

《技術報告》

エンドトキシン保存検量線のお施設での利用の可能性の検討

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の方法として、施設内で作成された保存検量線を利用する方法の妥当性について、2013年に報告した(核医学 2013; 50: 289-296)¹⁾。本検討では、同一のデータを使用し、他施設で作成された保存検量線を利用する可能性について検討した。ライセートロットを同一とし、3施設、5名の試験者が作成した保存検量線(計21本)に他の施設で調製した標準溶液のゲル化時間を代入し真度を確認したところ、86~125%の範囲であった。

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、自施設だけでなく他施設で作成された保存検量線においても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。

(核医学 **51**: 383-386, 2014)

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、コスト負担や短時間での実施が困難であるケースもあるため、信頼性と簡便性を両立した方法を開発することを目的として、自施設で作成した保存検量線の利用の妥当性について検討した。その結果、詳細なプロトコルを厳密に適用することで、真度

や精度が信頼性を有すると考えられる範囲に収束することを確認した¹⁾。

一方で PET 薬剤製造現場では、ライセート毎に自施設で保存検量線を作成することの手間も大きいことから、メーカーや他施設で作成された保存検量線を使用できれば、自施設で保存検量線を作成するよりもより簡便で利用しやすいと考えられる。

そこで、ほとんどの PET 施設が現有しているエンドトキシン測定装置(トキシノメーター(和光純薬工業株式会社製))を用いて、他施設で作成した保存検量線の利用の可能性について、前回の報告と同一のデータセットを使用し、同様に標準溶液の真度のばらつきを検討することで評価した。保存検量線は前回と同様、米国 FDA (Food and Drug Administration) が²⁾ 1991年に提出したガイダンス²⁾に従い、1日1本、連続する3日間構成される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、保存検量線作成者と異なる他施設の実施者が3濃度の標準溶液を作成し、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

*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: 26年7月25日
 最終稿受付: 26年9月10日
 別刷請求先:

千葉市稲毛区穴川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

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) を求めた。

II. 方 法

本検討は、前回の報告で使用したデータセットを用いて実施しているため、詳細は、前回の報告を参照していただきたい。ここでは要点を述べる。

(1) 使用機器および試薬・材料

機器は ET-6000/J およびその拡張モジュール (福井大学高エネルギー医学研究センター、北海道大学病院)、または ET-2000 (日本医科大学健診医療センター) (両機器とも和光純薬工業株式会社) を用いた。ライセート試薬は、リムルス ES-II シングルテストワコー (LAL, 295-51301) を、エンドトキシン標準品 (CSE) はライセート試薬添付品を用いた。

(2) エンドトキシンの標準溶液

エンドトキシン標準溶液は供給元が提示する方法に従って作成した (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」)。標準溶液濃度は、1, 0.1, 0.01 EU/ml を使用レンジとして用いた。

(3) 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、ライセート試薬も常温 (15–25°C) 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、トキシノメーターにセットし測定を開始した。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。

(4) 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。

Table 1-a Experimental design of the recovery test of the standard solution at substitution in archived standard curve prepared in other facilities in this study

Lysate Lot	Archived standard curves	No. of	
		Testers / facilities	Standard solution samples for recovery test substituted in each archived standard curve
132	11	5 / 3	228 × 3 conc.
136	5	3 / 3	84 × 3 conc.
137	5	3 / 3	84 × 3 conc.

Table 1-b Result of the recovery test of the standard solution at substitution in archived standard curves prepared in other facilities

Lysate Lot	Endotoxin Conc. (EU/ml)	Recovery rate (%)
132	0.01	88–121
	0.1	89–110
	1	89–116
136	0.01	88–125
	0.1	88–114
	1	88–114
137	0.01	86–109
	0.1	89–110
	1	87–124

(5) 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×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3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。

III. 結 果

他の施設で作成され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

各濃度の標準溶液を作成し測定したゲル化時間を他の施設で作成された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（Table 1）。保存検量線および標準溶液は同一のライセートロットを用いて検討した。具体的には、ロット132については11本（施設F：9本、施設N：1本、施設H：1本）、ロット136および137については5本（施設F：3本、施設N：1本、施設H：1本）の保存検量線を作成し、その際に作製した各濃度の標準溶液のゲル化時間を他の施設で作成された保存検量線に代入し、標準溶液の既知濃度に対する回収率を求めた。その結果、他の施設で作成した保存検量線を使用して求めたエンドトキシン回収率は、86～125%の範囲であった。

IV. 考 察

1) 自施設の保存検量線と他施設の保存検量線を使用した場合の真度の変動幅

前回の報告では、①保存検量線作成者と測定者が同一の場合、②保存検量線作成者と測定者

が同じ施設の場合、について標準溶液の回収率を求め、結果は①85～127%、②86～124%であった。今回は、保存検量線作成者と異なる施設の測定者の場合であるが、その結果、変動幅は86～125%であり、①、②と比較しても同等の変動幅に収まることが判明した。FDAがガイダンス²⁾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妥当な回収率は75～125%であり、今回検討した他の施設で作成した保存検量線を使用した場合の標準溶液回収率も、この範囲に収まった。大きな変動が発生しない要因は、保存検量線と同一のライセートロットを使用し、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したことによることが考えられた。

2) 他の施設で作成された保存検量線を利用したエンドトキシン試験の実施条件について

他の施設で作成された保存検量線の使用については2つの条件を満たす必要があると考えられる。1つは、保存検量線が成立する条件を満たすこと、もう1つは、試験時の保存検量線使用適合性の確認である。前者については、保存検量線が成立するかどうかを示す指標は、例えばFDAが以前示していたガイドライン²⁾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示されている。後者についてFDAは、エンドトキシン試験時に陽性コントロール（検量線の中間濃度）が真値の75～125%に入ることを要求しているが、この条件設定の目的は、エンドトキシン試験時と保存検量線作成時の試薬、手順等の同等性の確認であり、この条件を満たすためには、保存検量線作成時と試験時のプロトコルの厳密な一致が必要である。

このように他の施設で作成された保存検量線を使用するためには、前回報告した自施設の保存検量線の利用に比べて、施設間のプロトコルの厳密な一致が求められる点を一層留意する必要がある。例えば、施設間のプロトコルを一致させるのは当然のこと、研修を行い試験手順の訓練なども

必要と考えられる。

V. 結 語

毎日実施するエンドトキシン試験の信頼性を維持し簡便化することは、PET 薬剤製造の標準化の重要なポイントの 1 つと考えられる。今回、保存検量線を他の施設で利用する際、手順等を厳密に一致させると信頼性を確保したまま利用できることが示唆された。実際に他の施設の保存検量線を利用するには、少なくとも 2 つの条件、すなわち保存検量線成立条件と保存検量線使用時の適合性を満たす必要があると考えられる。

本研究において、利益相反に該当なし。

文 献

- 1) 脇 厚生, 森 哲也, 西嶋剣一, 本城和義, 萱野勇一郎, 矢野良一, 他: 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 2013; 50: 289–296.
- 2) 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, Produced in Other Facilities

Atsuo WAKI*^{1,2}, Tetsuya MORI*², Ken-ichi NISHIJIMA*³, Kazuyoshi HONJO*⁴,
Yuichiro KAYANO*⁵, Ryoichi YANO*⁵, Hiromi SHIRAIISHI*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.*

We have reported the possibility of the use of the archived standard curve of endotoxin assay, which is prepared in the same facility¹⁾ from the viewpoint of the accuracy and precision. In this study, the possibility of the use of the archived standard curves prepared in the different facilities was investigated with the same data set in the previous paper. The evaluation was performed with the recovery rate of the concentrations of the standard solutions, as the same method as the previous study.

The clotting times of the standard solutions were substituted into the standard curves prepared in the different facilities from those, in which standard solutions were prepared. The recovery rates were 86.1–125.0%, and the range was almost the same as that

when the facility preparing standard solutions were the same as that preparing the standard curve.

From this data, if the protocols of the preparation of standard solutions, such as mixing and the interval timing until set to the apparatus and so on, can be set the same between the endotoxin test and the preparation of the archived standard curves, the endotoxin concentration calculated with the archived standard curves prepared in other facilities were not varied very much, compared to the true values and the values obtained from the use of the archived standard curves prepared in the same facility.

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