



Title	高圧蒸気加熱・非イオン系界面活性剤を用いたエンドトキシンの不活性化に関する研究
Author(s)	馬場, 隆明
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40910
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	ばん 馬 ば 場 たか 隆 あき 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 3 9 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 9 月 10 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	高圧蒸気加熱・非イオン系界面活性剤を用いたエンドトキシンの不活性化に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 真弓 忠範 (副査) 教 授 前田 正知 教 授 溝口 正 教 授 西原 力

論 文 内 容 の 要 旨

医薬品の中で無菌製剤に分類されるものの多くは注射薬であり、それらは微生物のみならず発熱性物質 (pyrogen) で汚染されているのではない。注射薬のパイロジェン汚染で特に注目すべきものは微生物汚染に起因する細菌由来のものであり、グラム陰性菌の細胞外膜に局在する内毒素 (endotoxin) である。エンドトキシンは強い耐熱性を有し、水溶液中では通常のろ過滅菌に用いられる0.22 μ m フィルターを通過することから、製品に混入したエンドトキシンを除去あるいは不活性化することは非常に困難である。以前からエンドトキシンの除去法や不活性化法が研究されてきたが、乾熱法を用いることが最も有効であるとされてきた。しかしながら、この方法は金属やガラス製などの耐熱性のある器具類にしか適用できない。また、高圧蒸気滅菌法は種々の滅菌法の中でコストや安全性の点で優れ、被処理物の適用幅が広いことから汎用されているが、通常の加熱条件 (121°C, 20分間) ではエンドトキシンを完全に不活性化することは出来ないと報告されている。近年、エンドトキシンの微量定量が可能である LAL (*Limulus* amebocyte lysate) 試験法が開発され、この試験法によって、水溶液中のエンドトキシンは乾燥状態にあるものに比べて不安定であり、また、低濃度であればより不安定であるという知見が得られるようになった。そこで、私は注射薬などの液剤の滅菌処理に適した高圧蒸気滅菌法に着目し、最終製品あるいは乾熱処理に耐えられない容器、器具類の脱パイロジェン処理に高圧蒸気滅菌法が応用可能であるかを検討した。

はじめに代表的なエンドトキシンについて、高圧蒸気加熱処理による不活性化を検討したところ、エンドトキシンの高圧蒸気加熱処理に対する熱抵抗性はその由来菌の種や系統によって異なるが、どのエンドトキシンについてもより低濃度であれば効率よく不活性化されることが明らかとなった。特に、10 ng/ml 以下の濃度であれば、通常の滅菌処理に用いられる条件 (121°C, 20分間) で加熱処理することにより、LAL 試験の検出限界以下あるいはそれに近いレベルにまでエンドトキシンを不活性化することが可能であり、高圧蒸気滅菌法は低濃度のエンドトキシンの不活性化には有効であることが示唆された。また、LAL 試験およびウサギを用いた発熱性試験より得られたデータを速度論的に解析した結果、121°Cにおける高圧蒸気加熱処理は200°Cにおける乾熱処理とほぼ同等であることが判明した。

次に、Mg²⁺ や Ca²⁺ あるいは Fe³⁺ などの多価の金属イオンは、水溶液中のエンドトキシンを凝集させ、ラウリル硫

酸ナトリウムやデオキシコール酸ナトリウムなどのアニオン性界面活性剤やポリソルベート20などの非イオン性界面活性剤はエンドトキシンを解離させることが知られている。注射薬には浸透圧やpH調整等の目的でこれらの添加物が用いられることが多いことから、高圧蒸気加熱処理によるエンドトキシンの不活性化に与えるこれらの添加物の影響について検討した。その結果、代表的な非イオン性界面活性剤は、顕著なエンドトキシンの不活性化効果を示すことが見出された。1 $\mu\text{g/ml}$ のエンドトキシンに対しては、通常の滅菌条件 (121°C, 20分間) で十分な不活性化効果は得られないが、界面活性剤を0.1%添加することによって、日局や USP の基準に適合した結果が得られることが判明し、非イオン性界面活性剤はエンドトキシンの不活性化に極めて有効であることが示唆された。また、静脈内投与製剤の添加物として使用実績のある界面活性剤については、その使用可能な配合量の範囲内で十分なエンドトキシンの不活性化効果を示すことが判明した。よって、本研究で見出されたエンドトキシン処理法は同時に製剤を無菌化できること、乾熱法のように高温で処理する必要がないこと、さらに最終製品での処理が可能であることなどの利点があり、医薬品製造において幅広い適用が期待された。そこで、本処理法における非イオン性界面活性剤の特異性およびその作用機序について検討を行った。その結果、疎水基の炭素数が多い ($C \geq 12$) 界面活性剤を用いることが有効であり、臨界ミセル濃度 (CMC) を超える濃度の界面活性剤を添加し、曇点を超える温度で加熱処理することにより、エンドトキシンが効率的に不活性化されることが判明した。一方、作用機序に関しては、界面活性剤のエンドトキシン不活性化効果は加熱処理によるエンドトキシンの分子量低下を促進するものではなく、エンドトキシンの会合体の大きさを変化させることによるものでもないことが示され、界面活性剤とエンドトキシンとの疎水相互作用がエンドトキシンの不活性化効果に深く関与していることが推測された。n-ブタノールを用いた加熱処理時の界面活性剤油相モデルでエンドトキシンが効率的に不活性化されたことから、界面活性剤の相転移が関与していることが考えられた。以上の結果から、本処理法においては、界面活性剤の相転移や界面活性剤とエンドトキシンとの疎水相互作用が関与していることが考えられ、その重要な機構の1つにエンドトキシンの熱変性の促進が考えられた。

論文審査の結果の要旨

近年、製品の品質保証とその向上を目的として、最終製品の品質試験だけでなく、科学的根拠に基づいた製造工程および管理を行うことにより製品の品質を保証するという考え方、いわゆるバリデーションの概念が普及し、エンドトキシンの管理にもバリデーションが要求されるようになってきた。

古くからエンドトキシンの除去法や不活性化法が研究されてきたが、乾熱法 (250°C, 30分間) を用いる事が最も有利であるとされてきた。しかしながら、この方法は金属やガラスなどの耐熱性のある器具類にしか適用できない。また、活性炭、過酸化水素などの酸化剤、酸またはアルカリによる処理も有効であると報告されているが、これも被処理物に制限があり、製品への適用も困難である。種々の滅菌法の中で高圧蒸気滅菌法はコストや安全性の点で優れ、被処理物の適用幅が広いことから、滅菌処理に汎用されている。しかしながら、通常の加熱条件 (121°C, 20分間) ではエンドトキシンを完全に不活性化する事は出来ない。一方、LAL 試験法によりエンドトキシンの微量定量が可能となったことから、エンドトキシンの安定性に関する報告がいくつか見られるようになった。しかしながら、不活性化を目的にして高圧蒸気加熱処理を応用した例は殆ど見られない。そこで著者は、注射薬など液剤の滅菌処理に適した高圧蒸気滅菌法に着目し、最終製品あるいは乾熱処理に耐えられない容器、器具類の脱パイロジェン処理に高圧蒸気滅菌法が応用可能であるかを検討した。その結果、

- 1) 高圧蒸気加熱処理は低濃度のエンドトキシンの不活性化には有効であったが、濃度を上げた場合においては、基準に適合するものではなく、200°Cにおける加熱処理と同等程度でしかなかった。
- 2) 非イオン性界面活性剤は、高圧蒸気加熱処理によるエンドトキシンの不活性化を顕著に促進し、0.1%添加時では、通常の滅菌条件 (121°C, 20分間) で加熱処理を行うと日局や USP の基準に適合した結果が得られた。特に注射薬の添加物として使用実績のあるポリソルベート20およびポリソルベート80については、それらの使用可能な配合量

の範囲で十分なエンドトキシンの不活性化効果を示す事が判明した。

3) 本処理法においては、界面活性剤の親油基の長さがエンドトキシンの不活性化効果に影響し、炭素数14の界面活性剤が最も有効であった。本処理法におけるエンドトキシンの不活性化効果には、界面活性剤の相分離や界面活性剤とエンドトキシンの疎水相互作用が関与している事が考えられ、その重要な機構の1つにエンドトキシンの熱変性の促進が考えられた。

以上、著者は、簡便で有用性の高い高圧蒸気滅菌法を応用した新規なエンドトキシン不活性化法を開発した。本方法は、医薬品製造において幅広い適用が考えられ、この分野に著しい貢献を果たす事が明らかである点、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいと考える。