



Title	エンドトキシンの乾熱状態における分解とその評価：バリデーションのための負荷試験系の開発について
Author(s)	中田, 徹
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39367
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	中 田	徹
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)	
学 位 記 番 号	第 1 1 5 9 2 号	
学 位 授 与 年 月 日	平成 6 年 11 月 14 日	
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当	
学 位 論 文 名	エンドトキシンの乾熱状態における分解とその評価 —バリデーションのための負荷試験系の開発について—	
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 西原 力 (副査) 教 授 眞弓 忠範 教 授 溝口 正 教 授 田中 慶一	

論 文 内 容 の 要 旨

注射剤を静脈注射したとき、不純物質によって、悪寒、戦慄を伴う発熱を起こすことがある。このような発熱を起こす物質（発熱性物質 pyrogen）はグラム陰性菌の細胞膜成分の一つであるエンドトキシン（内毒素）である。したがって、注射剤の容器（アンプル・バイアル）や注射剤の製造工程で注射液が接する製造設備の部品等は確実に滅菌ならびに脱パイロジェンされなければならない。

乾熱状態での脱パイロジェン工程のバリデーション（Validation）では、温度と時間を検証することに加えて、エンドトキシンの負荷試験も必要である。しかし、負荷試験の要件は現在のところ明確になっていないので、負荷するエンドトキシンの種類、分解速度およびエンドトキシン量の測定法などの負荷試験の要件について検討した。さらに、実用面での負荷試験への適応性についても評価した。

乾熱状態におけるエンドトキシンの分解速度の測定法は、複雑な装置を使用した操作の煩雑な方法しか報告されていなかったので、簡便な測定法を新しく開発した。新しく開発した測定方法では、加熱装置に実験器具として市販されているアルミニウム製のドライブロックバスを用いたので安価で購入できて加熱操作が簡単であった。また、エンドトキシンの負荷担体として薬局方で規定されている小型の試験管を用いたのでエンドトキシンの負荷操作や加熱操作および加熱後のエンドトキシン量の測定操作が非常に簡単であった。さらに、この加熱装置は従来の報告してきた加熱装置よりも、セット温度での温度のバラツキが少ないことも示した。この測定系でのエンドトキシンの分解速度は従来の報告と差はなかった。また、分解パターンも従来から報告されているのと同様に二相性であった。これらのことからエンドトキシンの分解速度の簡便な測定系が確立したと判断される。

つぎに、薬局方で標準品として示されている安定性の良好な2種類 [*E. coli* 055 : B5 (以下 *E. coli*) ならびに *Salmonella abortus equi* (以下 *Salm*)] のエンドトキシン担体からの回収率を測定した。担体からの回収率は、由来する菌の種類とエンドトキシン量の測定法によって負荷担体からの回収率が異なっていた。具体的には、10,000EU を添加した場合に LAL assay で回収率を測定すると、*E. coli* 由来のエンドトキシンは約 90 % で *Salm* 由来のエンドトキシンは約 70 % であった。一方、10~1,000EU を添加した場合の負荷担体からの回収率を pyrogen assay (発熱性

物質試験)で測定するとそれぞれ約30と約60%であった。これらの2種類のエンドトキシンの化学構造をFT-IRスペクトルで比較したところ、両者の化学構造が部分的に異なっていることが判明した。このことが、由来する菌の種類と測定法による回収率の差の要因の一つと考えられる。

一方、これら2種類のエンドトキシンの分解速度を測定したところ、エンドトキシン量の測定法が同じであれば、2種類のエンドトキシンの分解速度に差はほとんど認められなかった。しかし、エンドトキシン量の測定法が異なると分解パターンが異なった。具体的には200および250°Cどちらの加熱条件でも、エンドトキシン量をpyrogen assayで測定した場合の分解パターンは一相性で、LAL assayの場合の二相性とは異なっていた。さらに、2種類のエンドトキシンは、200または250°Cどちらの加熱条件でも、pyrogen assayで測定した分解速度は、LAL assayで測定した分解速度よりも有意に速やかであった。つまりコストの高いpyrogen assayに替わって簡単でコストの安いLAL assayによってより安全サイドで乾熱状態におけるエンドトキシンの分解を評価できることを示したのである。

また、10,000EUのエンドトキシンを添加して薬局方で示される条件で脱パイロジエンを実施した場合、200°C-60分[ヨーロッパ局法(EP)]の条件では、米国薬局方(USP)で脱パイロジエンの基準とされる3 Log cycle reduction(1/1000)には達しなかったが、発熱性はほとんど消失することを見いだした。このことから、3 Log cycle reductionの基準はover killの基準の可能性がある。なお、250°C-30分[USP、日本薬局方(日局、EP)の条件]では3 Log cycle reductionは十分達成し、発熱性も消失することを示した。

これまで述べてきた研究成果はエンドトキシンを負荷した小型の試験管と市販のドライブロックバスを利用した実験系での成果である。このような実験系と実用的に注射剤の容器や器材の脱パイロジエンが行われる乾熱装置では熱伝導、熱容量や輻射熱が異なっていることで、負荷したエンドトキシンの分解速度が異なる可能性がある。そこで、実験系からと実用系(乾熱装置)へのスケールアップの分解速度に及ぼす影響を検討するため、薬局方に示される2種類の脱パイロジエン条件で実用系である乾熱装置における脱パイロジエン工程中のエンドトキシン量を数点測定して、実験系で測定した分解速度から予測される量と比較した。200および250°Cいずれの条件でも乾熱装置の実測値と実験系の分解速度から算出される予測値は非常に近い結果が得られた。このことはスケールアップの影響がなかったことを示しており、エンドトキシンを負荷した試験管が実用的に乾熱装置でのバリデーションのための負荷試験に適用可能であることを示した。

以上のことから、代表的なエンドトキシンを負荷した試験管が、滅菌工程のバリデーションに使用されている生物学的インジケーターと同様に、脱パイロジエン工程をバリデーションするための「パイロジエンインジケーター」として使用できると結論された。また、このように簡単に使用できる「パイロジエンインジケーター」が開発されたことは、容易に一定条件での負荷試験によるバリデーションができることになり、脱パイロジエンされたことを保証したバイアルやアンプルの供給を可能にすることを意味し、注射剤の品質向上に貢献できると考えられる。さらに、今後、薬局方にまだ示されていない脱パイロジエン工程の条件設定に際して、「パイロジエンインジケーター」が、簡便で有用な工程評価の手段として活用できることも言うまでもない。

論文審査の結果の要旨

医薬品製造工程の品質管理において、脱パイロジエン工程のバリデーションは重要な課題である。中田君は、簡易な加熱装置と簡便なエンドトキシン定量法を用いて、乾熱状態におけるエンドトキシン分解過程を解析した。その結果から、本法がエンドトキシンの乾熱状態における分解速度の評価や負荷試験における標準エンドトキシンの評価に活用可能であることを示した。さらに、本法による結果と実用加熱装置でのエンドトキシン負荷試験の結果を比較検討することにより、本法が脱パイロジエン工程のバリデーションの評価システムとしても適応できることを示した。

これらの成果は学術的に高く評価されるだけではなく、実用的にも有益であり、博士(薬学)の学位請求論文として、充分価値あるものと認められる。