

ENDOXPERTS™

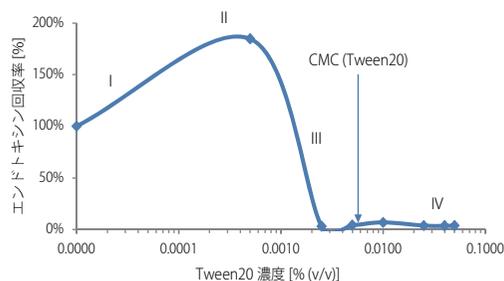
エンドトキシン測定に関する受託研究

工程内品質管理・製品出荷試験におけるエンドトキシン測定のプロトコール開発

- エンドトキシン試験のバリデーションおよびフィジビリティスタディの実施—rFCおよびLAL試薬
- 規制当局が要求している Hold-time 試験の実施
- 低エンドトキシン回収 (LER) の原因究明
- 脱マスクングのプロトコール開発
- 測定方法の指導、トレーニング、サポート

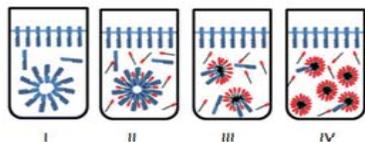
エンドトキシン低回収 (Low Endotoxin Recovery)

エンドトキシンが存在するにもかかわらず、リムルス試験で検出されないことがあります。試料中の共存物質による干渉ではなく、エンドトキシンがリムルス試薬のC因子前駆体と反応しない状態になり検出されなくなるのです。このような試料をウサギを用いた発熱性試験に供すると陽性となることから、エンドトキシンの存在が確認できます。



実験条件
エンドトキシン濃度：115,000 EU/ml (*E. coli* O55:B5由来)
溶液：10mM クエン酸緩衝液
経過時間：3日

状態	エンドトキシン/ 界面活性剤 [比]	回収率 [%]	ミセルの 大きさ D _H [nm]
I	1 : 0	100 %	40
II	1 : 1	200 % (亢進)	20
III	1 : 10	30-10 %	10
IV	>1 : 100	< 5 %	6



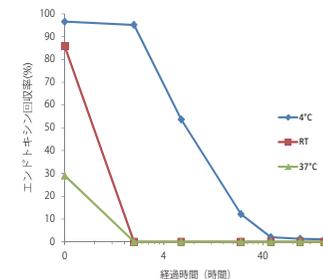
- I = [エンドトキシン]
- II = [エンドトキシン] + [界面活性剤] 低濃度
- III = [エンドトキシン] + [界面活性剤] 中濃度
- IV = [エンドトキシン] + [界面活性剤] 過剰

エンドトキシンはリポ多糖 (LPS) であり、両親媒性分子なので水溶液中で会合して (I) のようにミセルを形成します。少量の界面活性剤がリムルス試験の測定値を亢進させることはよく知られていますが、その状態は (II) にあたります。さらに、界面活性剤の濃度が上がると、C 因子前駆体との反応が抑制され (III)、界面活性剤が臨界ミセル濃度を超えると (IV) エンドトキシンの回収率は5%未満となります。

リムルス試薬のC因子前駆体に対して、LPSのミセルは活性を示しますが、LPSモノマーは活性を持たないことが知られています。界面活性剤によりLPSミセルが破壊されモノマーになり、さらに界面活性剤のミセルに取り込まれてしまう (マスクング) ため、リムルス試験での回収率が低下すると考えられます。

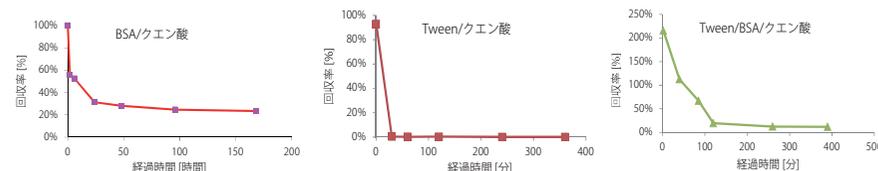
マスクングは時間と温度に関係する

エンドトキシンのマスクングは瞬時に起こらず、動的な反応であることが、この問題を複雑なものとしします。すなわち、スパイクを調製直後に測定すると、マスクングが起こる製剤組成であるにもかかわらず高い回収率で測定されます。試験は有効となり、製造後時間を経た製剤で生じているマスクングによる回収率の低下を見逃す可能性があります。スパイクを調製後数時間～数日置いて測定して、マスクングが生じない製剤組成であることを確認する必要があります。



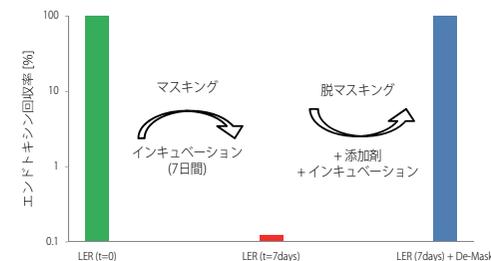
マスクングは医薬製剤の組成に関係する

タンパク質および界面活性剤を含む製剤中のエンドトキシンがマスクングされる機構について検討したところ、製剤の成分によってマスクングの程度が大きく異なることがわかりました。マスクングには複数の要因が関わります。



脱マスクングは可能か？

可能です。マスクングにより回収率が低下した試料でも条件を最適化することにより100%の回収率で測定することができます。製剤に含まれているタンパク質、界面活性剤、塩などの種類や濃度の違いにより、脱マスクングのアプローチは異なります。



Hyglos はエンドトキシンのマスクング / 脱マスクングの反応機構についてのデータを蓄積してきました。マスクングが生じる医薬製剤のエンドトキシン試験方法の確立、マスクングを回避するための製剤処方の研究に応用することができます。