

USP Forum, 41(5), 2015 年 9-10 月

〈1228.5〉 Endotoxin Indicators for Depyrogenation.

BRIEFING (状況説明)

The General Chapters—Microbiology Expert Committee proposes this new general chapter as an addition to the *Depyrogenation* 〈1228〉 family of chapters.

The effectiveness of the depyrogenation process can be measured biologically by conducting a challenge study using a known quantity of endotoxin that is attached to, or contained in a carrier, in a manner that is representative of the articles intended to be depyrogenated. In this chapter the biological tool used to challenge the depyrogenating capabilities of a process will be defined as an endotoxin indicator. The following topics will be discussed in this chapter: endotoxin and lipopolysaccharide, applications of endotoxin indicators, preparation and use of endotoxin indicators, and analysis of test results.

「General Chapters—Microbiology Expert Committee」は、この新たな一般情報の章を、これらの章の *Depyrogenation* 〈1228〉のファミリーとして加えることを提案する。

脱パイロプロセスの有効性は、キャリアー（担体）に既知量のエンドトキシンを添加（表面に付着させるか、含侵させる）したものを使用してのチャレンジ調査を行うことで、生物学的に測定することが出来る。この場合の既知量のエンドトキシンをスパイクしたものは、脱パイロをしようとする物品を代表するような方法で使用がされる。この章では、プロセスの脱パイロ能力をチャレンジするための生物学的なツール（道具）を、エンドトキシン・インジケータとして定義する。以下に述べる話題が、この章で議論されることになるであろう。：

- endotoxin と lipopolysaccharide
- endotoxin indicators の作成と使用
- 試験結果の分析

(GCM: R. Tirumalai.)

Correspondence Number—C161855

Comment deadline: November 30, 2015

(訳者注：文意がとりにくい部分や、使用単語の混乱（例えば “inoculate” と “spike”）があり、今後、かなり文章の変更があると思われる)

目 次

1. INTRODUCTION (はじめに)	2
2. ENDOTOXIN AND LPS (エンドトキシンと LPS)	4
3. APPLICATION OF ENDOTOXIN INDICATORS (エンドトキシンの指標の適用)	7
4. PREPARATION AND USE OF ENDOTOXIN INDICATORS.....	8
4.1 Methodology to Create a Laboratory-Prepared Endotoxin: Principles to Consider (ラボ調製のエンドトキシンをつくるための方法論：考慮すべき原則)	8
4.2 Inoculation of EIs (EIs の接種)	12
4.3 Recovery of Endotoxin from EIs (EIs からのエンドトキシンの回収)	14
4.4 Choice of Test Methodology for the Analysis of EIs EIs の分析のための方法論の選択)	17
5. ANALYSIS OF RESULTS OF DEPYROGENATION STUDIES (脱パイロ調査の結果の解析)	18
6. REFERENCES (文献)	20

* * *

Add the following:

■(1228.5) ENDOTOXIN INDICATORS FOR DEPYROGENATION
脱パイロのためのエンドトキシン・インジケータ

1. INTRODUCTION (はじめに)

Depyrogenation is defined as destruction or removal of pyrogens (see *Depyrogenation* (1228)). For the purposes of this chapter, the terms “bacterial endotoxin or endotoxin” refer to a component of the outer cell membrane of Gram-negative bacteria, which is known to induce a febrile response in humans and other mammals. The endotoxin complex contains many cell wall components including, but not limited to, phospholipids, lipoproteins, and lipopolysaccharides. Lipopolysaccharide (LPS) is the biologically active portion of both naturally occurring and laboratory-prepared endotoxin complexes. The USP Endotoxin Reference Standard (which, by convention, is abbreviated as RSE) and Control Standard Endotoxin (CSE) preparations

purchased from lysate manufacturers and other third-party vendors are not endotoxins but rather are preparations of purified LPS.

脱パイロジェン (depyrogenation) は、パイロジェンの破壊または除去として定義されている (Depyrogenation (1228)参照)。この章の目的から、“細菌性エンドトキシンまたはエンドトキシン (bacterial endotoxin or endotoxin)” の用語は、グラム陰性細菌の outer cell membrane (細胞外膜?) の成分を指す。これはヒト及びその他の動物での発熱応答 (febrile response) を引き起こすことが知られている。エンドトキシン複合体 (endotoxin complex) は、多くの細胞壁成分 (cell wall components) を含んでおり、例えば、リン脂質 (phospholipids)、リポたん白質 (lipoproteins)、リポポリサッカロイド (リポ多糖体; lipopolysaccharides) などが含まれる。Lipopolysaccharide (LPS) は、自然に生じたもの (naturally occurring)、およびラボで調製したエンドトキシン複合体 (laboratory-prepared endotoxin complexes) の両方とも、生物学的に活性のある部分を持っている。ライセイト (lysate) の製造業者および他のサードパーティのベンダーから購入した USP Endotoxin Reference Standard (慣例により RSE と略記する) および Control Standard Endotoxin (CSE) 標品は、エンドトキシンではなく、むしろ精製した LPS の標品である。

“Endotoxin indicators” (EIs) are tools that are used (where required) in conjunction with physical measurements to analyze the effectiveness of a depyrogenation process. EIs used to determine the effectiveness of dry heat depyrogenation processes are commonly purchased as glass vials that are inoculated with a known level of LPS activity. This chapter expands the definition of EI to include any carrier, including glass vials, inoculated with endotoxin or LPS that is used to challenge a depyrogenation process. EIs can be used to analyze the effectiveness of endotoxin removal by washing, rinsing, cleaning, or by using separation technologies, such as filtration or chromatography. Carriers can be a variety of materials, including rubber stoppers to assess stopper washing processes, bulk product to assess and validate processing steps, and stainless steel coupons to assess the cleaning of production vessels.

“エンドトキシン・インジケータ (endotoxin indicators)” (EIs) は、脱パイロプロセス (depyrogenation process) の有効性を解析するために、(必要な場合に) 物理的測定と組み合わせて使用されるツール (道具) である。乾熱脱パイロプロセスの有効性を測定するために使用される EIs は、一般的に既知レベルの LPS 活性を接種したガラスバイアルとして購入されている。この章では、EI の定義を脱パイロプロセスのチャレンジに使用するエンドトキシンまたは LPS を接種した (ガラスバイアルを含む) キャリアーにまで拡張する。EIs は、洗浄 (washing)、すすぎ (rinsing)、清浄化 (cleaning) による、あるいはろ過やクロマトグラフィのような分離技術を使用することによるエンドトキシン除去の有効性を分析するために、使用することができる。キャリアーには様々な物質を使用できる。それにはストッパー (訳注: 一般的にはゴム栓) 洗浄工程を評価するためのゴム栓、プロセスのステップを評価しバリデーションのためのバルク製品、そして製造容器の洗浄を評価するためのステンレス製クーポン (訳注: 電車の切符のような形状をしたもの) が含まれる。

Purified LPS, such as CSE obtained from lysate manufacturers or other third-party vendors, has historically been a convenient choice for use as the analyte used in the preparation of EIs. However, EIs prepared in-house using laboratory-derived endotoxin more closely mimic product contamination, and as a result can provide a more realistic assessment of the depyrogenating capability of various production processes than does highly purified LPS. This chapter provides information on the preparation and use of these more specialized indicators to assure both consistency and comparability of data among method development and validation studies.

ライセイト (lysate) 製造業者あるいは、他のサードパーティのベンダーから得られる CSE といった精製 LPS は、これまで、EIs の調製に使用する被検物質(analyte)として、使用に重宝する選択物質となっている。しかしながら、ラボ-由来のエンドトキシン(laboratory-derived endotoxin)を使用する自家調製の EIs は、製品の汚染をより厳密に模倣するものであり、その結果として、高度に精製された LPS よりも各種の製造プロセスの脱パイロ能力のより現実的な評価を提供することが出来る。この章は、試験法開発中とバリデーション調査中の、データの一貫性(consistency)と比較可能性(comparability)を保証するために、それらのより特異的なものとしたインジケータの調製と使用に関しての情報を提供する。

2. ENDOTOXIN AND LPS (エンドトキシンと LPS)

A bacterial endotoxin is defined in the *Introduction*. LPS is the biologically active portion of the naturally occurring and laboratory-prepared endotoxin complex. Highly purified LPS, extracted from the natural endotoxin complex, is used to prepare the primary compendial endotoxin Reference Standard (RSE) or secondary Control Standard Endotoxin (CSE) preparations, such as those purchased from *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) reagent manufacturers. LPS consists of three distinct regions:

バクテリアル・エンドトキシンは、Introduction (はじめに) の項において定義されている。LPS は自然に生じたものをラボで調製した、エンドトキシン複合体の生物学的に活性を持つ部分をもつものである。自然のエンドトキシン複合体から抽出されて、高度に精製された LPS は、一次の公的エンドトキシン Reference Standard (RSE)、または二次の Control Standard Endotoxin (CSE)の調製に使用される。RSE あるいは CSE は、*Limulus* amoebocyte lysate (LAL)の試薬製造業者から購入することが出来る。LPS は、以下に述べる 3つの異なった領域からなりたっている。 :

1. The structure of the hydrophobic lipid A portion of the molecule is the most highly conserved among Gram-negative species and is responsible for most, if not all, of the

biological activity of endotoxins.

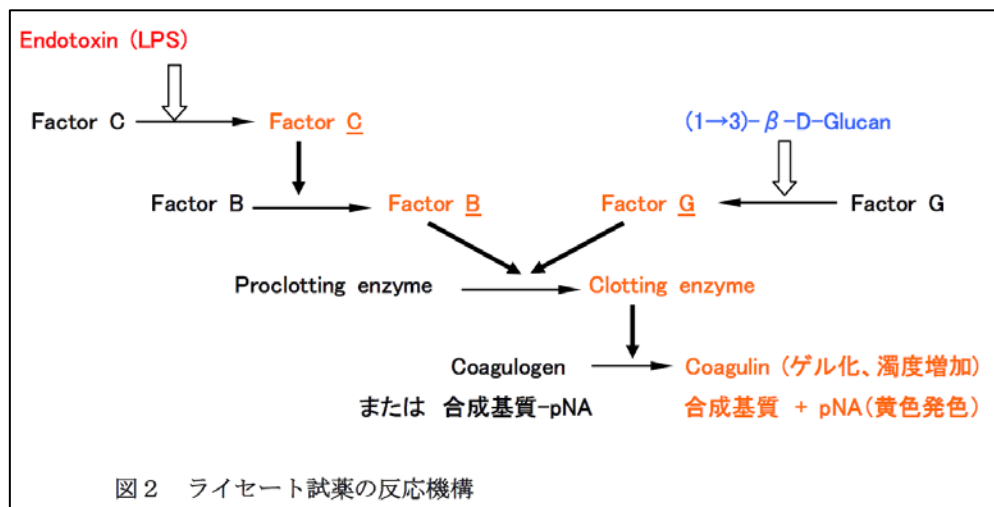
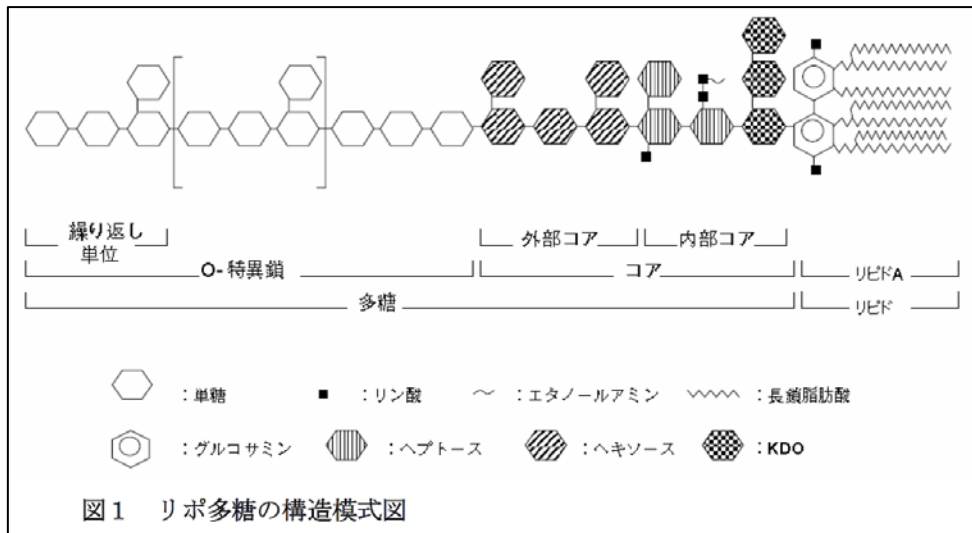
この分子の疎水性の lipid A 部分の構造は、グラム陰性菌種(Gram-negative species)の中でも最も遺伝的に保存されている部分(most highly conserved)であり、エンドトキシンの生物学的活性に最も（全てではないが）関与する部分である（訳注：この部分文章が欠落しているか?）。

2.A core oligosaccharide links the lipid A to the hydrophilic O-specific side chain or O-antigen.

コアオリゴ糖(core oligosaccharide)は、lipid A から親水性の O-specific side chain (O-特異側鎖) または O-antigen(O-抗原)にまで架橋している。（この訳文は検討が必要である。下記の図を参照のこと）

訳者注：エンドトキシンの構造を初心者が学ぶのであれば、以下の資料が参考になる（2015年9月29日アクセス）。
和光純薬工業「エンドトキシン試験 基本の「き」」

<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/images/product/endotoxin/books/kihon.pdf>



3. The hydrophilic *O*-antigen is a highly variable region that confers serological specificity to the organism and is often used to distinguish strains of Gram-negative bacteria.

親水性 *O*-antigen は非常に変動しやすい領域であり、この領域は、生物に対して血清学的な特異性を与えている。そのために、グラム陰性細菌の菌株の分別に使用される。

When drug products and devices are contaminated with endotoxin, the contaminant is not purified LPS but rather whole Gram-negative cells and/or cell wall fragments containing LPS. LPS and endotoxin are therefore dissimilar in many respects.

医薬品や医療機器がエンドトキシンで汚染を受けた場合、この汚染物は精製された LPS ではなく、むしろ汚染物質はグラム陰性菌体そのものであるか（あるいはそれに加えて）、LPS を含む細胞壁の断片 (cell wall fragments containing LPS) である。それゆえ、LPS とエンドトキシンは、多くの点で異なっている。

The amphipathic nature of the LPS molecule [i.e., having both a polar (hydrophilic) end and a nonpolar (hydrophobic) end] enables it to form complicated, three-dimensional, aggregated structures in solution. The aggregated forms of LPS have the capacity to adsorb, or “stick”, to surfaces, and depending on the LPS formulation and the surface, extraction and detection may prove difficult using conventional extraction methods (see below). The degree of aggregation of the purified molecule is also affected by the conditions to which the LPS is exposed. Factors such as temperature, pH, salt concentration, divalent cation concentration, chelating agents, and detergents can have a profound effect on the biological activity and stability of LPS in solution. Purified LPS preparations used for depyrogenation studies should not contain any “fillers” or excipients. The excipients that are commonly used in the formulation of CSE have been shown to reduce the heat resistance of LPS ([1](#)) and may interfere in the recovery of LPS because of a caramelized excipient that has been post-processed by dry heat.

LPS 分子の両親媒性 (amphipathic nature) [すなわち、極性 (親水性) の末端と、非極性 (疎水性) の末端を持つ] は、溶液中で複雑な三次元の凝集構造 (complicated, three-dimensional, aggregated structures) の形成を可能とする。LPS の凝集した形態は、表面に吸着 (adsorb) または “突き刺さる (stick)” 能力を持っている。そして LPS の組成と表面の種類によっては、従来の抽出方法 (下記参照) を使用しての抽出と検出が困難になる可能性を持っている。精製された分子の凝集の度合いもまた、その LPS が曝露される条件により影響を受ける。温度、pH、塩濃度 (salt concentration)、二価の陽イオン濃度 (divalent cation concentration)、キレート剤 (chelating agents)、および洗浄剤 (detergents) の様な因子は、溶液中において LPS の生物学的活性と安定性に重大な影響 (profound effect) を持っている。脱パイロ調査に使用される精製された LPS 標品

は、如何なる“fillers”(充填剤) や賦形剤(excipients) も含むべきではない。CSE の処方一般的に使用される賦形剤は、LPS の熱抵抗性を減じることが立証されており(文献1)、乾熱による副次的な処理(post-processed by dry heat)を受けてカラメル化した賦形剤(caramelized excipient)のためにLPSの回収にも影響が出る可能性がある。

Endotoxins contaminating parenteral products may exhibit greater stability of activity in solution and less surface adsorption than purified LPS. As well, the detection of endotoxin may be less influenced than LPS by aggregation, disaggregation, or other conformations induced by some product matrices. Information on principles to consider when preparing endotoxin in the laboratory can be found below.

注射剤に含まれているエンドトキシンは、溶液中で、活性については大きな安定性を示し、かつ精製されたLPSよりも表面吸着性が低いであろう。更に、エンドトキシンの検出は、凝集化(aggregation)、解離(disaggregation)あるいは、ある種の医薬品マトリックス(product matrices)によって誘導されるその他の形態(conformations)に対しては、LPSよりも影響を受けにくいと考えられる。ラボにおいてエンドトキシンを調製する場合に考慮すべき原則に関する情報は、以下の項に示した通りである。

3. APPLICATION OF ENDOTOXIN INDICATORS

(エンドトキシンの指標の適用)

The choice of an EI should be relevant to the process being validated. For physical depyrogenation, such as dry heat, the carrier material for the EI may be a surface such as a glass vial or appropriate coupon material onto which a known quantity of LPS or of endotoxin has been inoculated. For stopper washing/depyrogenation studies, stopper carriers are inoculated with known levels of LPS or endotoxin. For raw materials or process intermediates that are inherently contaminated with assayable levels of endotoxin activity, there may not be a need to add LPS or endotoxin to validate endotoxin reduction in the manufacturing process, as the level of contamination may be sufficient to accurately measure activity upstream and downstream of the depyrogenating step(s).

EIの選択は、バリデーションを行うプロセスに関連付けをすべきである。乾熱のような物理的な脱パイロにあっては、EI用のキャリアーの材質は、ガラス製バイアルまたは、クーポンの形状をして適切な材質といった表面に、LPSまたはエンドトキシンの既知量を接種する。ストッパー(訳注:一般にはゴム栓)洗浄の脱パイロに関しては、ストッパー・キャリアーを、既知量のLPSまたはエンドトキシンの既知量を接種する。定量可能な量のエンドトキシンの既知量を元々(inherently)汚染している原料(raw materials)または工程中間品(process intermediates)に対しては、製造工程でのエンドトキシン減少をバリデーションするために、

LPS あるいはエンドトキシンを添加する必要が無いであろう。というのは、汚染のレベルが、脱パイロ工程（単数または複数）の上流側および下流側での活性を正確に測定できるのに十分だと思われるからである。

For processes using raw materials or for upstream intermediates that are not contaminated with endotoxins, the use of either the USP RSE or CSE, which are both highly purified preparations, may not reflect the actual removal or reduction potential of the product stream depyrogenation step(s) under challenge. For these purposes, endotoxins harvested from Gram-negative cultures may be more suitable for depyrogenation processes typically found in biopharmaceutical product streams. The cell wall fragments and outer membrane constituents associated with these endotoxins represent realistic challenges to process operations such as ultrafiltration, affinity chromatography, and the use of charged media membranes or columns.

エンドトキシンで汚染されていない原料あるいは上流にある工程中間品(upstream intermediates)を使用するプロセスに対しては、USP の RSE または CSE（両方とも高度に精製された標品である）の何れかを使用することは、チャレンジを行う製品の製造工程の脱パイロステップ（単数または複数）（product stream depyrogenation step(s)）の実際の潜在的な除去または減少の力を反映するものとはならないであろう。これらの目的には、グラム陰性菌の培養物（Gram-negative cultures）から取り出した（harvested）エンドトキシンが、バイオ医薬品の製造工程(biopharmaceutical product streams)で一般的にみられるような脱パイロ工程に関しては、より適切であると考えられる。それらのエンドトキシンと関連する細胞壁断片（cell wall fragments）および外膜構成物(outer membrane constituents)は、限外ろ過(ultrafiltration)、親和性クロマトグラフィ(affinity chromatography) および荷電されたる過材のメンブラン(charged media membranes)またはカラム(columns)の様なプロセスでの操作に対する現実的なチャレンジを示すものである。

Challenge studies for LPS or endotoxin removal in process streams should be conducted at the laboratory or pilot scale so as not to introduce high levels of endotoxin or LPS into the actual production environment.

プロセスの流れ(process streams)における LPS またはエンドトキシンでのチャレンジ調査は、ラボまたはパイロットスケールで行うべきである。これは、実際の製造環境に高濃度のエンドトキシンあるいは LPS を入れないようにするためである。

4. PREPARATION AND USE OF ENDOTOXIN INDICATORS

（エンドトキシン指標の作成）

4.1 Methodology to Create a Laboratory-Prepared Endotoxin: Principles to Consider

(ラボ調製のエンドトキシンをつくるための方法論：考慮すべき原則)

Glass vial EIs purchased from third-party vendors do not need further preparation before use. These indicators are labeled with a nominal value of inoculated LPS, and the label claim should be confirmed upon receipt to assure that there is sufficient activity (endotoxin unit, or EU) available for the study.

サードパーティのベンダーから購入したガラス製バイアルの EIs は、使用前に更に調製作業を行う必要はない。それらのインジケータは、接種された LPS の公称値(nominal value)が表示されているが、そのラベルの主張は、調査に使用する利用するのに十分な活性 (endotoxin unit, または EU) があることを保証するために、確かめるべきである。

- There is not one “best” or “standard” method for preparing endotoxin in the laboratory, but one example of a published method for the preparation of laboratory-prepared endotoxin may be found in Bowers and Tran (2). Regardless of the methodology for preparation, the following recommendations should be considered to properly and consistently produce, identify, and maintain laboratory-prepared endotoxin for use as a tool for depyrogenation studies. An appropriate Gram-negative bacterial strain from a recognized culture collection is a good choice for preparing a laboratory-derived endotoxin. Alternatively, a Gram-negative organism isolated from a facility, water system, raw material, or product that is identified to the species level, that has been shown to be genetically stable and that is properly maintained, may also be considered. Establishing the identity and baseline genetic fingerprint of an environmental organism will assure that subsequent preparations are consistent.

ラボにおけるエンドトキシン調製のための一つの“ベスト(best)な”または“標準的な(standard)”方法は存在していない。しかし、ラボ-調製のエンドトキシン(laboratory-prepared endotoxin)の調製のための公表された方法についての一つの事例を、Bowers and Tran (文献2) にみることが出来る。調製の方法論の如何に係わらず、以下に述べる推奨は、脱パイロ調査のツールとして使用するためのラボ-調製のエンドトキシンを、適正かつ恒常的に調製し(produce)、特定し(identify)、かつ保持する(maintain)と考えられる。ラボ-由来のエンドトキシン(laboratory-derived endotoxin)を調製するためには、公知されている菌株保存機関(recognized culture collection)からの適切なグラム陰性菌株を使用することが、よい選択方法である。あるいは、施設、水システム、原料あるいは製品から分離されたグラム陰性菌もまた考慮対象となる。ただし、その分離菌は、種(species)レベルまで同定されて、遺伝的に安定であることが立証されており、かつ適正に維持されていることが必要である。環境微生物の同定と baseline genetic fingerprint (訳語

不明：「ベースラインとなる遺伝的認証」?) の確立は、その後の調製物の恒常性をもつことを保証するものである。

- The laboratory should create detailed procedures or laboratory work instructions for culture maintenance and endotoxin preparation to assure consistency between batches of endotoxin. For example, endotoxin may be isolated from a live culture or a culture that has been subjected to autoclaving by filtration through a filter of 0.22- μm pore size into a sterile container. Whatever the methodology for growth and endotoxin isolation that is developed by the laboratory, the methodology should be documented and used consistently.

ラボは、エンドトキシンのバッチ間の恒常性を保証するために、培養菌の保持とエンドトキシンの調製についての詳細な方法あるいはラボ作業指示書(laboratory work instructions)を作成すべきである。例えば、生きている培養物(live culture) から、あるいは無菌の容器に 0.22 μm の孔径のフィルターを通してのろ過により、それをオートクレーブした培養物から、エンドトキシンを分離することが出来る。ラボが開発したグラム陰性菌の生育方法やエンドトキシンの分離がどの様なものであっても、その方法論は文書化を行い、常にそれを使用すべきである。

- Consistent with good microbiological practice, the culture and maintenance of the cells used to produce a laboratory-prepared endotoxin should be consistent with *Microbiological Best Laboratory Practices*(1117). Instructions on: 1) the proper maintenance of the organism; 2) growth conditions, including any requirements to prepare media, nutrient requirements, and time/temperature of incubation; 3) methods for cryopreservation or lyophilization for master cell banks and working cell banks; 4) storage of the endotoxin, once prepared including concentration, vessel type, and volume; and 5) master batch production records to assure consistency in subsequent studies should be written, managed via change control, and followed.

good microbiological practice (良好な微生物作業規範) を行うことで、ラボ-調製エンドトキシンの製造に使用する細胞の培養菌 (culture) と維持(maintenance)を、*Microbiological Best Laboratory Practices*(1117)に一致したものとすべきである。次のような事項を含む指図を文書化し、変更管理を通じて管理 (マネージ) し、そして、それに従うこと。

- 1) 微生物の適正な管理 ;
- 2) 培養条件。これには、培地の調製、栄養要求、および培養の温度/時間を含む ;
- 3) マスターセルバンク (master cell banks) および常用セルバンク (working cell banks) の低温保存 (cryopreservation) または凍結乾燥 (lyophilization) の方法 ;

- 4) いったん調製した(once prepared) エンドトキシンの保存。
これには濃度、容器のタイプおよび分注容量を含む。および
 - 5) その後の調査の恒常性を保証するためのマスターバッチ製造記録書を
文書化し、変更管理を通してマネージ（管理）し、そしてそれに従う。
- Once isolated, the relative activity of the endotoxin preparation should be established by comparing its activity to a known LPS standard such as RSE, or a CSE that has been standardized against the RSE. Determination of activity involves diluting the endotoxin preparation and assaying the dilutions against an LPS standard curve such that the result of the dilution falls within the range of the referenced standard curve. As with the CSE standard used in the bacterial endotoxins test (BET) assay from *Bacterial Endotoxins Test* (85), the activity of the endotoxin may vary, depending on the lot of lysate and lot of LPS used for the analysis. It is recommended, consistent with the assignment of potency for the CSE, that activity of an endotoxin preparation be evaluated for each lysate manufacturer, lysate lot, and test method (gel, kinetic turbidimetric, or kinetic chromogenic) in use in the laboratory.

ひとたび分離(isolated)したならば、RES、または RSE に対して基準化された CSE のような、既知の LPS 標準品に対してのその活性を比較することで、そのエンドトキシン標品の相対的活性を確立すること。活性の測定は、エンドトキシン標品の希釈および、その希釈液の LPS 標準曲線に対して定量が伴い、その定量に際しては、参照されるその標準曲線の範囲内にその希釈液の測定結果が落ちることが必要である。（訳注：USP の）*Bacterial Endotoxins Test* (85) の bacterial endotoxins test (BET) 定量試験に使用される CSE 標準品と同じように、エンドトキシンの活性は、分析に使用する lysate のロット、および LPS のロットによって変動するであろう。それゆえ、エンドトキシンの活性を CSE の力価に対して一致させることを推奨する。これは、エンドトキシン標品の活性を、そのラボで使用されている各 lysate 製造業者、lysate ロットおよび試験方法(ゲル化法(gel)、比濁法(kinetic turbidimetric)、あるいは比色法(kinetic chromogenic)) で評価するものである。

The activity of the stock endotoxin preparation in EU/mL is reported as:

(Test result in EU/mL) × (dilution factor) = EU/mL of the starting endotoxin preparation

保存用エンドトキシン溶液(stock endotoxin preparation)の活性 (EU/mL) は、次のように報告される。:

(試験結果 ; EU/mL) × (希釈率) = 初発のエンドトキシン標品の EU/mL

- Once activity has been determined, and if applicable to the study design, a standard series of dilutions of the newly prepared endotoxin should demonstrate onset times that

result in slope and y-intercept values that are consistent with the standard curve parameters of the RSE/CSE standard using the same lot of lysate. This demonstrates that the activity of endotoxin preparation dilutes and reacts with the lysate in a manner that is similar to LPS.

一たび活性が決定され、そしてもしそれが調査計画に適用可能であれば、新たに調製した希釈液の標準的なシリーズ(standard series)が、同じ lysate のロットを使用しての RSE/CSE 標準品の標準曲線パラメータと一致する「勾配(slope)」と「y 軸切片(y-intercept)」の値を生じる発現時間(onset times)を証明すること。これは、エンドトキシン標品の活性を希釈し、LPS と同様な方法で lysate 反応させることで証明される。

- Characterization of the endotoxin preparation should also include data on the stability of the preparation, because stability is critical to the comparison of data from one study to the next. If the endotoxin preparation is stored, storage parameters including the concentration of the preparation in EU/mL, the composition of the vessel, the temperature of storage, and the length of storage, should be defined. An expiration date should be assigned based on determined stability.

エンドトキシン標品の特徴付けの場合もまた、その標品の安定性についてのデータを含めること。というのは、安定性は、ある調査から次の調査までのデータの比較が重要だからである。もしエンドトキシン標品を保存するのであれば、当該標品の濃度 (EU/mL)、容器の組成 (composition of the vessel)、保存温度、および保存期間 (length of storage) を含む保管パラメータを規定すること。測定された安定性に基づいて、有効期限日 (expiration date) を定めること。

4.2 Inoculation of EIs (EIs の接種)

To prepare an EI in house, inoculate endotoxin or LPS onto an article (carrier) that will serve as the substrate for the EI. Carriers for EIs can be anything that is subject to depyrogenation such as: vials (for dry heat depyrogenation), stoppers (for stopper washing), stainless steel coupons (for vessel cleaning), or product (for depyrogenation of process streams).

EI を自家で調製するためには、EI 用の基質(substrate)として役立つと思われる物品 (キャリアー) にエンドトキシンまたは LPS を接種する。EIs のキャリアーは、脱パイロ・プロセスを受ける物品とすることが出来る。例えば、バイアル (乾熱によるバイアル)、栓(stoppers) (栓 (訳注: ゴム栓) 用洗浄機)、ステンレスクーポン (容器の洗浄)、あるいは製品 (一連のプロセスでの脱パイロ) がある。

The simplest way to inoculate these indicators is to add a small volume of a highly concentrated solution of endotoxin or LPS to the carrier. The volume and concentration of added endotoxin or LPS should be calculated to add at least 1000 EU to the carrier, although higher or lower concentrations may be justified. For nonliquid carriers, the endotoxin is “fixed” or dried onto the carrier substrate. This fixing step is most easily accomplished by drying in a unidirectional air flow cabinet or hood, although other drying methods including vacuum drying, lyophilization, and other fixation methods could be used. In depyrogenation challenge studies, once a fixing method is chosen, it should not change in subsequent studies to assure comparability of results. Before using the EIs, a recovery procedure, consisting of a reconstitution or extraction method, should be developed and verified for consistency (3).

それらインジケータに接種する最も簡単な方法は、そのキャリアーに非常に高濃度のエンドトキシンまたは LPS の溶液の少量を添加することである。添加されるエンドトキシンまたは LPS の量と濃度は、キャリアーに対して少なくとも 1000 EU を加えるように計算すること。しかしながら、より高い、あるいはより低い濃度であっても、それが正当化されている (justified) のであれば、許容されるものである。液体ではないキャリアーに対しては、エンドトキシンをキャリアーの基質(substrate)に “固定する(fixed)” か、乾燥させる。この固定化のステップは、一方向気流のキャビネットまたはフード内で乾燥させるのが、最も容易に行なえるものであるが、他の乾燥方法（これには、真空乾燥(vacuum drying)、凍結乾燥(lyophilization)および他の固定化の方法(fixation methods)が含まれる)も使用することが出来る。脱パイロチャレンジ調査において、ひとたび固定化の方法を選択したのであれば、結果の比較可能性(comparability)を保証するために、その後の研究では変更をするべきではない。EIs を使用する前に、再溶解(reconstitution)あるいは抽出(extraction)の方法からなる回収手順を制定し、かつ恒常性の確認をすること。(文献3)

For liquid carriers such as bulk product, the level of inoculation in EU/mL should be justified based on “worst case” challenge for the depyrogenation step under study, meaning that the highest concentration of endotoxin that could be in the upstream product, based on process knowledge and historical endotoxin values, should be used. Such justification should take all contributing factors into account, including but not limited to: Gram-negative bioburden in raw materials and bulk; endotoxin content in raw materials including water, contributions by product contact surfaces; and the effect of hold times, particularly for nonsterile bulk.

バルク製品のような液状のキャリアーに関しては、接種レベル (EU/mL) は、調査対象としている脱パイロステップの “worst case” チャレンジに基づくこと。これは、工程の知識(process knowledge)と過去のエンドトキシン値(historical endotoxin values)に基づき、上流側での製品(upstream product)中に見られたエンドトキシンの最高濃度を使用することを意味している。このような正当化の理由づけ(justification)は、

全ての要因(contributing factors)を説明付けのために行うべきである。以下の述べる例に限定されるものではないが、次のようなものが挙げられる。：

- ・原料およびバルク中のグラム陰性菌のバイオバーデン
- ・水（製品接触面に関係する）を含む原料のエンドトキシン含量
- ・特に非無菌バルクに対して、保持時間の影響

4.3 Recovery of Endotoxin from EIs (EIs からのエンドトキシンの回収)

To use EIs, it is necessary to recover and quantify the activity of the endotoxin or LPS from both unprocessed indicators (controls) and from processed indicators (i.e., those that have been through the depyrogenation process). LPS tends to adsorb to surfaces and may aggregate or disaggregate in some product matrices; therefore, recovery of activity from EIs made with LPS is often not 100% of the nominal or measured spike value. This section addresses the methodology for recovery and possible strategies for addressing recoveries that may be observed in challenge testing.

EIs を使用するためには、未処理(unprocessed)のインジケータおよび処理済(processed)のインジケータ（すなわち脱パイロ工程を通過したもの）の、両方のエンドトキシンあるいは LPS の活性を回収し、かつ定量することが必要となる。LPS は表面に吸着する傾向があり、ある種の製品マトリックス (product matrices) では凝集または解離 (aggregate or disaggregate) する。；それゆえ、LPS で行った EIs の活性の回収は、公称のあるいはスパイクした値の 100%とはならない可能性がある。このセクションは、回収の方法論と、チャレンジ試験で見られるかも知れない（訳注：低い？）回収に対処するための可能な戦略について取り上げる。

In the case of commercially available EIs prepared with LPS, the manufacturer's directions for extraction and recovery should be followed. With such products, there should be little difficulty in achieving recovery within a factor of 2 of the labelled LPS concentration. If recoveries within the specified range cannot be achieved, the manufacturer should be contacted for technical assistance.

LPS で調製した市販の EIs の場合には、抽出および回収についての製造業者の指示に従うこと。そのような製品の場合は、表示された LPS 濃度の 2 倍（訳注：0.5~2 倍）の範囲内で、得られる回収率に僅かな差異が存在する。もし、規定された範囲内の回収率を達成することが出来ないのであれば、技術的な支援を受けるために、製造業者とコンタクトすること。

For EIs made in-house using LPS, the composition of carriers, such as plastics, can affect recovery or result in inconsistent recovery because of adsorption. For these carriers, there is no

prelabeled concentration to verify. In this case, the expected recovery should be based on the measure of the activity of endotoxin or LPS added to the article and the volume of extraction fluid used to recover it. The actual (measured) activity in the extract should then be compared to the measured activity of the endotoxin or LPS added to determine the percentage of recovery.

LPS を使用しての自家調製の EIs は、プラスチックのようなキャリアー組成は、一貫性のない回収（吸着が原因する）で、回収あるいは結果に影響が起きるのであろう。そのようなキャリアーに対しては、確認のための予め表示された濃度 (prelabeled concentration to verify) は存在していない。この場合には、期待される回収は、物品に加えたエンドトキシンあるいは LPS の活性と、その回収に使用した抽出液の容量の測定に基づくべきである（訳注：吸着して外れないものはそのまま許容して、回収される量のみを問題にするという考え方か?）。次に、回収率を測定するために、抽出液 (extract) の実際の（測定された）活性を、加えられた測定済みのエンドトキシンあるいは LPS の活性と比較する。

For example, consider a stock endotoxin or LPS preparation containing a measured activity of 100,000 EU/mL that is used to prepare in-house EIs. If a volume of 50 µL of this preparation is dried on the surface of each of a number of 10-mL vials, the known amount of activity added is 5000 EU. If the recovery/extraction is performed in 5 mL of water for BET, and the recovery is 100%, the expected activity in the extract solution is 1000 EU/mL.

例えば、自家調製の EIs 調製のために、100,000 EU/mL の測定済み活性を含む、保存用のエンドトキシンまたは LPS の標品を考える。この標品の 50 µL の容量を、多数の 10-mL のそれぞれの表面に乾燥させたならば、加えられた活性の既知量 (known amount of activity added) は、5,000 EU となる。

もし回収／抽出を BET 用水 (water for BET) の 5mL で行い、その回収が 100% であれば、抽出液での期待される活性は、1000 EU/mL である。

$$\frac{5,000 \text{ EU/vial}}{5 \text{ mL extraction solution/vial}} = 1000 \text{ EU/mL}$$

If, however, the measured activity after extraction is 200 EU/mL as opposed to the expected 1000 EU/mL, the efficiency of the extraction method is 20%.

しかしながら、もし抽出後の測定された活性が、期待値の 1,000 EU/mL ではなく、200 EU/mL であるならば、抽出法の効率、20% である。

Recovery of endotoxin or LPS from nonliquid EIs prepared in-house can follow recommendations for the extraction of medical devices in preparation for LAL testing. USP general chapter *Medical Devices—Bacterial Endotoxin and Pyrogen Tests* (161) states, “The

standard extraction method is to soak or immerse the device or flush the fluid pathway with extracting fluid that has been heated to $37 \pm 1.0^\circ$, keeping the extracting fluid in contact with the relevant surface(s) for NLT 1 h.” The volume used for reconstitution or extraction should be appropriate for the material, size, and shape of the EI, recognizing that a volume too low may not efficiently recover the endotoxin or LPS and that excessive volumes will unnecessarily dilute the endotoxin or LPS that has been extracted.

自家調製した非液状の EIs(nonliquid EIs)からのエンドトキシンまたは LPS の回収は、LAL testing の準備 (preparation)における医療機器からの抽出の推奨に従うことが出来る。USP の general chapter *Medical Devices—Bacterial Endotoxin and Pyrogen Tests* (161)は、次のように述べている。：“標準的な抽出法 (standard extraction method)は、当該機器を（訳注：抽出液に）に浸漬する(soak or immerse)か、 $37 \pm 1.0^\circ\text{C}$ にまで加温した抽出液で、その液体の流路(fluid pathway)をフラッシュし、1時間以内(NLT 1 h.)の長さで、抽出液が関連する表面と接触するように保つ”。再溶解(reconstitution)または抽出(extraction)に使用する液量は、EI の材質(material)、大きさ、そして形状について、適切なものとすべきである。この場合、あまりにも少ない液量はエンドトキシンまたは LPS の回収が不十分になること、および過剰な液量は、抽出されるエンドトキシンまたは LPS が不必要に希釈されることが認められている。

If the recovery of added endotoxin or LPS is variable, an alternate extraction method may be developed and validated. This may include agitation or mixing, sonication or alternative extraction solutions. A combination of extraction in 0.01% sodium laurel sulfate, sonication, and vortex mixing is one such approach that has been reported to be more effective than extraction in water for medical devices (4–6). Other extraction methods are summarized by Bryans et al. (7) and in ANSI/AAMI standard ST72:2011 (8).

もし、添加したエンドトキシンあるいは LPS の回収が変動するのであれば、別の抽出方法を制定し、バリデーションを行ってもよい。これ（訳注：別の抽出方法）には、攪拌および混合(agitation or mixing)、超音波処理(sonication)または別の抽出溶液 (alternative extraction solutions) が含まれるであろう。「0.01% sodium laurel sulfate、超音波処理、そしてボルテックスによる混合(vortex mixing)」という抽出の組み合わせは、そのようなアプローチの一つであり、医療機器に対する水での抽出よりも、より効果的であることが報告されている(文献 4–6)。他の抽出方法は Bryans et al. (文献 7)と、ANSI/AAMI standard ST72:2011 (文献 8)により要約されている。

Another situation concerns liquid endotoxin or LPS preparations that are used either to validate a depyrogenation process in a process stream or to investigate the destruction or removal of endotoxin or LPS in a manufacturing process. In these cases, the initial concentration of the stock liquid endotoxin or LPS solution should be measured before it is added to the system or process. If some of this preparation is added (“spiked”) to a bulk process solution that is then

subject to a particular process or treatment, the activity of endotoxin or LPS in this bulk solution should be measured and recorded as the starting activity. It is important to determine whether changes in the endotoxin or LPS activity of the processed solution are due to effects of the process and not to instability of the LPS or endotoxin in the solution. The stability of the activity of the LPS or endotoxin in these preparations should be verified over a period appropriate to the proposed use of the preparation.

他の状況は、液状のエンドトキシンあるいは LPS 標品に係るものであり、これらはプロセスの径路 (process stream) における脱パイロプロセスをバリデートするために、あるいは製造プロセスにおけるエンドトキシンあるいは LPS の、破壊あるいは除去を調査するために使用されるものである。それらの場合には、システムあるいはプロセスに添加する前に、保存用の液状エンドトキシンあるいは LPS 溶液の初期濃度を測定すること。もしこの溶液の幾らかの量を、バルク状のプロセス溶液に加える (“spiked” する) のであれば、バルク溶液中のエンドトキシンあるいは LPS の活性を測定し、スタート時の活性 (starting activity) として記録をすべきである。プロセス (加工) を受けた溶液のエンドトキシンまたは LPS 活性の変化が、そのプロセスの影響によるものであって、その溶液の LPS あるいはエンドトキシンの不活化によるものではないという事を決定するのが重要である。それらの標品 (溶液) における LPS またはエンドトキシンの活性の安定性は、その標品の計画されている使用に適切な期間にわたって確認すべきである。

As with the spiking method (choice of endotoxin/LPS and “fixing” process), whichever reconstitution/extraction procedure is chosen should be verified for consistency and should be used for all subsequent studies to assure comparability of results.

スパイクを行う方法 (エンドトキシン/LPS および “固定する (fixing)” プロセスの選択) と同様に、選定した再溶解/抽出方法 (reconstitution/extraction procedure) は、その恒常性を確認 (be verified) すべきであり、結果の比較可能性 (comparability) を保証するために、その後の全ての調査でそれを使用すべきである。

4.4 Choice of Test Methodology for the Analysis of EIs

(EIs の分析のための方法論の選択)

Any of the test methods described in (85) can be used for the analysis of processed and unprocessed EIs. As with the rest of the methodology, it is highly recommended that an assay (kinetic turbidimetric, kinetic chromogenic, or gel clot assay) be chosen during method development and used consistently throughout the initial study and in subsequent studies to assure that data are comparable. The use of alternate assays is permissible, provided that they are validated to assure that they are equivalent to or non-inferior to the standard compendial assays.

USP の Bacterial Endotoxins Test (85) で述べられている試験方法の何れも、処理済および未処理 (processed and unprocessed) の EIs の分析に使用することが出来る。その他の方法論 (the rest of the methodology) と同様に、方法の開発中に、定量法 (比濁法 (kinetic turbidimetric)、比色法 (kinetic chromogenic)、あるいはゲル化 (gel clot) の定量法: 訳注 定量法の和訳名は検討が必要である) を選定し、データの比較可能性を保証するためには、初期の調査を通して、およびその後の調査において、常にそれを使用することを強く推奨する。別の定量法の使用は、もし、標準的な公定の定量法 (standard compendial assays) に同等であるか、あるいは非劣性 (non-inferior to) であることを保証することがバリデートされているならば、許容される。

5. ANALYSIS OF RESULTS OF DEPYROGENATION STUDIES

(脱パイロ調査の結果の解析)

To evaluate the effectiveness of a depyrogenation process, the residual activity that is recovered from processed indicators is compared to the endotoxin or LPS activity of unprocessed controls. Typically, the \log_{10} of the endotoxin or LPS activity measured for the processed EI (or solution) is subtracted from the \log_{10} of the measured endotoxin or LPS activity of unprocessed control indicator. The result of the subtraction is the log reduction that is attributable to the depyrogenation process. If there are multiple controls and/or samples of processed material (and there usually are), the most conservative approach is to subtract the highest \log_{10} concentration recovered from the processed EIs (or solution samples) from the lowest \log_{10} unprocessed control endotoxin activity. For example:

脱パイロ工程の有効性を評価するためには、処理されたインジケータ (processed indicators) から回収された残存活性を、未処理の対照 (unprocessed controls) のエンドトキシンまたは LPS の活性と比較を行う。一般的には、未処理の対照のインジケータのエンドトキシンまたは LPS の活性の \log_{10} から、処理された EI (または溶液) で想定したエンドトキシンまたは LPS の活性の \log_{10} 値を引き算をする。その引き算の結果は、脱パイロプロセスに起因するものである。もし、処理したマテリアル (訳注: EIs を指すと考える) に、複数の対照 (multiple controls) および/またはサンプルが存在する (そして、それが通常は存在する) のであれば、最も慎重なアプローチ (most conservative approach) は、「未処理の対照エンドトキシン活性の最も低い \log_{10} 値 (lowest \log_{10} unprocessed control endotoxin activity)」から、「処理した EIs または溶液のサンプルから回収された濃度の最も高い \log_{10} (lowest \log_{10} unprocessed control endotoxin activity)」を引き算することである。(訳注: 以下は複数の対照の対照があるときの計算事例)

- The activities in three unprocessed EIs are 1286, 1000, and 1532 EU/mL.

3つの未処理の EIs の活性は、1286, 1000, および 1532 EU/mL である

- The activities in three processed EIs are 0.634, 0.512, and 0.496 EU/mL
3つの処理した EIs の活性は、634, 0.512, および 0.496 EU/mL.である

The log reduction is calculated as:

対数減少 (log reduction) は、次のように計算する

$$\log_{10} (1000) - \log_{10} 0.634 = 3 - (-0.198) = 3.198 \text{ log reduction}$$

$$\log_{10} (1000) - \log_{10} 0.634 = 3 - (-0.198) = 3.198 \text{ 対数減少}$$

Historically, a ≥ 3 -log reduction has been required by regulatory/compliance guidance. However, depending on the process and historical data, a 3-log reduction may be either excessive or inadequate. For example, for glass vials with a low or nonmeasurable endotoxin content upon receipt, the requirement to continually and repeatedly revalidate with an acceptance criterion of a 3-log reduction of the endotoxin spike of >1000 EU is excessive. Alternatively, a fermentation process with an endotoxin content of $>10^7$ EU/mL in the clarified culture supernatant will require more than a 3-log reduction to achieve safe levels of endotoxin in the drug substance or drug product. In any event, an appropriate specification for the log reduction of processed indicators should be established and justified in a preapproved protocol for the study. The total reduction, of course, may be achieved over several steps in a purification process. Thus, the necessary reduction is often achieved additively over the course of multiple purification steps.

歴史的には、法的／順守すべきガイダンス(regulatory/compliance guidance)により、 ≥ 3 -log reduction (3-log リダクション以上) が要求されている。しかしながら、プロセスでのデータおよび過去のデータ (historical data)によれば、3-log 減少は過剰もしくは不適切と考えられる。例えば、入荷時点 (upon receipt) での、低いまたは測定が出来ないような低いエンドトキシン含量を持つガラスバイアルに対して、 >1000 EU のエンドトキシンのスパイクの 3-log リダクションの許容判断基準値で、継続的にかつ繰り返して再バリデーションをするとの要求は、過剰である。その一方で、澄明化した培養物の上清液 (clarified culture supernatant) 中に $>10^7$ EU/mL のエンドトキシン含量を持つ発酵プロセスは、製剤原料 (drug substance) あるいは製剤 (drug product) のエンドトキシンの安全なレベルを達成するためには、3-log リダクション以上を必要とするであろう。如何なる場合においても、処理したインジケータ (processed indicators) の log リダクションの適正な規格を確立し、当該調査の予め承認されたプロトコルで論理的な正当化 (be justified) をすべきである。もちろん、トータルなエンドトキシンのログ-リダクション (log reduction) は、精製化プロセスの幾つかのステップにわたって達成されるであろう。それゆえ、必要なリダクションは、複数の精製ステップの途上において、しばしば付加的に達成される (be often achieved additively)。

6. REFERENCES (文献)

1. Ludwig JD, Avis KE. Dry heat inactivation of endotoxin on the surface of glass. *J Parenter Sci Technol.* 1990;44(1):4–12.
2. Bowers K, Tran L. Creation of an in-house naturally occurring endotoxin preparation for use in endotoxin spiking studies and LAL sample hold time analysis. *Am Pharmaceut Rev.* 2011;14(6):92–97. <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/37219-Creation-of-an-In-house-Naturally-Occurring-Endotoxin-Preparation-for-Use-in-Endotoxin-Spiking-Studies-and-LAL-Sample-Hold-Time-Analysis/>
3. LAL Users Group. Preparation and use of endotoxin indicators for depyrogenation process studies. *J Parenter Sci Technol.* 1989;43(3):109–112.
4. Berzofsky RN, Scheible LS, Williams KL. Validation of endotoxin removal from parenteral vial closures. *BioPharm.* June 1994:58–66.
5. Ross VC, Twohy CW. Endotoxins and medical devices. *Prog Clin Biol Res.* 1985;189:267–281.
6. Twohy CW, Duran AP, Peeler JT. Extraction of bacterial endotoxin from medical devices. *J Parenter Sci Technol.* 1986;40:287–291.
7. Bryans TD, Braithwaite C, Broad J, Cooper JF, Darnell KR, Hitchins VM, Karren AJ, Lee PS. Bacterial endotoxin testing: a report on the methods, background, data, and regulatory history of extraction recovery efficiency. *Biomed Instrum Technol.* 2004;38(1):73–78.
8. ANSI/AAMI standard ST72:2011. Bacterial endotoxins—test methods, routine monitoring, and alternatives to batch testing. Arlington, VA: Association for the Advancement of Medical Instrumentation; 2011. https://marketplace.aami.org/eseries/scriptcontent/docs/Preview%20Files/ST72_112_preview.pdf

■ 2S (USP39)

(2015年9月29日訳了)

Auxiliary Information - Please [check for your question in the FAQs](#) before [contacting USP](#).