

平成 27 年 2 月

日本核医学会

院内製造 PET 薬剤のエンドトキシン試験を適切に実施するために
— 局方と同等の信頼性を確保しうるエンドトキシン簡便法のご紹介 —

院内製造 PET 薬剤のエンドトキシン試験はこれまで、設定されている幾つかの指針¹⁾に従い、日本薬局方のエンドトキシン試験法を「準用」した方法で実施されてきました。この指針では「準用」の方法について全く規定されていなかったため、多くの PET 施設では、検量線やコントロールを設定せず、PET 薬剤を試薬（ライセート）と混和後、一定時間でゲル化が観察されなければ試験適合と判定しています。この方法では、ライセートロットの相違によるゲル化時間に対する影響が結果に反映されず、求めたエンドトキシン濃度が正確に得られないことや、PET 薬剤のゲル化反応に影響を及ぼす因子の有無が確認できないなど、日本薬局方に比べ信頼性が大きく損なわれた方法で実施しているのが現状です。

一方、日本薬局方のエンドトキシン試験法は、測定毎に検量線や試験水を検査するためのサンプルを設定するなど、そのまま院内製造 PET 薬剤に適用するのは時間的にもコスト的にも難しいのも事実です。

そこで分子イメージング戦略会議では、関係大学等およびエンドトキシン装置メーカーと共同で院内製造 PET 薬剤に適したエンドトキシン試験法を検討して参りました^{2)、3)}。この度、その成果をまとめ、日本薬局方エンドトキシン試験法とおよそ同等の信頼性を確保した方法⁴⁾として、「院内製造 PET 薬剤用エンドトキシン簡便法」をご紹介いたします。なお、院内製造 PET 薬剤用エンドトキシン簡便法は、和光純薬工業が販売するトキシノメーター ET-2000、ET-5000、ET-6000、およびリムルス ES-II シングルテストワークのみで使用できます。その他の装置、試薬には対応しておりません。

- 1) サイクロ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（2001 年改定）
- 2) 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. 核医学 50: 289-296, 2013.
- 3) エンドトキシン保存検量線その他施設での利用の可能性の検討. 核医学 51:383-386, 2014.
- 4) 本法は、日本核医学会院内製造 PET 薬剤基準 第 3 一般試験法 3 エンドトキシン試験法の注意書き（「日本薬局方収載以外の方法にて実施する場合は同等以上の信頼性が確保されていることをバリデーション等により示すことが必要である。」）の条件を満たしている方法と考えられますが、バリデーションにより信頼性が確保されている試験条件や操作を正確に再現するため、方法の詳細を十分にご理解し、自施設の責任の下にエンドトキシン簡便法を実施して下さい。

院内製造 PET 薬剤用エンドトキシン簡便法

<原理と方法>

- ① 保存検量線を用いて定量する
この保存検量線は②試験時と同一ライセートロット、同一コントロールスタンダードエンドトキシン（CSE）を使用して作成する。保存検量線は、 r の絶対値 ≥ 0.980 であるとき有効である。
- ② 試験時の検体について
測定検体： $n=2$
既知のエンドトキシン標準溶液（PC）： $n=1$
既知のエンドトキシン標準溶液に測定検体を入れた溶液（PPC）： $n=1$
- ③ 判定基準：PC は 75～133%、PPC は 50-200%以内であれば試験成立とし、測定検体の測定値が利用できるものとする。
- ④ その他、方法の詳細は、提供されるプロトコル⁵⁾をご確認ください。

5)院内製造 PET 薬剤のための簡便なエンドトキシン試験法：日本核医学会編

<注意点>

- ① 保存検量線は、自施設で作成されたもの、または（独）放射線医学総合研究所（放医研）が提供する保存検量線データを使用できます。
- ② 自施設で保存検量線を作成する場合、提供される作成手順⁵⁾に従い、保存検量線を作成してください。特に、ライセートロットを変更する場合はそのロットごとに保存検量線を作成する必要があります。
- ③ 放医研が提供する保存検量線データを使用する場合は、放医研が実施するエンドトキシン簡便法実習を受講し、放医研が保存検量線を作成するときの手順に従い、保存検量線を作成したのと同じロットの試薬を用いて、試験を実施してください。
- ④ 簡便法では、検量線は 0.01－1EU/mL の範囲でご利用ください。エンドトキシン測定値が 1 を超える場合は、正確なエンドトキシン値を算出するため、希釈してご使用ください。
- ⑤ 簡便法を行うトキシノメーターは、定められた間隔および方法で適格性評価が行われたものを使用します。
- ⑥ エンドトキシン簡便法は、各施設の責任のもとに使用してください。日本核医学会は、いかなる事故にも対応できませんので、ご了承ください。

院内製造 PET 薬剤のための簡便なエンドキシン試験法
(エンドキシン簡便法)

改訂履歴

登録・発行 年月日	文書番号 (改訂番号)	改訂内容	改訂理由
年 月 日			

目次

表紙.....	1
改訂履歴.....	2
目次.....	3
院内製造 PET 薬剤のための簡便なエンドキシン試験法(エンドキシン簡便法)	4
<使用機材>.....	4
1. 保存検量線作成	4
1.1. CSE 溶解.....	4
1.2. エンドキシン標準溶液の希釈	5
1.3. トキシノメーターによる測定.....	6
1.4. 検量線データの有効性確認	6
1.5. 保存検量線の作成と有効性評価.....	6
2. 予備検討(新規薬剤などで反応干渉因子の有無が不明の時に実施)	7
2.1. 陽性コントロール(PC)の調製	7
2.2. 陽性薬剤コントロール(PPC)の調製.....	7
2.3. トキシノメーターによる測定.....	7
2.4. データの解析と判定	7
3. 日常測定	8
3.1 トキシノメーターの準備.....	8
3.2 リムルス ES- II シングルテストワークのライセート試薬準備	8
3.3 エンドキシン標準溶液の希釈	8
3.4 陽性コントロール(PC)の調製	8
3.5 陽性製品コントロール(PPC)の調製.....	8
3.6 トキシノメーターによる測定.....	9
3.7 データの解析と判定	9

院内製造 PET 薬剤のための簡便なエンドキシン試験法(エンドキシン簡便法)

本標準操作手順書は、エンドキシン簡便法の保存検量線作成手順及び、保存検量線を用いた日常測定について記載したものである。

<使用機材>

- トキシノメーターET-6000 又は ET-5000 又は ET-2000 (すべて和光純薬工業)
- タッチミキサー(和光純薬工業)又は同等品(ボルテックス等)
- マイクロピペット 100-1000 μL 注1)
Finnpipette F2 #4642090(Thermo SCIENTIFIC)又は同等品、1本
- マイクロピペット 20-200 μL 注1)
Finnpipette F2 #4642080(Thermo SCIENTIFIC)又は同等品、1本
- バイオクリーンチップワコー1000 II #298-35031(和光純薬工業)
- バイオクリーンチップワコーエクステンドS II #294-35011(和光純薬工業)
- リムルス ES- II シングルテストワコー #295-51301(和光純薬工業)
- リムルステストチューブ-S(アルミキャップ付) #292-32751(和光純薬工業)
- アルミキャップ-S #293-28251(和光純薬工業)
- 大塚蒸留水 20 mL アンプル(大塚製薬工場)(以下、試験用水として使用)
- パラフィルム

注1) バイオクリーンチップに合わないピペットがあるので、適したピペットを使用すること。

バイオクリーンチップワコーエクステンドS IIは、汎用 20-200 μL 用チップよりも長くなっている。汎用チップの場合、リムルステストチューブの底まで届かないことがあり、無理にチューブを斜めにして操作した場合、測定結果に影響することがある。

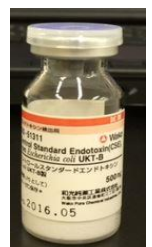
1. 保存検量線作成

保存検量線はリムルス ES- II シングルテストワコーのライセート試薬のロットごとに作成する。以下のサンプルを3日間測定し、全点を使用して直線回帰式と相関係数を求める。

- エンドキシン濃度: 1、0.1、0.01 EU/mL (3濃度、n=2)
- 陰性コントロール: 試験用水(n=1)

1.1. CSE 溶解

リムルス ES- II シングルテストワコーに付属しているCSEのゴム栓をゆっくりはずす。CSEの表示含量を参照して終濃度が1000 EU/mLとなるように、試験用水を加え、再びゴム栓をして数回転倒攪拌した後、タッチミキサー(ボルテックス)で2分間激しく攪拌する(CSE溶液)。溶解後はパラフィルムを巻き2-10°Cで冷蔵保存する。溶解後の使用期限は1カ月である。



1.2. エンドキシン標準溶液の希釈

下記の表 1、図 1 に従いリムルステストチューブ-S に順次希釈する。
希釈は室温(10–30°C)で行う。

表 1. エンドキシン標準溶液の調製

エンドキシン溶液濃度 (EU/mL)	溶液量 (μ L)	試験用水 (μ L)	目的濃度 (EU/mL)
1000 (CSE 溶液)	100	900	100
100	100	900	10
10	100	900	1
1	100	900	0.1
0.1	100	900	0.01

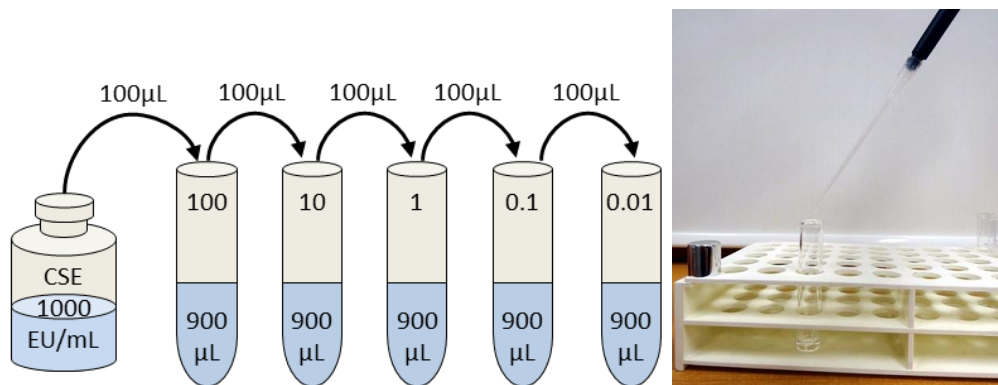


図 1. エンドキシン標準溶液の希釈

1.2.1 リムルステストチューブ-S を試験管立てに 6 本並べ、目的濃度をマジックインキ等で記す。

1.2.2 1 本は陰性コントロール用とする。

1.2.3 各チューブに試験用水を 1000 μ L 用ピペットで 900 μ L ずつ分注する。

1.1 で調製した CSE 溶液(1000 EU/mL)を室温に戻し、タッチミキサー(ボルテックス)で 1 分間激しく攪拌する。続いて 100 μ L を 2 回洗い込みしてから測り取り、「100 EU/mL」のチューブに加える。払い出し時のピペット押し出し操作は 1 回とする。使用したチップは廃棄する。

1.2.4 アルミキャップをしてタッチミキサー(ボルテックス)で 30 秒間攪拌する。この時内容をアルミキャップに接触させないこと。

1.2.5 新しいピペットチップを取り付け、100 μ L を 2 回洗い込みしてから測り取り、同様に「0.01 EU/mL」濃度まで希釈する。チップは、毎回必ず交換すること。

希釈したエンドキシン溶液は、使用まで室温保存する。使用期限は当日限りとする。



1.3. トキシノメーターによる測定

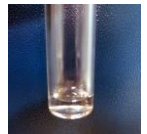
測定開始の 20 分以上前に機器の電源を入れておく。使用する前に所定の温度に達していることをトキシノメータのモニターにて確認すること。

測定時間は 60 分に設定する。トキシノメーター操作法に従い、以下測定を実施する。

- 1.3.1 リムルス ES- II シングルテストワコーのライセート試薬を 7 本冷蔵庫から取り出して室温に戻す(20 分程度)。アルミ栓ならびにゴム栓を専用器具で静かに取り外し、アルミキャップをかぶせておく。



- 1.3.2 バイオクリーンチップワコーエクステンド S II を使用して試験用水 200 μ L を 2 回洗い込みしてから測り取り、ライセート試薬に加える(この操作は約 2 秒で行う)。ただちにタッチミキサー(ボルテックス)を使用し約 5 秒間攪拌し(泡がないことを確認)、一連の操作開始から計約 10 秒後にトキシノメーターにセットし、ゲル化時間の測定を開始する。



- 1.3.3 1.2 で希釈したエンドトキシン溶液のうち、0.01 EU/mL~1 EU/mL を 20 秒攪拌した後、バイオクリーンチップワコーエクステンド S II を使用して 200 μ L を 2 回洗い込みしてから測り取り、ライセート試薬に加え、1.3.3 と同様にしてトキシノメーターで n=2 で測定する。

1.4 検量線データの有効性確認

トキシノメーター付属のデータ解析ソフト、トキシマスターQC を利用して、X 軸に log エンドトキシン濃度、Y 軸に loglog ゲル化時間をプロットした検量線の回帰式と相関係数を求める。

各測定日の検量線の相関係数の絶対値が 0.980 以上で、陰性コントロールが 60 分以内にゲル化判定されないとき、1.5 で使用できるものとする。

1.5 保存検量線の作成と有効性評価

1.4 にて 3 日間の検量線データが有効になった時、3 日間の測定点の全点を使用して、X 軸に log エンドトキシン濃度、Y 軸に loglog ゲル化時間をプロットした検量線の回帰式と相関係数を求める。この時の相関係数の絶対値が 0.980 以上であれば、求めた検量線は保存検量線として使用できる。

2. 予備検討(新規薬剤などで反応干渉因子の有無が不明の時に実施)

以下のサンプルを測定し、あらかじめ PET 薬剤に反応干渉因子がないことを確認する。

新規な PET 薬剤については、3 ロットの薬剤で確認することが望ましい。

- 陽性コントロール(PC:2.1 参照)n=2
- 陽性薬剤コントロール(PPC:2.2 参照)n=2
- 薬剤溶液 n=2

2.1. 陽性コントロール(PC)の調製

CSE 溶液 1000 EU/mL を 1. 保存検量線作成 1.2 エンドキシン標準溶液の希釈に記載の方法で 0.1 EU/mL まで希釈する。

2.2. 陽性薬剤コントロール(PPC)の調製

1.2 で作成した CSE 希釈系列 1 EU/mL を 50 μ L と薬剤溶液 450 mL^{注2)}を混合し、薬剤溶液に CSE の終濃度が 0.1 EU/mL となるようにエンドキシンを添加する。

2.3. トキシノメーターによる測定

1. 保存検量線作成の 1.3 と同様にして PC、PPC、薬剤溶液をトキシノメーターで測定する。



2.4. データの解析と判定

保存検量線を用いて、PC、PPC、薬剤溶液のエンドキシン濃度を求める。PCのエンドキシン濃度が 0.075 EU/mL 以上 0.133 EU/mL 以下であれば試験は有効となる。

PPC のエンドキシン濃度から薬剤のエンドキシン濃度を差し引いた値が 0.05 EU/mL 以上 0.2 EU/mL 以下であれば、薬剤溶液に反応干渉因子はない(真値の 50-200%の範囲)。

反応干渉が見られた場合は、薬剤溶液を 10 倍希釈するなどして、反応干渉が観察されない希釈倍率を求める(最大有効希釈倍数まで希釈可)。ただし、薬剤溶液の希釈倍数を大きくするほど、エンドキシン規格値を検出するための時間が長くなることに注意する。

注2) PET 薬剤溶液を 1mL 用意できる場合は、CSE 希釈系列 10 EU/mL を 10 μ L と薬剤溶液 990 μ L を混合して PPC(2 本分)を調製する方法が望ましい。

3. 日常測定

薬剤ごとに以下の検体のゲル化時間の測定を行い、保存検量線を用いて評価する。

- 陽性コントロール(PC:3.4 参照)n=1
- 陽性製品コントロール(PPC:3.5 参照)n=1
- 薬剤溶液 n=2

3.1 トキシノメーターの準備

測定開始の20分以上前に機器の電源を入れておく。保存検量線のデータを手入力する。測定時間は、保存検量線データの濃度0.01 EU/mLの最長ゲル化時間に設定する。

3.2 リムルス ES- II シングルテストワコーのライセート試薬準備

リムルス ES- II シングルテストワコーのライセート試薬を 4 本、冷蔵庫から取り出して室温に戻す(20分程度)。

3.3 エンドキシン標準溶液の希釈

リムルステストチューブ-Sを試験管立てに4本並べ、図2に従ってマジックインキ等で目的濃度を記す。各チューブに試験用水を1000 μ L用ピペットで900 μ Lずつ分注する。次いで、室温に戻したCSE溶液(1000 EU/mL)をタッチミキサー(ボルテックス)で1分間激しく攪拌する。これをエクステンドIIピペットで100 μ Lを2回洗い込みしてから測り取り、100 EU/mLのチューブに加える。払い出し時のピペット押し出し操作は1回とし、使用したチップは廃棄する。

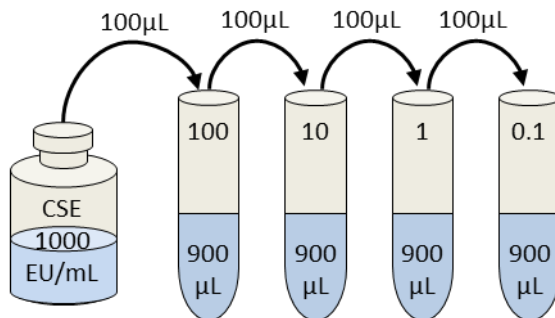


図2.エンドキシン標準溶液の希釈

3.4 陽性コントロール(PC)の調製

CSE 溶液 1000 EU/mL を 1. 保存検量線作成 1.2 エンドキシン標準溶液の希釈 に記載の方法で、0.1 EU/mL まで希釈する。0.1 EU/mL の溶液を陽性コントロール(PC)とする。

3.5 陽性製品コントロール(PPC)の調製

3.3 で作成した CSE 希釈系列 1 EU/mL を 30 μ L と薬剤溶液(希釈測定する場合は希釈後の薬剤溶液)270 μ L ^{注3)}を混合し、エンドキシンの終濃度が 0.1 EU/mL となるよう調製する。

3.6 トキシノメーターによる測定

1. 保存検量線作成の 1.3 と同様にして PC、PPC、薬剤溶液をトキシノメーターで測定する。

3.7 データの解析と判定

保存検量線を用いて、PC、PPC、薬剤溶液のエンドキシン濃度を求める。

試験成立の有効条件は、以下の(A)(B)が成り立つとき。

- 3.7.1 (A)PC のエンドキシン濃度が 0.075 EU/mL 以上 0.133 EU/mL 以下である。

- 3.7.2 (B)PPC のエンドキシン濃度から薬剤溶液のエンドキシン濃度を差し引いた値が 0.05 EU/mL 以上 0.2 EU/mL 以下である。

- 3.7.3 (A)(B)が確認できれば、試験は有効である。

保存検量線から得られたサンプルのエンドキシン濃度と希釈倍数から薬剤溶液のエンドキシン濃度を算出し、規格値未満であれば試験適合となる。(例えば、サンプルのエンドキシン濃度が A EU/mL となった場合、薬剤溶液のエンドキシン濃度は、 $A \times$ 希釈倍数となる。これが規格値未満であるかを判定する。)

- 3.7.4 保存検量線を用いて算出した PC のエンドキシン濃度が、0.075 EU/mL 以上 0.133 EU/mL 以下でなかった時、以下を確認して再試験する。

⇒CSE の有効期限、保存方法には問題ないか？

⇒CSE の溶解方法や希釈方法は正しいか？

⇒測定操作はプロトコルに従っているか？

⇒トキシノメーターの温度、光量は適正か？

- 3.7.5 PC のエンドキシン濃度は 0.075 EU/mL 以上 0.133 EU/mL 以下であったが、PPC のエンドキシン濃度からサンプルのエンドキシン濃度を差し引いた値が、0.050 EU/mL 以上 0.20 EU/mL 以下でなかった時

⇒PPC の調製方法を確認し、問題がなければ下記の希釈を行う。

⇒サンプルをさらに最大有効希釈倍数の範囲内で希釈して PPC と希釈サンプルを再試験する。ただし、薬剤溶液のエンドキシン濃度を算出する際に通常の希釈倍数と異なるので注意が必要となる。

⇒PET 薬剤の性質が大きく変化していることも推測されるため、再試験後の出荷判断は慎重に行うこと。また、予備検討による希釈の再設定も検討すること。

注3) PET 薬剤溶液を 1mL 用意できる場合は、CSE 希釈系列 10 EU/mL を 10 μ L と薬剤溶液 990 μ L を混合して PPC を調製する方法が望ましい。急ぐときには 1mL をシリンジで取ることも被曝低減につながると考えられる。