



# LAL Update

Volume 30, number 2

October, 2014

## Low Endotoxin Recovery (LER): 概説

LAL Update 日本語版は Associates of Cape Cod, Inc. (米国) にて作成された LAL Update を和訳したものです。日本語版の記載内容は、英語版作成時点のものであり、現状にそぐわない場合がありますので、各種規制等に関連する内容につきましては、当該規制、関連規制等でご確認ください。

編集部日より

LAL Update では、Low Endotoxin Recovery (LER) の問題を取扱います。LER は、2013 年春に開催された Parenteral Drug Association (PDA) の年次会議(フロリダ州オーランド)で、Chen と Vinther によって取り上げられて以来、多くの議論と関心を呼ぶテーマとなってきました。LER とは、特定の製剤あるいは成分の群に添加されたエンドトキシンの一部または全量が検出できない問題です。製剤のエンドトキシン汚染が、出荷試験で検出されない懸念が生じることから、FDA もこの現象に対する関心を高めています。エンドトキシンが添加されても LAL 試薬を用いたエンドトキシン試験法では検出不能である試料が、ウサギを用いた発熱性物質試験で発熱性を示したとの報告によって、このような懸念は高まっています。

LER 問題の認識により、製剤中のエンドトキシンが(汚染物質として存在するか・添加されたかにかかわらず)十分検出されるような適切な分析法開発およびバリデーションの重要性が増しています。

Michael Dawson, Ph.D., RAC



# Low Endotoxin Recovery (LER): 概説

## はじめに:

“low endotoxin recovery”(LER)は、2013年4月のオープンフォーラムで初めて紹介された比較的新しい問題である。本稿では、この問題を取扱った公表文献や発表を再検討し、LERに関わる現状と本質的なテーマを合わせて評価する。

## 定義:

LERとは、最も簡潔に言えば、製品陽性コントロール(Positive Product Control: PPC)で阻害が示されないにもかかわらず、製剤中または中間体中の既知の(添加された場合が多い)エンドキシンの全ては検出できないことである。LERの特徴としては、測定可能なエンドキシン濃度の経時的な(試料保存中など)低下が通常認められる。測定可能なエンドキシンの減少しても、USPの発熱性物質試験では引き続き発熱性を示すことがあると報告されている。無希釈試料に添加エンドキシンの「スパイク」された場合にのみ、LERが顕在化することがある。

LERについて最初に記述したChenとVinther<sup>1</sup>は、現象を狭義に定義し、添加剤の組み合わせに起因する、無希釈の物質に加えられたエンドキシンのマスキングに限定した。上記著者らは、API(Active Pharmaceutical Ingredient: 医薬品有効成分)、特に蛋白質が引き起こすエンドキシンのマスキングとLERとを明確に区別し、緩衝液(特にクエン酸緩衝液とリン酸緩衝液)とポリソルベートの併用に注目した。その他の著者らは、蛋白質に起因するエンドキシンの試料からの同様の減少を報告し、Chenによって説明された作用と同様であることから、これらの減少もLERとして説明した。

LERは阻害因子に関するUSP BET(Bacterial Endotoxins Test: 細菌内毒素試験)では検出されない。この試験では、試験を実施する希釈段階で、既知量のエンドキシン標準品(PPC)を試料に加え、添加したエンドキシンが適切に検出されることを確認する。PPCが検出されても、LERが存在しないことの保証にはならない。その理由は2つある。第1に、希釈した試験試料に加えられたエンドキシンは、無希釈試料に添加された場合と同じようにはマスキングされない可能性がある。第2に、反応干渉因子の試験は通常エンドキシンの添加直後に実施されるが、LERの特徴である検出可能なエンドキシンの減少には、相当な時間を要する可能性がある(ただし、急速に起こる場合もある)。

本稿では、試料において検出可能なエンドキシンの減少があれば、それをLERであるとする、作用に基づく実質的な見方を採用する。患者(ひいては規制当局)にとって、エンドキシンのマスキングがポリソルベートおよびクエン酸によるものか、医薬品有効成分/原薬によるものか(あるいは2つの組み合わせによるものか)は問題ではない。問題なのは、エンドキシン試験で検出されない可能性がある発熱性を示す濃度のエンドキシンを、製剤が含有しているか否かである。

## 機序

LERは様々な試料マトリックスで観察されることから、エンドキシンがマスキングされる機序は複数あることが予想できる。とりわけ蛋白質も含めたAPIによるマスキングを広義のLER定義に含めると、このことは特に当てはまる。LER機序に関する仮説がいくつも提案されているが、具体的には解明されていない。LERについて最初に公に説明した発表においてChenとVinther<sup>1</sup>は、キレート剤およびポリソルベートの存在

下で、エンドキシンは、LAL反応を開始するリポ多糖(LPS)結合受容体であるC因子と結合しない、著者の言うLER複合体を形成することを示唆した。より最近の発表でChen<sup>2</sup>はこの複合体のことを「混合」ミセルであるとしている。Reich<sup>3</sup>は、低濃度の界面活性剤(0.0001% v/v ポリソルベート 20)の存在下では、ポリソルベートの非存在下における同じエンドキシン濃度と比較して、エンドキシン活性が約180%まで増強されることを示した。より高濃度では活性は低下し、約0.0025% v/v ポリソルベート 20ではほぼゼロまで低下する。上記著者らは、LPSと界面活性剤の比が1:1となる界面活性剤濃度では、より増強した活性を示すLPSと界面活性剤の凝集複合体が形成される可能性があるとの仮説を立てている。

界面活性剤濃度がさらに上昇すると、酵素を活性化しない界面活性剤-LPS凝集体の再構築により、LPS活性が急激に低下する。(Reichらの試験<sup>3</sup>では、エンドキシン濃度の測定にEndoLISAエンドキシン試験を使用した。)ReichとGrallert<sup>4</sup>はポスター発表で、本モデルに追記し、エンドキシンのマスキングは2段階のプロセスであると示唆した。第1段階は、(クエン酸などによる)キレート化に起因する二価カチオンの枯渇によるエンドキシンの脱凝集化である。第2段階は、界面活性剤等の両親媒性分子による、解離したLPSエンドキシンの不活化である。

Williams<sup>5</sup>は蛋白質溶液からの添加エンドキシンの回収が困難であることを考察し、モノクローナル抗体(mAb)の凝集状態がエンドキシンの結合の程度に影響を及ぼす可能性を示唆している。蛋白質凝集状態が安定でない可能性があるため、ある試験で添加エンドキシンが良好に回収できたとしても、その状態は後の製品バッチ試験で再現されない可能性がある并注意喚起している。これらの考察は、従来型の干渉とLERの両者に当てはまるであろう。

Williams<sup>6</sup>はLERに関するより最近の発表で、(蛋白質に対立するものとして)エンドキシンの凝集状態の意義に焦点を当てた。彼は、生物活性を有するエンドキシン単位としての凝集体に関してMueller<sup>7</sup>の論文を引用し、界面活性剤によるエンドキシンミセルの脱凝集化がLERの原因であると示唆されていると述べた。その後の論文<sup>8</sup>で、彼はマスキングの原因と思われる2つの要素(蛋白質および添加剤)を組み合わせ、その複合効果について検討している。

## 規制上の考察

Chen<sup>2</sup>は、LERの問題を特定した後、Genentechが生物製剤逸脱報告(Biological Product Deviation Report)/製品に関する通信文(Product correspondences)およびType C Meetingにおいて、FDAに対してどのようにLER問題を報告したかを述べた。ChenとVinther<sup>1</sup>は、PDAの2013年次会議でこのテーマに関する情報を業界に対して提示した。それ以来、FDAはLilly<sup>9</sup>、Janssen<sup>10</sup>を含むその他の製造業者に対し、LERに関する情報を提出するよう求めた。2013年のPDA Pharmaceutical Microbiology会議では、FDAのHughesが議論の中で、FDAはLERを懸念していると述べた。FDAは、LERの可能性が示唆される処方薬の製品、すなわちポリソルベートを用いて製剤化された生物学的製剤に対する新規申請に対して、標準的な一連の質問をしている。彼女はまた、これは現在のところ新薬承認申請にのみ適用され、承認済みの製品には適用されないとも述べた。同様に、FDAの上級微生物学審査官であるMello<sup>11</sup>は発表の中で、ポリソルベート界面活性剤を含むすべての製剤について、FDAは保持時間試験(hold time studies)を求めていると述べた。ここには、無希釈製剤にエンドキシンを添加した後、適切な保存条件下で保持した物質について、検出可能なエンドキシン濃度を経時的に測定することも含まれるであろう。検出可能なエンドキシン濃度の経時的な低下は、LERを示唆する。

FDA が要請した種類の試験の一例として、Janssen Biotech<sup>10</sup> が実施した試験が挙げられる。同社は、ヒスチジン、ポリソルベート 80 およびスクロースを用いて製剤化した Sylvant (siltuximab シルトキシマブ) の製剤化後のバルク製剤、プラセボおよび凍結乾燥後の最終製剤のバッチのサンプルに対して、保持時間試験を実施した。FDA は、コントロールスタンダードエンドトキシン (CSE) の使用を推奨した。FDA により要求された CSE のデータに加えて、*R. pickettii* (自家単離) 由来の天然に存在するエンドトキシン (NOE) の未精製調製液に関するデータを提出し、無希釈原薬の試験では *P. aeruginosa* も使用された。これらの試験では、添加されたエンドトキシンは予想通り回収され、LER は確認されなかった。

## 時間および温度の影響

Chen と Vinther<sup>1</sup> は、LER 問題に関する最初の報告で、LER 現象は 2~8°C と比べて室温下において、より急速に発現したと報告した。Chen<sup>2</sup> は、LER は極めて急速に発現すること、また、製剤が LER を示すか否かの決定には 7 日間のインキュベーションで十分であるとも示唆している。Reich<sup>12</sup> および Reich と Gallert<sup>4</sup> も、検出可能なエンドトキシンの減少は、4°C よりも室温でより急速に認められることを示した。10 mM リン酸の場合、4°C では検出可能なエンドトキシンの明らかな減少は認められなかったが、室温下では (少なくとも、試験を行ったほぼ 400 時間にわたって) 明らかに認められた。ポリソルベート/クエン酸では、LER はいずれの温度でも明らかに認められた。Reich<sup>13</sup> は、LER の速度は成分に依存すると述べ、ポリソルベート+クエン酸で最も大幅かつ急速であり、マスキングは時間および温度に依存することを示している。[Chen<sup>2</sup> がはるかに低濃度 (例: 5 EU/mL) のエンドトキシンを使用したのに対し、Reich<sup>12</sup> が高濃度 (100~245,000 EU/mL) のエンドトキシンを使用したことは注目に値する。]

Platco<sup>14</sup> は、LER が発生し得る速さについてコメントし、製剤へのポリソルベート 80 の添加後数分以内に、検出可能なエンドトキシンが減少することを報告した。これらの状況下では、時間 0 の時点で添加エンドトキシンを 100% 回収するほど早く試験を開始することはできない。試料が製造区域から試験室へ搬送されるまでに、すでにマスキングが発生している。

## 添加剤と LER

上記の LER の定義に関する項で述べた通り、Chen と Vinther<sup>1</sup> は、LER とは添加剤の影響による検出可能なエンドトキシンの減少であると具体的に定義した。彼らは、ポリソルベートまたは緩衝液単独ではなく、ポリソルベートと緩衝液 (特にクエン酸およびリン酸緩衝液) の組み合わせを LER の原因と特定した。Reich と Gallert<sup>4</sup> はこれを確認している。これらの研究者は 7 日後の LPS 回収率について次の通り報告している。水: 100%、10 mM クエン酸緩衝液: 100%、0.05% (w/v) ポリソルベート 20: 84%、クエン酸緩衝液+ポリソルベート 20: 0%。Dubczak<sup>15</sup> はポリソルベートおよびクエン酸における RSE に対する LER を報告した。

Burgenson<sup>16</sup> は、LER 現象は現実であり、LER は試験した 4 種類のエンドトキシン (RSE、CSE および 2 種類の NOE) すべてに影響を及ぼしたと結論付けた。彼は 0.05% のポリソルベート 20 によってエンドトキシン回収率が低下し、クエン酸、リン酸緩衝食塩水または Tris-HCl 緩衝液と組み合わせるとその作用が増強することを見出した。クエン酸緩衝液はエンドトキシン回収率を特に低下させた。

Chen と Vinther<sup>1</sup> および Reich と Gallert<sup>4</sup> の両報告とは対照的に、Bolden<sup>9</sup> はポリソルベートと様々な緩衝液の組み合わせ (すなわちポリソルベート 80 とクエン酸、ペプチド、マンニトールまたはグリシン) によって製剤化した抗体では LER が認められないが、クエン酸単独では

認められることを見出した。Reich<sup>12</sup> も様々な有機化合物単独における LER を報告している。これには、クエン酸、リン酸、酢酸および MES 緩衝液、ベンズアミジン (プロテアーゼ阻害剤)、EDTA ならびにジメチルスルホキシドが含まれる。

他のいくつかの試験とは対照的だが、Bolden とは同様に、Platco<sup>14,18</sup> はポリソルベート 80 および CSE (モノクローナル抗体の非存在下) を含有するリン酸緩衝液において LER が最小であることを示した。また、ポリソルベート 80 入りのヒスチジン緩衝液 (すなわち、キレート作用のあるクエン酸非存在下) では、CSE でも NOE でも、LER は認められないことを報告している<sup>18</sup>。

## 蛋白質

Chen と Vinther<sup>1</sup> が蛋白質によるエンドトキシンのマスキングを LER の定義から除外した一方、蛋白質に起因する、LER 様の時間依存的なエンドトキシン回収率の低下が報告されている。しかし、Bolden<sup>9</sup> は蛋白質原薬またはクエン酸を用いて製剤化した製剤 (低および高蛋白質濃度の双方) では LER は発生しないと報告し、他の著者らは、蛋白質、あるいは添加剤入りの蛋白質製剤について、LER 型の影響を報告している。例えば、Dubczak<sup>15</sup> は蛋白質調製液に RSE を添加した場合の LER を報告し、NOE ではより程度が低いことを報告した。

Williams<sup>6</sup> は、エンドトキシンの解離よりも、蛋白質結合の方が重要である可能性を示唆した。Williams<sup>5</sup> は他の発表で、LER は添加剤 (ポリソルベートおよび緩衝液) に限定されないとし、「ポリソルベートの存在は、一部の生物製剤にとって、LER 作用における蛋白質の役割に対して、必要なものというより裏付けに乏しいものである可能性がある」と述べている。彼は、ポリソルベートを用いて製剤化したある抗体製剤において、7 日間にわたって CSE に大きな減少がなかったと報告した。ポリソルベートおよびクエン酸を用いて製剤化した他の抗体製剤では、特に 4~7 日目にエンドトキシンが大幅に減少した。彼は、mAb の不安定な凝集状態が様々な程度のマスキングを生じうるとの懸念を表明している。

Platco<sup>14,18</sup> は、同じ処方 (クエン酸とポリソルベート 80 を含む) の 2 つの mAb に CSE を添加したときの顕著な LER を報告している (NOE では生じず)。1 つの mAb については、MgSO<sub>4</sub> を加えることで LER は (完全ではないものの) 概ね克服されたが、他の mAb では克服できなかった。処方の違いは含まれる mAb のみであったことから、この結果は、蛋白質がエンドトキシンのマスキングに関与していることを示している。他の mAb では、ポリソルベート 80 添加または無添加のヒスチジンにおいて、検出可能な LER は認められなかった。4 つ目の mAb では、ポリソルベート 80 添加リン酸緩衝液中で、4 時間後に CSE に対して LER が確認された (NOE では確認されず)。ある例では、LER 試験のためにエンドトキシンが添加されるまでは、製品陽性コントロール (PPC) に基づく阻害は認められず、添加後の PPC 回収率は 26% にとどまった。これらの試験では、蛋白質および添加剤のマスキングに対する相対的寄与度は特定されていない。

Reich<sup>12</sup> は、ウシ血清アルブミン (BSA) とクエン酸の混合物、ポリソルベートとクエン酸の混合物、ならびにこれら 3 つの混合物中における LER を報告している。BSA/クエン酸中の LER は不完全であり、エンドトキシンの回収率は 25% で安定化した。LER はポリソルベート/クエン酸において最も急速かつ完全であり、これら 3 つの成分の混合物中ではその中間であった。この BSA の結果から、蛋白質 (BSA) がエンドトキシンのマスキングを抑制することを示唆している。

Williams<sup>8</sup> は、LER が蛋白質または添加剤によって、あるいはこれら 2 つの組み合わせによって生じる可能性があることと結論付け、これをベン図で示している。彼は、蛋白質結合は蛋白質濃度とそれに付随した電荷に依存する可能性があることと示唆している。Reich<sup>13</sup> は同様の複合効果モデルを提案し、マスクングの 70%~100%は添加剤に、0%~30%は API に起因する可能性があるとした。エンドトキシンのマスクングは明らかに変動が大きく、製品中の添加剤と蛋白質の両者の性質と濃度の結果として生じる。また、エンドトキシンの性質による影響も受ける。

## 天然に存在するエンドトキシン (Naturally Occurring Endotoxin: NOE)

天然に存在するエンドトキシン (NOE) は、市販の培地上に増殖する基準菌株から得られることが多いため、未精製エンドトキシンと呼んだ方がよいであろう。それらは自然から直接得られるエンドトキシンではない。意味論はさておき、多くの著者ら (Cooper<sup>19</sup>、Platco<sup>14,18</sup>、Chen<sup>2</sup>、Reich<sup>13</sup> と Gralle<sup>4</sup>、Dubczak<sup>15</sup>、Burgenson<sup>16</sup>) は、精製した LPS である RSE および CSE よりも NOE の方がはるかにマスクングを受けにくいと報告している。Platco<sup>18</sup> は、企業の試験により、NOE は LER を示さないが、LPS は LER を示すことが明らかになってきていると述べ、Cooper<sup>19</sup> は、「この現象 (LER) の名称を "low LPS recovery (LLR)" と変更すべきである」と提案している。

Dubczak<sup>15</sup> は *E. cloacae*、*P. aeruginosa*、*E. coli* および *S. marcescens* 由来の NOE を検討し、異なる NOE 標品の間、ならびに使用した様々な定量法 [LAL、組換え C 因子 (rFC) リガンドアッセイおよび MAT] の間で、相対的検出率にばらつきがあることを見出した。Dubczak は、*E. cloacae* NOE (および *E. coli* NOE) での限られた LER について報告している (ただし、リガンドアッセイのみ) が、*E. cloacae* の NOE 標品を使用した者は誰もエンドトキシン試験で LER を経験したことがないと述べた。Chen<sup>2</sup> は、ある製剤において *E. cloacae* NOE で LER が明らかに認められたが、CSE との比較では、より不完全で緩徐であったとしている (168 時間後の NOE の回収率は 44% であったが、CSE では 24 時間後の回収率が 0% であったと報告している)。Burgenson<sup>16</sup> は、RSE および CSE と並んで、検討した 2 つの NOE (*P. aeruginosa* および *S. marcescens* 由来) でいずれも LER がみられたと報告した。要約すれば、マスクングは NOE でも起こり得るが、精製 LPS 標品よりも概して緩徐かつ/またはわずかなのである。

Mello<sup>11</sup> は、NOE を使用した試験は FDA によってレビューされているが、一般的には未だ受け入れられていないと述べた。彼は、企業が FDA にコンタクトし LER 試験について審査官とともに議論することを奨励した。また、FDA は 1970 年代におけるエンドトキシン標準品の問題を「再考」することを望んでいないとも述べた。[当時、複数の異なるエンドトキシンが使用され、結果は質量の単位 (例: ng/mL) で表記されていた。これらのエンドトキシンの単位質量あたりの活性は標品間でばらつきがあり、試験間で結果が比較不能であったことが問題であった。この経験から、FDA はエンドトキシン標準品 (reference standard endotoxin: RSE) を開発し、活性の指標としてその力価を EU/mL で表記することとした。]

Williams<sup>8</sup> は、Bowers と Tran<sup>20</sup> が用いたような、使用者が培養した微生物由来の NOE の使用は、添加効果の解離の克服に役立つことが証明されていると述べた。また、マスクングは CSE と同様に NOE でも生じる (ただし、遅延する可能性はある) が、Chen と Vinther<sup>1</sup> が最初に記述した通り処方依存性を示すとした Reich<sup>13</sup> の論文を引用している。彼は当該公表文献およびそれ以前の公表文献<sup>9</sup> において、選択される微生物によっては、NOE は変動しやすく矛盾する結果を生じる結果として注意喚起し、使用者が調製した NOE では標準化試験は極めて困難であろうと述べている。彼は発表<sup>6</sup> において、NOE の使用によって

LER が「見かけ上解決」される危険があると、天然に存在する未精製のエンドトキシン (NOE) とは対照的に LPS の疎水性部分 (すなわちリピド A) は細胞残屑を伴わないため、無希釈品への CSE の添加はワーストケースシナリオとなり得るとしている。Williams<sup>8</sup> は標準化されたエンドトキシン (CSE または RSE) を用いたシンプルなスクリーニングによる取組を推奨している。

Reich と Gallett<sup>4</sup> は、いくつかの NOE (および CSE) について、rFC アッセイでの LER を示し、LER は *E. cloacae* NOE で最もわずかなであったと報告している。彼らは、エンドトキシンのマスクングは、*E. coli* O55:B5 由来の LPS と同様、*E. coli* O113 と *E. coli* O55:B5 由来の 2 種類の NOE において室温下で等しく急速に生じることを見出した。4°C では、*E. coli* O113 NOE での LER は、*E. coli* O55:B5 LPS と同じ速さで生じたが、*E. coli* O55:B5 NOE または *E. cloacae* NOE よりも迅速であった。上記著者らは NOE の調製に用いられた微生物の増殖条件が LER 反応に影響を及ぼすことも報告している。よって、一部の NOE では、一部の LPS 調製液と同様に、急速にマスクングが起こり得ることは明らかである。LER を示す可能性という意味では、NOE と LPS の間に明確な区別はない。

## LER の克服

様々な物質がエンドトキシンの検出に干渉することはよく知られており、その干渉を克服するため、同様に様々な方法が用いられている。LER を克服するための方法についても、すでにいくつも記述されている。Burgenson<sup>16</sup> はエンドトキシン試験の典型的な干渉と同様に、試料を 1/1000 に希釈することにより、LER 試験における添加エンドトキシンの回収率が顕著に改善し得ると報告している。Platco<sup>14</sup> は MgSO<sub>4</sub> の添加により、クエン酸およびポリソルベート 80 を含む (mAb 以外は) 同じ処方 2 種類の mAb のうち 1 種類において、LER が大幅に軽減されたことを示した (他方の mAb では軽減されず)。リン酸ナトリウムおよびポリソルベート 80 を含む処方の第 3 の mAb では、MgSO<sub>4</sub> の添加により、LER は部分的に克服された (ただし、回収率は 50% 未満)。また、彼女は発表において、凍結融解によってマスクングは軽減される可能性があることと述べたが、具体的内容は示さなかった。Platco<sup>18</sup> は他の報告で、CSE 添加前の試料にエンドトキシン分散剤 (詳細不明) を加えると、LER は確認されなかったと述べている。Associates of Cape Cod, Inc. (ACC 社) も、同様の方法でエンドトキシンのマスクングを克服できることを立証している (未公表データ)。

Reich<sup>12</sup> はエンドトキシンの脱マスクングを報告しているが、これはエンドトキシンの添加濃度がおよそ 10,000 EU/mL 以上においてのみ現実的に効果的であった。彼は、異なるマトリックスには異なる脱マスクング方法が必要であるとしている。脱マスクング方法の詳細は記載されていないが、他の発表では、独自の脱マスクング剤に言及している<sup>13</sup>。彼は、3 段階のエンドトキシン濃度のポリソルベート 20/クエン酸溶液で、*E. coli* O55:B5 (おそらく CSE) 由来のエンドトキシンが効果的に脱マスクングされたと報告し、脱マスクングは可能であるが、一般的な脱マスクング方法は利用できないと結論付けた。処方異なれば、異なる脱マスクング方法が必要となる可能性が高い。

Williams<sup>5</sup> は、界面活性剤 (詳細不明) の添加とそれに続く界面活性剤溶液での希釈により、ポリソルベート 80 を含む mAb 溶液に添加されたエンドトキシンが回収されたと報告している。彼は他の報告<sup>8</sup> で、プロテアーゼ処理後、数日間の冷蔵後に添加エンドトキシンの 100% が検出されたことを報告した Pestch ら<sup>21</sup> の報告を引用した。Platco と共通して、Williams もパイロスペース<sup>TM</sup> (Pyrospers<sup>TM</sup>) がエンドトキシンの回収に役立つ可能性があるとし、正常血清アルブミン、血漿蛋白質分画、電解質溶液、抗血友病因子および脂肪乳剤の例を挙げた。彼は、プロテアーゼ K と独自のプロテアーゼ (BioDtech, Inc.) の両者を用いて、IgG を

プロテアーゼ消化した後、加熱してプロテアーゼを(LAL 試薬を分解しないよう)変性させエンドトキシンを脱マスクングしたことを報告した<sup>6</sup>。また、ポリソルベートおよびクエン酸を用いて製剤化した抗体では、特に4~7日目にエンドトキシンの顕著な減少が認められたとも報告している。ただし、エンドトキシンの添加濃度は半減されたにもかかわらず、「希釈液組み合わせ(diluent combinations[原文ママ])」の改変後は、添加エンドトキシンの70%以上は、7日後に回収された。Reichと同様、Williams<sup>8</sup>もLER問題の解決策は処方大きく依存すると述べた。

## 結論

LERに関する発表および公表文献を今回調査した結果、以下の点などが挙げられる。

1. LERの特徴は、添加されたエンドトキシンが時間とともに十分に回収できなくなることである。
2. 添加されたエンドトキシンのマスクングは、特に室温以上の温度で直ちに発生し得るが、エンドトキシンの回収率が経時的に減少するか否かを決定するには、経時変化を調べる実験計画が必要である。
3. この現象は、添加剤、特にポリソルベートを含む処方と関連しているが、ポリソルベートの非存在下でも報告されている。検出可能なエンドトキシンの減少とポリソルベートを含む処方との関連が強いことから、FDAはこのような処方の製品の医薬承認申請の場合は、常にLER試験のデータを求めるようになった。
4. LERの影響は一部の蛋白質においても認められる、あるいは、LERの作用は蛋白質によって修飾される。
5. NOEは概して、RSEおよびCSEなどの精製エンドトキシン(LPS)よりもLERが起きにくい。NOEは標品間でばらつきがあり、特別な調製法が必要であるとされている。
6. ワーストケースを示すとの理由から、LER試験ではCSEなどのLPS標品を使用することを推奨する著者もいる。CSEに対してマスクングを克服できれば、未精製エンドトキシンでもマスクングが生じにくくなると考えられる。今日までに報告された試験では、LPSがNOEよりも容易に回収された例はない。一方、少なくとも1試験で、NOEはLPS標品と同程度にマスクングを受けやすかった。1名の著者がNOEの回収率に頼ることは危険であろうと提案している。
7. LERを克服する方法はいくつもあるが、それらは製品に特異的なものである。異なる製品および添加剤では異なる相互作用が認められることから、処理が製品に特異的なものであることは驚くにあたらない。これは、エンドトキシン試験に対する干渉の克服に関する状況と同じである。

結論として、LER問題に対処するために2つの一般的な戦略が推奨されている。

第1は、製品が後に処方によってマスクングされるようなエンドトキシンを含む可能性を最小限に抑えることである。これには、製品に入るすべての原料と、製品の製造に関わるすべての工程において、エンドトキシン汚染の可能性を管理する必要がある。これは目新しいことではなく、すでに製造工程に含まれているべきことである。Williams<sup>5</sup>は、「極めて清浄な薬液(エンドトキシンフリー)の最善の保証は、該当する工程段階でエンドトキシンを確実に除去し、製造工程におけるバイオペーンを防止することである」と述べている。Chen<sup>2</sup>も同様にこのことを推奨しており、LERに関するリスク分析は、LERが認められない、製造工程の流れの最も離れた段階から開始すべきであると提案している。

第2の全般的な戦略はLER試験の実施であり、LERが示された場合は、それを克服するための分析法開発試験を実施することである。マスクングされたエンドトキシンの回収と検出のための方法がいくつも提示されてきた。適切な分析法開発を行い、試料の処理方法について適切なバリデーションを行うことにより、エンドトキシンの急速なマスクングによって検体から検出可能なエンドトキシンが製造区域から試験室への移動の間に減少するといった、Platco<sup>14</sup>が説明した状況(本稿にて前述)が回避されるであろう。

## 参考文献

1. Chen, J. and A. Vinther. 2013. Low Endotoxin Recovery (LER) in Common Biologics Products. Presented at the Parenteral Drug Association Annual Meeting, Orlando, FL.
2. Chen, J. 2014. Risk Management on Common Biologics Affected by Low Endotoxin Recovery. Presented at the Pharmaceutical Microbiology Forum Bacterial Endotoxins Summit Meeting, Philadelphia, PA.
3. Reich, J., H. Grallert, W. Mutter, B. Buchberger, H. Motschmann. Low Endotoxin Recovery in Common Protein Formulations. <http://www.endotoxin-test.com/wp-content/uploads/2013/10/Low-Endotoxin-Recovery-in-Common-Protein-Formulations.pdf> (accessed Oct. 14, 2014).
4. Reich, J. and H. Grallert. 2014. Low Endotoxin Recovery in Bio-Pharmaceuticals: Comparison of Natural Occurring Endotoxins (NOE) and Commercial Standards. Poster presentation at the Parenteral Drug Association Annual Meeting, San Antonio, TX.
5. Williams, K. L. 2013. Endotoxin Test Concerns of Biologics. *In* Endotoxin Detection: Techniques and Development, Supplement to America Pharmaceutical Review. <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/148864-Endotoxin-Test-Concerns-of-Biologics/> (accessed Oct. 14, 2014).
6. Williams, K. L. 2014a. Endotoxin Aggregation & Binding Properties... Recovering endotoxin spikes from products & container-closures. Presentation at the Parenteral Drug Association Conference, Berlin, Germany.
7. Mueller, M., B. Lindner, S. Kusumoto, K. Fukase, A. B. Schromm, and U. Seydel. 2004. Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J. Biol. Chem.* 279:26307-26313.
8. Williams, K. L. 2014b. Endotoxin Test Concerns of Biologics Part II: Developing New Tools. *In* Endotoxin Detection Part II: Concerns, Innovations and a Look Back, Supplement to America Pharmaceutical Review.
9. Bolden, J. 2013. An Approach for Successful Endotoxin Challenge Study Design to Mitigate Low Endotoxin Recovery Concerns. Presentation at the Parenteral Drug Association Pharmaceutical Microbiology Meeting, Bethesda, PA.
10. FDA Microbiological Review of an Amended Biologic License Application. 2014. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2014/125496Orig1s000MicroR.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/125496Orig1s000MicroR.pdf) (accessed Oct. 14, 2014).
11. Mello, R. J. 2014. LER: An FDA Reviewer's Perspective. Presented at the Pharmaceutical Microbiology Forum Bacterial Endotoxins Summit Meeting, Philadelphia, PA.
12. Reich, J. 2013. An advanced endotoxin assay insights and strategies for overcoming Low Endotoxin Recovery in complex formulations. Presentation at the Parenteral Drug Association Pharmaceutical Microbiology Meeting, Bethesda, PA.
13. Reich, J. 2014. Reliability of Endotoxin-Detection Mechanistical Principles of Endotoxin-Masking and Strategies for De-Masking. Presentation at the Parenteral Drug Association Conference, Berlin, Germany.

14. Platco, C. 2014. Lab Experiences: Low Endotoxin Recovery. Presented at the Pharmaceutical Microbiology Forum Bacterial Endotoxins Summit Meeting, Philadelphia, PA.
  15. Dubczak, J. 2014. LER: A comparative, LAL/MAT/Ligand Assessment. Presented at the Pharmaceutical Microbiology Forum Bacterial Endotoxins Summit Meeting, Philadelphia, PA.
  16. Burgenson, A. L. 2014. Endotoxins from Different Sources: Variability in Reactivity and Recoverability. Presented at the Pharmaceutical Microbiology Forum Bacterial Endotoxins Summit Meeting, Philadelphia, PA.
  17. Bolden, J. 2014. Overcoming Interference in the bacterial endotoxins test: Through the looking glass. Presented at the Pharmaceutical Microbiology Forum Bacterial Endotoxins Summit Meeting, Philadelphia, PA.
  18. Platco, C. 2014. Low Lipopolysaccharide Recovery versus Low Endotoxin Recovery in Common Biological Product Matrices. *In* Endotoxin Detection Part II: Concerns, Innovations and a Look Back, Supplement to America Pharmaceutical Review.
  19. Cooper, J. F. 2014. How Can Water Interfere with BET? Presented at the Pharmaceutical Microbiology Forum Bacterial Endotoxins Summit Meeting, Philadelphia, PA.
  20. Bowers, K. and L. Tran. 2011. Creation of an In-house Naturally Occurring Endotoxin Preparation for Use in Endotoxin Spiking Studies and LAL Sample Hold Time Analysis. *American Pharmaceutical Review*, 14(6) 92-97.
  21. Petsch, D., W. D. Deckwer, F. B. Anspach. 1998. Proteinase K digestion of proteins improves detection of bacterial endotoxins by the Limulus Amebocyte Lysate assay: application for endotoxin removal from cationic proteins". *Analytical Biochemistry*, 259; 42-47.
-



資料請求先

生化学工業株式会社 LAL営業グループ  
〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目6-1  
Tel.03-5220-8953 Fax.03-5220-8956  
E-mail:lal@seikagaku.co.jp

発売元



**生化学工業株式会社**

〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目6-1

LAL20150129-1