットは 132、136、137）、エンドトキシン標準品（CSE）は

ライセート試薬添付品、注射用水（大塚製薬）、アルミキャップ（293-28251 アルミキャップ S、和光純薬）

(3) エンドトキシンの希釈方法

エンドトキシンの希釈は供給元が提示する方法に従って実施した（Wako エンドトキシン試験法（2011 年 2 月改訂）「2. エンドトキシンの溶解及び希釈」）。エンドトキシン試験用水は注射用水 500 ml（大塚製薬）を用いた。またエンドトキシン標準品（CSE）は溶解して原液を冷蔵保存し、測定のつど希釈し用いた。希釈したエンドトキシン溶液は、使用まで室温保存し、使用は当日限りとした。濃度は、10、1、0.1、0.01 EU/ml で検討したが、日本薬局方 16 参考情報において示されている放射性医薬品の基準（2.5 EU/kg、すなわち 150 EU/60 kg で PET 薬剤が 20 ml の場合、7.5 EU/ml）および希釈による測定を勘案し、本評価では 10 EU/ml の濃度は解析には不必要と考え、1、0.1、0.01 EU/ml を使用レンジとして用いた。

(4) エンドトキシン測定法

測定開始の 20 分以上前に機器の電源を入れ、ライセート試薬も室温に 20 分放置して使用した。各濃度のエンドトキシン溶液を 20 秒攪拌した後、ライセート試薬に 0.2 ml 加え、約 5 秒間ボルテックスで攪拌し、トキシノメータにセットし測定を開始した。本検討で使用したカイネティック比濁法は、LAL 溶液の透過率がエンドトキシンにより初期値と比べ一定の閾値以下になる時間をゲル化時間として陽性判定を行う（トキシノメータでは 94.9% 以下になった時間から 24 秒後をゲル化時間としている）。測定は、エンドトキシンの各濃度を $n=2$ で実施した。検量線の作成は、試験法提供元の和光純薬の推奨法として、分散の均一性が高く直線性が良好である理由から、横軸にエンドトキシン濃度（LOG）、縦軸に時間（LOG-LOG）を取る方法で作成することとした。この検量線は、エンドトキシン濃度が高いほど短時間で陽性になり、濃度が低いほど陽性になるのに時間を要するため、傾きはマイナスである。

(5) 実施施設および実施者

実施は、福井大学高エネルギー医学研究センター（施設 F，実施者 3 名（FK，FM および FY）），北海道大学病院（実施者 H），日本医科大学健診医療センター（実施者 N）で実施した。

(6) 作成検量線

保存検量線は検量線 1 本分（各濃度 $n=2$ で 3 濃度，計 6 点）の測定を 3 日間実施し，得られたデータ（6 点 $\times$ 3 日分 = 18 点）を用いて作成した。各施設で作成した保存検量線は以下のとおりである。

1) 施設 F

実施者 3 名がライセート 1 ロット（ロット番号 132）について保存検量線を 3 本ずつ，すなわち計 9 本作成した。また，実施者 1 名が別のライセート 2 ロットを使用して保存検量線を 1 本ずつ作成した。

2) 施設 H および N

実施者 1 名がライセート 3 ロットを使用して保存検量線を 1 本ずつ作成した。

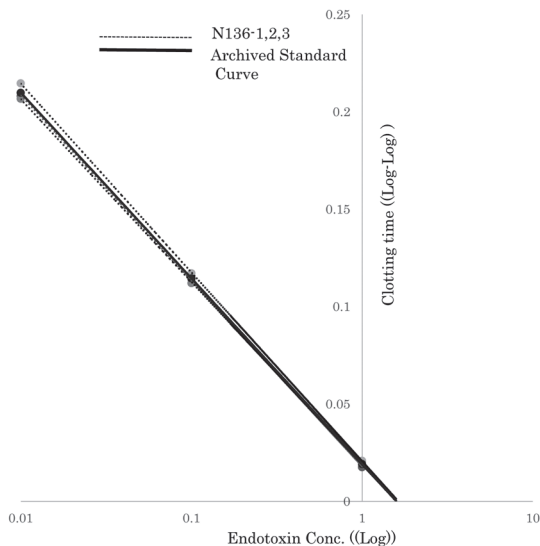


Fig. 1 Typical standard curves and the archived standard curve in this study. N136-1, 2 and 3 mean the facility code, the lot number of lysate and the assay timing respectively.

III. 結 果

(1) 保存検量線自己代入によるエンドトキシン保存検量線の測定値と真値との乖離幅

エンドトキシン保存検量線は，Fig. 1 に示したような 3 本の検量線のデータを使用して作成される。このエンドトキシン保存検量線を作成した測定値を，そのエンドトキシン保存検量線に自己代入することにより，エンドトキシン保存検量線を使用した時のエンドトキシン濃度の変動幅を確認した (Fig. 2)。具体的には，5 名の実施者 (FK，FM，FY，N，H) が作成した保存検量線に，その保存検量線の作成に使用した各濃度の標準溶液（それぞれ保存検量線 3 本分。FK，FM，FY に関してはロット 132 を，N，H に関してはロット 132，136 および 137 を使用（それぞれ $n=54$ ））

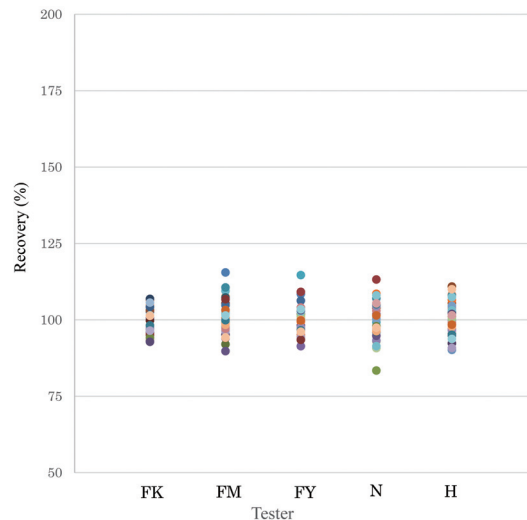


Fig. 2 Variation of the recovery rate of the standard solutions at self-substitution of the clotting time data in archived standard curves. Each tester produced three archived standard curves, and the data used for the standard curves were self-substituted in the archived standard curves as the standard solutions. Each endotoxin concentration of the standard solutions were calculated to Recovery (%) against the true values. FK, FM, FY, N and H mean the testers. This variation was considered the internal error level of this endotoxin assay system.

のゲル化時間を代入しエンドトキシン濃度を求め、標準溶液の既知濃度に対する乖離の程度（真値に対する回収率）を求め、実施者ごとに散布図で示した。各実施者によって幅があるが、エンドトキシン回収率は 83～115% の範囲であった。

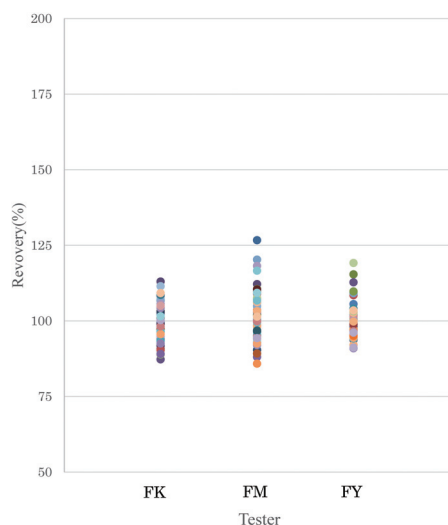


Fig. 3 Variation of the recovery rate of the standard solutions at substitution in archived standard curves obtained by the same tester. Each tester produced three archived standard curves, and the data used for each other archived standard curves were substituted as the standard solutions. Each endotoxin concentration of the standard solutions were calculated to Recovery (%) against the true values. FK, FM, FY mean the testers.

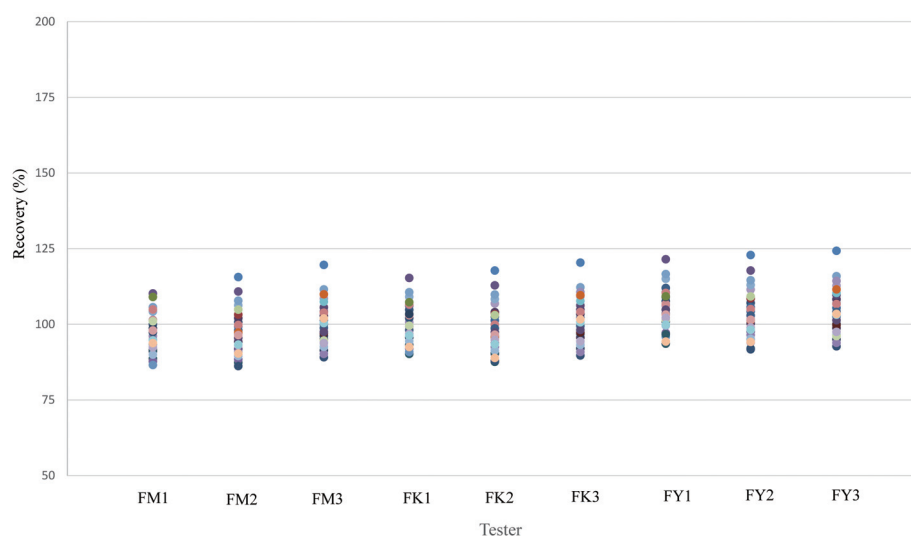


Fig. 4 Variation of the recovery rate of the standard solutions at substitution in archived standard curves obtained by each other tester. Each tester produced three archived standard curves, and the data used for each other archived standard curves were substituted as the standard solutions. Each endotoxin concentration of the standard solutions were calculated to Recovery (%) against the true values. FK, FM, FY mean the testers.

(2) エンドトキシン保存検量線を用いた時の測定値と真値との乖離幅

次に、保存検量線作成者が作成した保存検量線に対し、同じ実施者が測定した各濃度（真値）の標準溶液のゲル化時間を代入し、得られた濃度と真値との乖離の程度（回収率）を検討した (Fig. 3). 具体的には、施設 F の 3 名の実施者 (FK, FM, FY) が 3 本の保存検量線を作成し、それぞれの保存検量線に、同じ実施者が他の保存検量線を作成する際に使用した標準溶液のゲル化時間（保存検量線 1 本あたり別の保存検量線 2 本分のポイント； $n=108$ ）を代入し、標準溶液の既知濃度に対する回収率を求め、それを実施者ごとに散

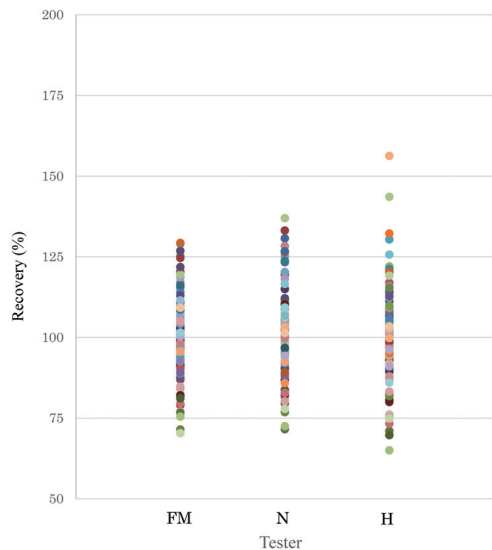


Fig. 5 Variation of the recovery rate at the difference in the lysate lots between the archived standard curve and the assay with the standard solutions. The recovery rates were varied greater than any other trials in this study. Three lots were assayed in each tester (FM, N and H).

布図で示した。その結果、3名の実施者で得られたエンドトキシン回収率は、85～127%の範囲であった。

(3) 異なる実施者が作成したエンドトキシン保存検量線を用いた時の測定値と真値との乖離幅

保存検量線作成者と異なる実施者が、各濃度の標準溶液を作成し、そのゲル化時間を保存検量線に代入したときに得られた濃度と真値との乖離の程度（回収率）を検討した (Fig. 4)。具体的には、施設 F の 3 名の実施者 (FK, FM, FY) がそれぞれ 3 本の保存検量線を作成し（それぞれ FK1, FK2, …）、別の実施者 2 名がそれぞれ 3 本の保存検量線を作成する際に使用した各濃度の標準溶液のゲル化時間を代入し (n=108)、標準溶液の既知濃度に対する回収率を求め、それを保存検量線ごとに散布図で示した。その結果、9 本の保存検量線に対し、保存検量線作成者とは別の実施者が作製した標準溶液のエンドトキシン回収率は、86～

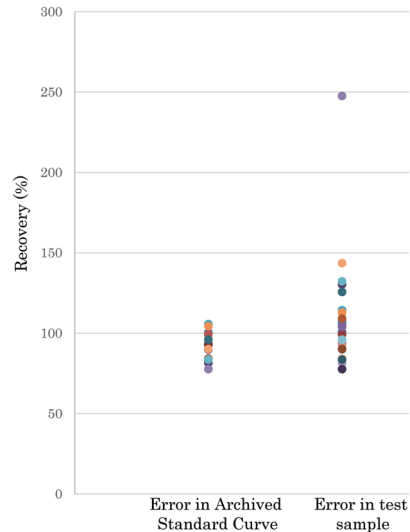


Fig. 6 An example of error data for shortened clotting time (Data is shown in Table 1): Error data in endotoxin test (as Error in test sample) caused great variation, but not in the preparation of the archived standard curves very much. However, please notice the bias of the recovery rates to lower direction, which is considered to decrease the safety margin due to false negative evaluation.

124% の範囲であった。

(4) 異なるライセートロットで作成されたエンドトキシン保存検量線の測定値と真値との乖離幅

ライセートのロットが異なる保存検量線を使用した場合の、得られたエンドトキシン濃度と真値との乖離の程度を検討した (Fig. 5)。3 名の実施者 (FM, N, H) が 3 種類のロットのライセートで保存検量線を 1 本ずつ作成し、それぞれの保存検量線に別のロットで保存検量線を作成する際に使用した各濃度の標準溶液のゲル化時間を代入し、標準溶液の既知濃度に対する回収率を求め、それを実施者ごとに散布図で示した。保存検量線作成者と実施者は同一である。その結果、ロットが異なる場合には 64～156% のエンドトキシン回収率の幅が観察された。

Table 1 Error data in H-facility at Lot 136

Endotoxin Conc. (EU/ml)	Clotting Time (min)					
	Day 1		Day 2		Day 3	
0.01	42.8	42.0	41.8	43.2	41.8	42.0
0.1	19.8	19.6	19.8	19.6	19.8	20.6
1	11.0	9.6*	11.0	9.6*	11.0	10.8

* shows much shorter clotting time than other experiments using Lot 136 (normal range: 11–11.2 min).

(5) エラーを含む測定値で作成したエンドトキシン保存検量線を使用した場合の測定値と真値との乖離幅

本検討で、1 EU/ml のエンドトキシン濃度としたライセートをトキシノメータにセットするのが遅れたケースが見られた (Table 1). この明らかなエラーデータを用いて、エラーデータを使用して作成された保存検量線がエンドトキシン試験に与える影響について、エラーを含まないデータを代入し、得られたエンドトキシン濃度と真値との乖離の程度を検討した (Fig. 6, Error in Archived Standard Curve). また逆に、明らかなエラーを含まないデータを使用して作成された保存検量線に、エラーデータを代入した際の真値との乖離の程度も合わせて検討した (Fig. 6, Error in test sample). その結果、2 点のエラーデータを使用して保存検量線を作成し、明らかなエラーを含まないデータを代入した場合の既知濃度に対する回収率は 77~104% であった. 一方、エラーデータを含まない保存検量線に 1 EU/ml のエラーデータを代入した場合は、真値 1 EU/ml が約 2.5 EU/ml と 2.5 倍の大きな変動 (104~248%) となった.

IV. 考 察

1) 保存検量線の妥当性の評価方法について

エンドトキシン試験の実施時ではなくあらかじめ別の日に作成しておいて使用する検量線が保存検量線である. その使用の妥当性を考察する場合、エンドトキシン試験実施時に作成した検量線と保存検量線の相違を検討することが考え方としては直接的であるが、検量線の直接比較による同等性の評価は手法的に困難であり、エンドトキシン標準溶液のゲル化時間に対して 2 つの検量線が

与えるエンドトキシン濃度の相違に置き換えて考えるのが理解しやすいと考えられる. そこで本検討では、2 つの検量線の比較だけではなく、様々な再現精度変動要因の中で得られた標準溶液のゲル化時間に対して保存検量線が与えるエンドトキシン濃度の真度と精度を検討することで、保存検量線の網羅的な信頼性を確認し、使用の妥当性を考察することを方針として検討を進めた.

2) 保存検量線を使用した場合のエンドトキシン濃度の変動について

本検討では、3 PET 施設において、保存検量線に既知濃度のエンドトキシン標準溶液のゲル化時間を代入し、得られたエンドトキシン濃度の既知濃度からの乖離の度合いおよびその変動幅を示すことにより、検量線の保存利用の妥当性の検討を計画した. この変動幅については、FDA がガイダンス³⁾の中で示していた、試験時の陽性コントロールの真値に対する回収率 (75–125%, 変動幅 ±25%) を参考に考察した.

本検討実施前に、まずカイネティックゲル化法のエンドトキシン試験法が有する保存検量線の基本変動幅を解析した (結果 (1)). 保存検量線を作成する際に使用したデータ (自己データ) をその保存検量線に代入しエンドトキシン濃度を求めることにより、各データから保存検量線までの最短距離をエンドトキシン濃度として表現することができる. すなわちこの方法で、本分析法全体が基本的に内在する測定データの誤差レベルをエンドトキシン濃度として確認できると考えられるが、結果、-17%~+15% の変動が観察された.

次に、保存検量線作成者とエンドトキシン測定者が同一の場合における、エンドトキシン保存検量線から得られた濃度と真値との乖離の程度を回

収率として求めた（結果(2)）。本検討は、実際のエンドトキシン試験時にエンドトキシン保存検量線を使用した場合の、エンドトキシン濃度の変動幅の観察に相当するものと考えられるが、その変動幅は $-15\% \sim +27\%$ の範囲であった。結果(1)の本試験法が持つ基本的な測定データの誤差レベルからすると、日内変動、日差変動を含む併行精度観察時のデータの変動幅としては決して大きくはないと考えられる。また結果(3)より、同一施設で保存検量線作成者とエンドトキシン測定実施者が異なる場合の、得られるエンドトキシン濃度の変動幅は、 $-14\% \sim +24\%$ であり、保存検量線作成者が実施者と異なる場合（室間再現精度観察条件）も併行精度観察時と変動幅は同等であった。先ほど示したFDAのガイダンスで示されている陽性コントロールの真値からの変動幅から見ると、結果(2)については全データである324点中の1点（1人あたり108点で3名実施より計324点）が逸脱し、(3)については全データである972点中の逸脱は観察されなかった。

一方で、結果(2)と同一条件でさらにライセートのロットを変えた場合、標準溶液の濃度測定値は真値と大きな乖離を示し（ $-35\% \sim +56\%$ 、結果(4)）、ライセートのロットは保存検量線を使用する際に大きな影響を与えることが判明した。この場合のFDAガイダンスの真値変動幅（ $\pm 25\%$ ）からの逸脱は、計324点中65点であった。ライセートの原料はガプトガニの血球成分LALであり、生体試料を利用した試薬であるために、エンドトキシンに対する反応性にばらつきがあるためと考えられる。

3) 保存検量線の使用による測定値に影響を与える因子について

本検討では、保存検量線を使用する際の誤差を与える因子として、施設、実施者、実施日およびライセートのロットを変動要因として確認した。その結果、最も誤差を与える因子としては、ライセートのロットが挙げられた。結果(2)および(3)で確認されたように、実施者間や実施日の相違が測定値に大きく影響しなかったが、その要因

としては、エンドトキシン標準品の希釈方法や、ライセートの使用前室温放置時間を一定に定めるなど、プロトコルを詳細に規定していたことが大きいと考えられる。一方で、プロトコルではエンドトキシン標準液をライセートに入れボルテックスした後にトキシノメータにセットする時間の設定を厳密にしていなかったために測定値に明らかなエラーが生じた。本検討では、エラーデータを保存検量線の作成に使用した場合にも、別に作成した標準溶液の真値からの乖離には大きな影響が確認されなかったが、各標準溶液の回収率は全体的に低下した。これはエラーデータにより検量線のy切片が小さくなったため、その検量線に代入して求めたエンドトキシン濃度が小さくなる。すなわち真値からの乖離の度合いである回収率が低くなるためであり、変動としては安全を脅かす方向に影響する（測定値が低めに出る）。このため、検体を入れたライセートをトキシノメータにセットするまでの時間は厳密にコントロールする必要があると考えられた。

4) 保存検量線の利用について

本検討では、保存した検量線を使用した場合に測定値に与えられる変動を検討したが、結果としてライセートロットごとの保存検量線を用意すること、および、エンドトキシン試験の詳細なプロトコルを作成し厳密に従い実施することにより、保存検量線を使用しても測定データの信頼性が損なわれることはないと思われた。ただし、保存検量線を規定する場合には、作成した保存検量線の妥当性を何らかの形で示すための内部指標が必要と考えられる。例えばFDAが以前示していたガイドラインでは、作成された保存検量線の相関係数が0.98よりも大きいことが必要条件であった。また前述通り、エンドトキシン試験時に陽性コントロール（検量線の中点濃度）が真値の75～125%に入ることが求められている。後者は保存検量線とエンドトキシン試験時の測定条件の整合性に関する指標である。今後保存検量線を使用する場合には、上記のような設定を行った後に、妥当性を検証しながら進めていくことが期待される。

V. 結 語

院内製造 PET 薬剤は PET 施設ではほぼ毎日製造され、患者に投与される。その試験検査におけるエンドトキシン試験法は、より現実的かつ信頼性を確保した方法が求められる。本検討ではエンドトキシン測定法の現実的な簡便化を目指して、保存した検量線を使用した際の測定値の変動について評価を行い、保存検量線を使用しても測定データが大きく変動しないことが予想された。

本研究において、利益相反に該当なし。

文 献

- 1) 社団法人 日本アイソトープ協会 医学・薬学部会 ポジトロン核医学利用専門委員会：ポジトロン核医学利用専門委員会が成熟技術として認定した放射性薬剤の基準 (2009 年改定). *RADIOISOTOPES* 2009; 58: 221–245.
- 2) 院内製造された FDG を用いた PET 検査を行うためのガイドライン (第 2 版). 核医学 2005; 42 (4).
- 3) DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, Food and Drug Administration. Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals. KINETIC LAL TECHNIQUES. July 15 1991.

Summary

Assessment of Validity of the Archived Standard Curve in Endotoxin Assay

Atsuo WAKI^{*1,*2}, Tetsuya MORI^{*2}, Ken-ichi NISHIJIMA^{*3}, Kazuyoshi HONJO^{*4},
Yuichiro KAYANO^{*5}, Ryoichi YANO^{*5}, Hiromi SHIRAISHI^{*6}, Aya TAKAOKA^{*6},
Yasushi KIYONO^{*2} and Yasuhisa FUJIBAYASHI^{*1}

^{*1} *Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences*

^{*2} *Biomedical Imaging Research Center, University of Fukui*

^{*3} *Department of Tracer Kinetics and Bioanalysis, Graduate School of Medicine, Hokkaido University*

^{*4} *Clinical Imaging Center for Healthcare, Nippon Medical School*

^{*5} *Department of Pharmacy, University of Fukui Hospital*

^{*6} *BMS Center, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.*

The archived standard curve of endotoxin assay was evaluated to be possible to be used for the endotoxin assay as the reliable standard curve, instead the standard curve was produced each time of the assay. The archived standard curve shall be produced from three standard curves for three days, following the guidance issued from FDA in 1991, and the evaluation whether the archived standard curves can be applicable to use daily was performed with the recovery rate of the concentrations obtained from the archived standard curves against the true values. The three case studies were prepared: (1) the same person, who prepared the archived standard curves, performed this assay with the standard solutions (repeatability condition with the same tester, at the same facility), (2) the person, who did not prepare the archived standard

curves, performed this assay with standard solutions (reproducibility condition with the different tester and dates), (3) the same preparation as (1), but using different three lots of lysates. The recovery rates were (1) 85–127%, (2) 86–124%, (3) 64–156%, respectively.

From this data, the endotoxin concentration calculated with the archived standard curves were not varied very much, compared to the true values, but further discussion are necessary when the archived standard curves would be applied in daily analysis of PET drugs, regarding the protocol, the requirement to use the archived standard curve and the daily internal control as system suitability tests.

Key words: Endotoxin assay, In-house PET drug manufacturing, Regulatory sciences, Archived standard curves.