



ベリタス・エンドトキシンセミナー入門編

知っておきたい！

エンドトキシン試験の基礎知識

2025/6/24

株式会社ベリタス



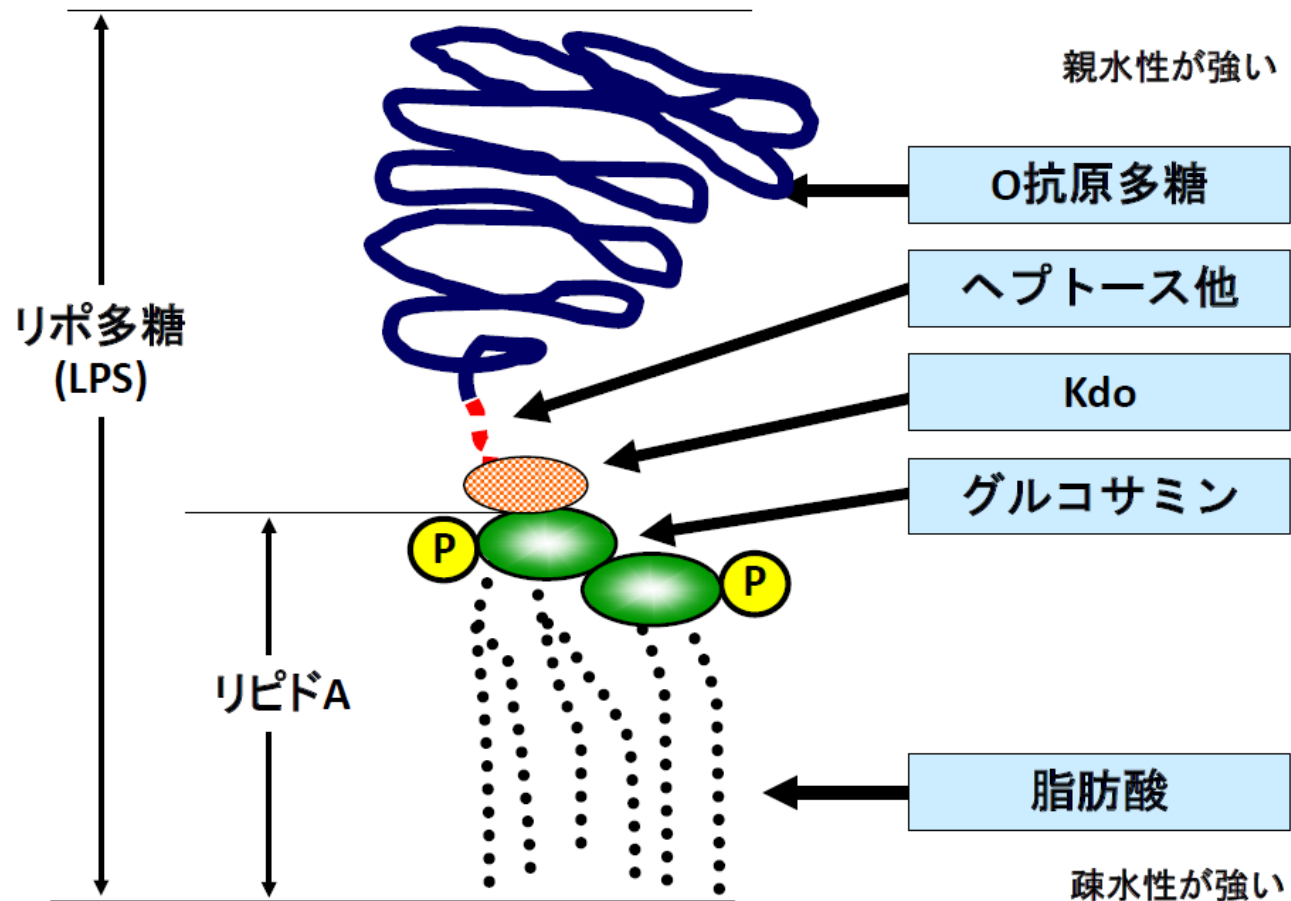
エンドトキシンとは

エンドトキシンとは

- グラム陰性菌の外膜に存在する**リポ多糖（LPS）**のこと



エンドトキシンの構造



O抗原多糖の構造は菌によって異なる
エンドキシンの活性中心はリピドA

エンドトキシンの生物活性

生体レベルの作用		細胞レベルの作用	分子レベルの作用
発熱性	体重減少	マクロファージ活性化	凝固系活性化
致死毒性	トランス	T, B前駆細胞の成熟化	補体活性化
シュワルツマン反応	白血球減少または増加	B細胞活性化	プラスミノーゲン活性化
ショック	免疫賦活または抑制	血小板凝集促進	リムルス試薬の活性化
血管収縮または拡張	アジュバント活性	顆粒球機能亢進	
血液凝固	抗腫瘍作用	各種サイトカインの産生	
血糖低下	非特異的感染防御	遺伝子発現の誘導	
血小板減少	放射線障害防御		
骨髓出血壊死	網内系殺菌力亢進		
流産			

棚元憲一, Bull. Natl. Inst. Health Sci, 126, 19 (2008)及びエンドトキシン(中野昌康, 小玉正智 編), 1995, p. 45, 講談社サイエンティフィクから抜粋して作成。

エンドトキシンの特徴 【発熱性】

- 微量で強力な発熱活性を有する
- ヒト、ウサギに発熱を惹起する最小投与量 0.5~1.0 ng/kg（静脈内投与）

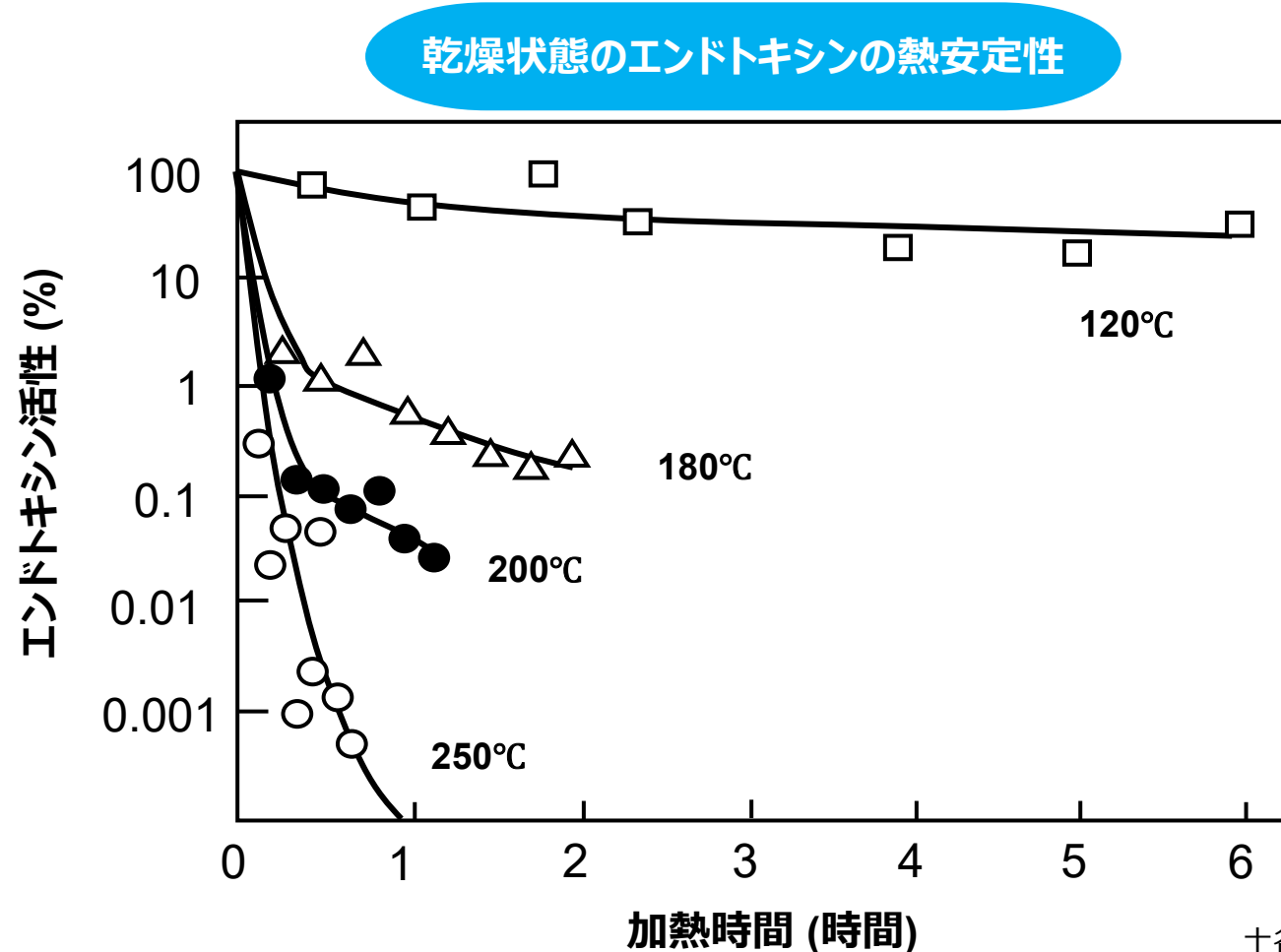
	Threshold Pyrogenic Dose (ng/kg)	
	Man	Rabbit
<i>Pseudomonas sp.</i>	50-70	50-70
<i>E. coli</i>	1.0	1.0
<i>Salmonella typhosa</i>	1.0-1.4	0.1-0.14

※Threshold Pyrogenic Dose (ng/kg)は、50%のヒトやウサギに発熱を引き起こすエンドトキシン量を表す

Griesman S.E. and Hornick R.B., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 131:1154 (1969)

エンドトキシンの特徴 【耐熱性】

- エンドトキシンを不活化するには、少なくとも**250℃・30分の乾熱処理**が必要



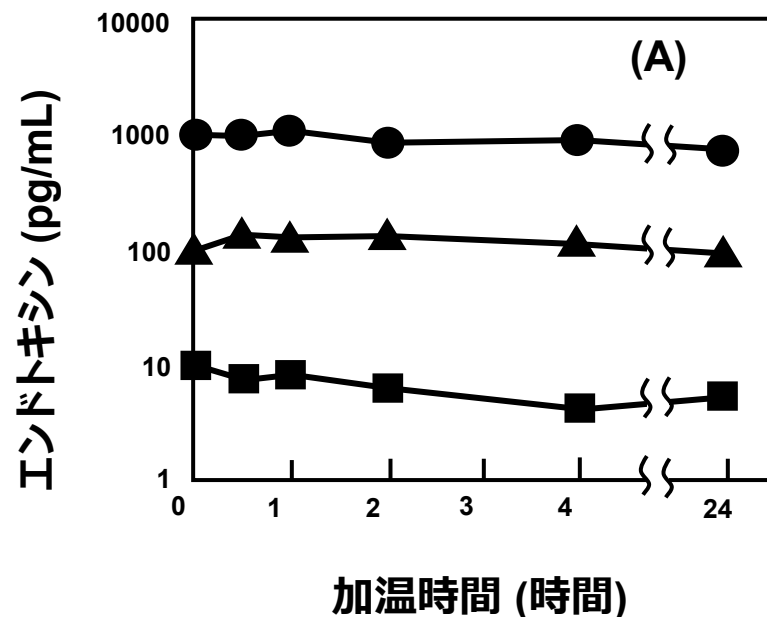
土谷正和：日本防菌防黴学会会誌, **18**, 287 (1990)

エンドトキシン水溶液の熱安定性

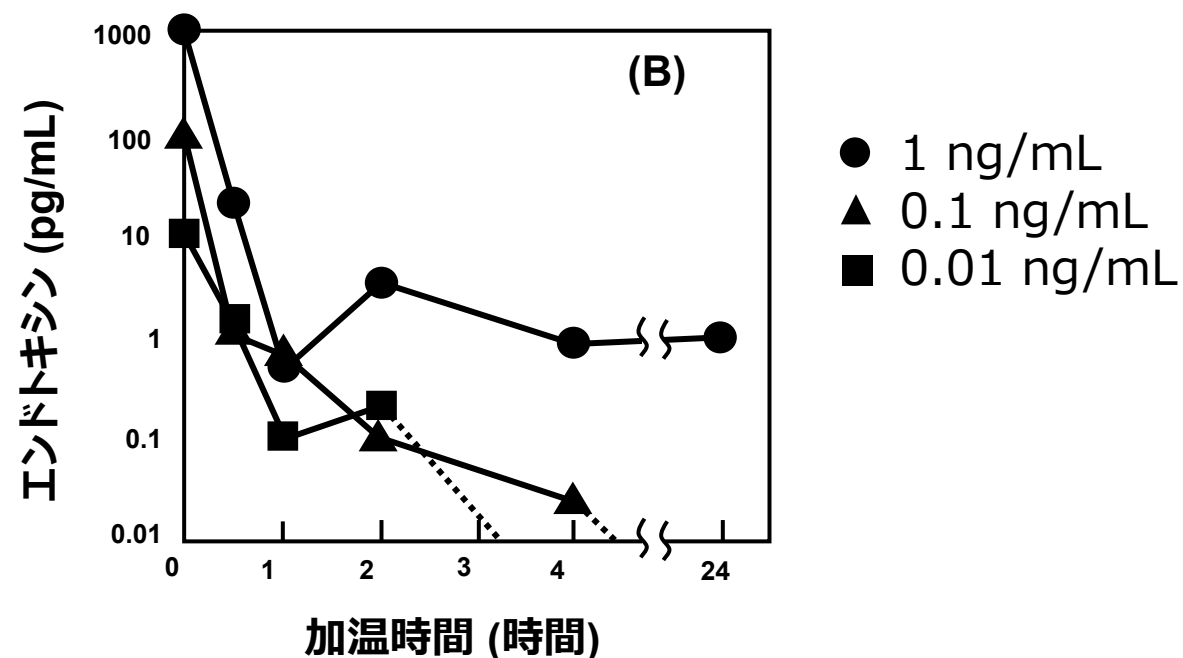
- 水溶液中のエンドトキシンは活性が変化する可能性がある

エンドトキシン水溶液の活性の安定性

37℃で加熱



70℃で加熱



E. coli UKT-B株由来のエンドトキシンを使用

土谷正和：日本防菌防黴学会会誌, **18**, 287 (1990)

エンドトキシン単位とエンドトキシン標準品

- エンドトキシンの活性は、重量ではなくエンドトキシン単位（Endotoxin Unit; **EU**）で表す
 - エンドトキシンの比活性（重量あたりの活性）は一定ではない
- エンドトキシン標準品には**RSE** と **CSE** がある
 - RSE : Reference Standard Endotoxin
 - 薬局方標準品として定められているエンドトキシン標準品
 - 日本薬局方標準品の力価（エンドトキシン単位）はWHOのエンドトキシン国際標準品を基準として標定
 - CSE : Control Standard Endotoxin
 - 薬局方標準品を基準として、各ライセート試薬メーカーが力価を測定したエンドトキシン標準品（二次標準品）
 - 日本薬局方に準拠したエンドトキシン試験をおこなう場合は使用できない
- 日本薬局方エンドトキシン標準品について
 - *E. coli* O113:H10:K-株 由来（米国薬局方標準品、欧州薬局方標準品とハーモナイズ）
 - 2024年6月より新製品（エンドトキシン10000）が提供されている
 - 調製方法や保存条件等は添付文書にしたがう



エンドトキシン試験法

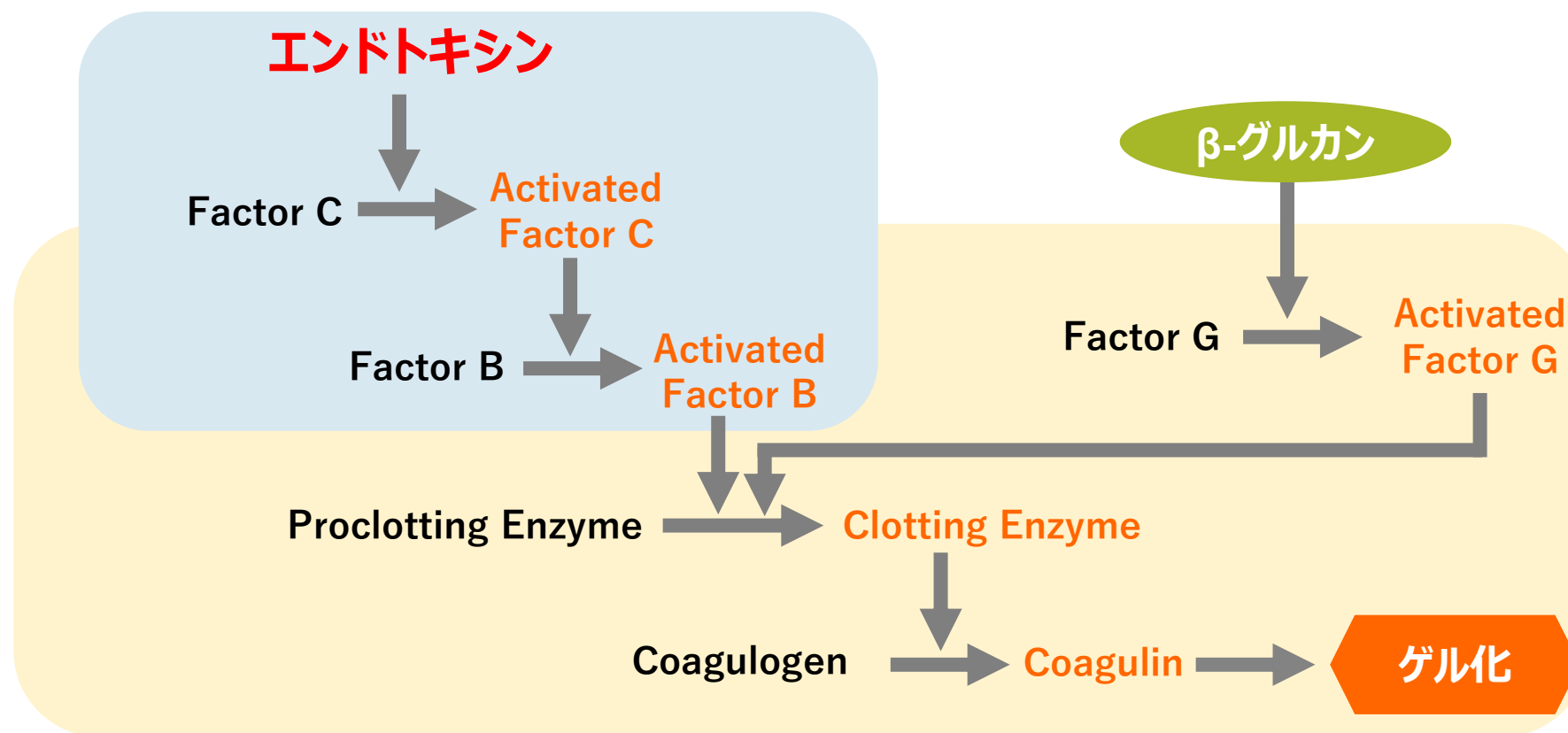
なぜエンドトキシンを測定するのか？

- 血中に入ると微量で強力な**発熱性**
 - その他にもさまざまな生物活性を持つ
- 非常に**熱に強い**
 - 不活化：250℃・30分の乾熱滅菌処理
- 環境中のいたるところに存在
 - グラム陰性菌の細胞壁を構成する成分

**エンドトキシンは自然界に存在する強力な発熱性物質であり、
注射剤などに容易に混入する可能性がある**

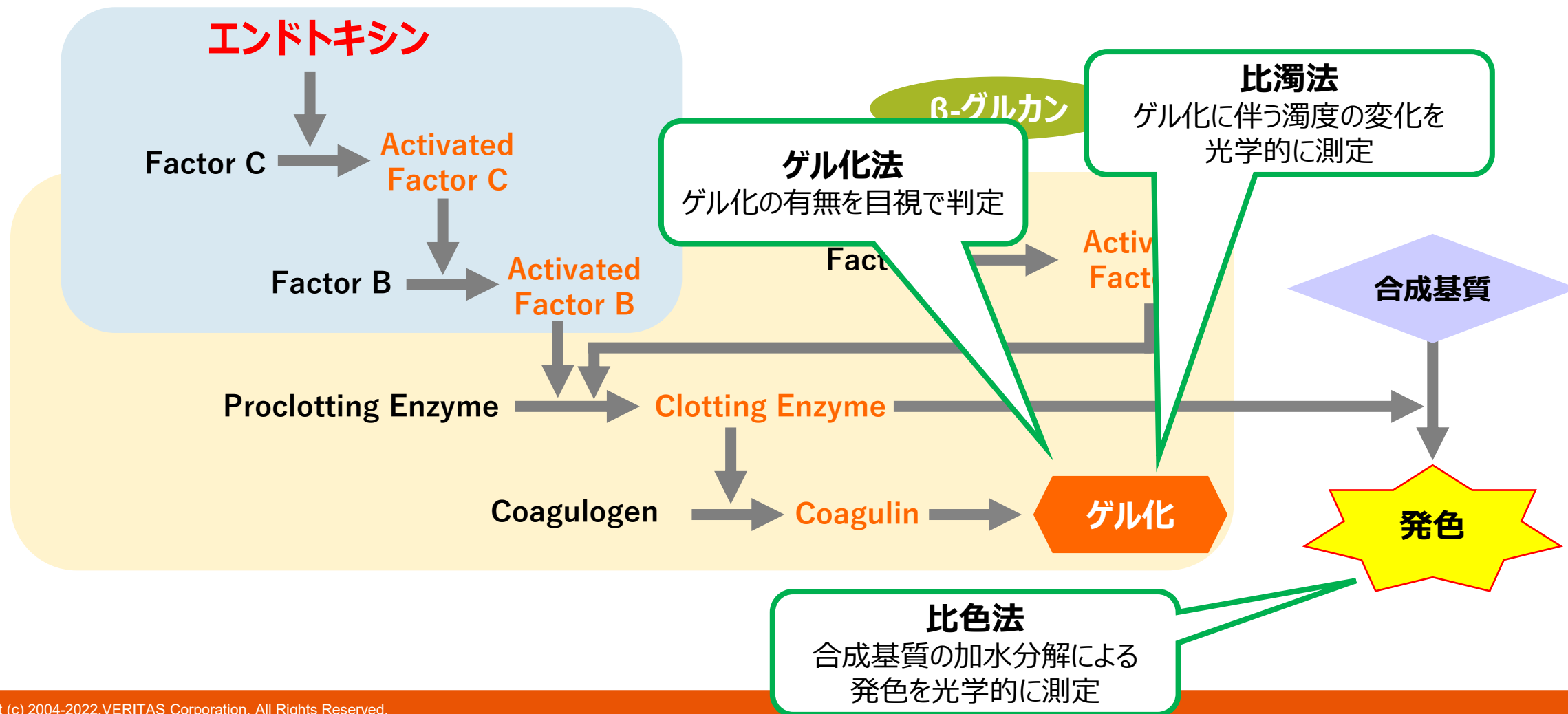
エンドトキシン試験法

- カプトガニの血球抽出成分より調製された**ライセート試薬**を用いて、エンドトキシンを検出又は定量する方法
- カプトガニ血球抽出成分 + エンドトキシン ⇒ **ゲル化** の仕組みを利用



エンドトキシン試験法の種類

- ゲル化法、比濁法、比色法 の3種類がある



ゲル化法・比濁法・比色法の特徴

・ゲル化法

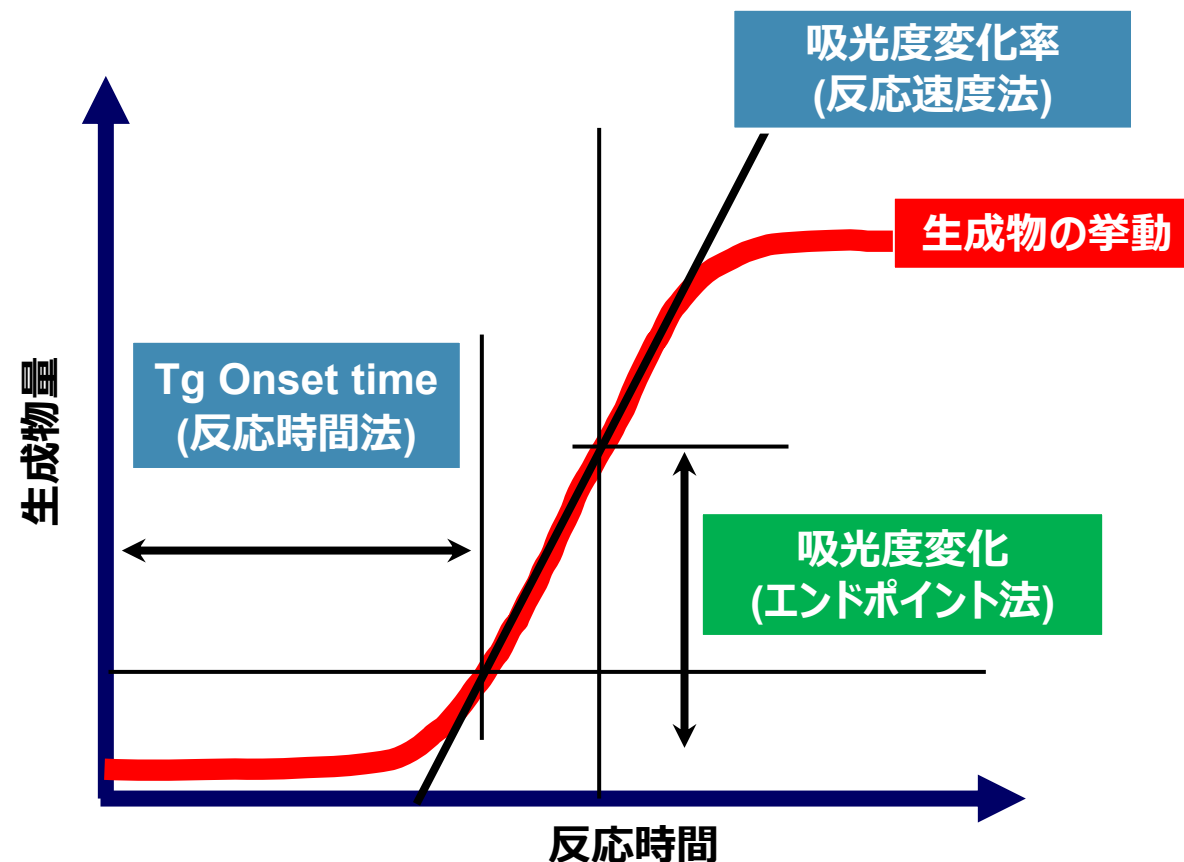
- 定性試験法
- 試験の結果に疑義や係争が生じた場合はゲル化法の限度試験法により最終判定（日局18）

・比濁法

- 定量試験法
- カイネティック比濁法とエンドポイント比濁法
 - 現在、エンドポイント比濁法の市販試薬はない

・比色法

- 定量試験法
- カイネティック比色法とエンドポイント比色法



エンドトキシン規格値

- 日本薬局方 医薬品各条にエンドトキシン規格値が設定されていないものは、エンドトキシン規格値を計算する

K

発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg)

M

体重1kg当たり1回に投与する注射剤の最大量 (mg/kg, mL/kgなど)
※頻回または持続的に投与する注射剤の場合は体重1kg当たり1時間の最大量

発熱を誘起するといわれる体重1 kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg)

- 静脈内投与医薬品 5.0 EU/kg
- 静脈内投与放射性医薬品 2.5 EU/kg
- 脊髄腔内投与医薬品 0.2 EU/kg

成人の平均体重

- 日本 : 60 kg
- 欧米 : 70 kg

エンドトキシン規格値を計算してみましょう

◆Case 1◆ 静脈内投与医薬品 1回の投与量：30 mg/kg

K：5.0 EU/kg
M：30 mg/kg

$$K/M = 5.0/30 = 0.167$$

エンドトキシン規格値：0.167 EU/mL

◆Case 2◆ 脊髄腔内投与医薬品 1回の投与量：15 mg/dose

K：0.2 EU/kg
M：15/60 = 0.25 mg/kg
※日本人の場合、成人の平均体重は60 kgを用いる

$$K/M = 0.2/0.25 = 0.8$$

エンドトキシン規格値：0.8 EU/mL

発熱を誘起するといわれる体重1 kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg)

- 静脈内投与医薬品 5.0 EU/kg
- 静脈内投与放射性医薬品 2.5 EU/kg
- 脊髄腔内投与医薬品 0.2 EU/kg

成人の平均体重

- 日本：60 kg
- 欧米：70 kg

最大有効希釈倍数（MVD）

- 試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を**希釈により回避**できるとき、許容される試料溶液の**最大の希釈倍数**
- 最大有効希釈倍数：Maximum Valid Dilution（MVD）

エンドトキシン規格値 × 試料溶液の濃度

λ

λ（ラムダ）

ライセート試薬の表示感度（ゲル化法）または検量線の最小エンドトキシン濃度（比濁法、比色法）

最大有効希釈倍数を計算してみましょう

◆Case◆ 静脈内投与注射剤

1回の投与量：30 mg/kg

注射剤の濃度：20 mg/mL

ライセート試薬の表示感度：0.03 EU/mL

最大有効希釈倍数 = エントキシン規格値 × 試料溶液の濃度 / λ

エントキシン規格値 $K/M = 5.0/30 = 0.167$ EU/mL

試料溶液の濃度：20 mg/mL

λ ：0.03 EU/mL

最大有効希釈倍数 = $(0.167 \times 20)/0.03 = 111$

エンドトキシン試験に必要なもの

試薬類

- ライセート試薬
- エンドトキシン試験用水
(LAL Reagent Water)
- エンドトキシン標準品

器具

- 試験管、アルミキャップ
- ガラス製ピペット
- マイクロピペッター/ピペットチップ

機器

- ボルテックスミキサー
- プレートリーダー/チューブリーダー
- アルミブロックヒーター

エンドトキシンによる汚染がないこと・エンドトキシン試験に対する
干渉作用がないことが確認されたものを用いることが重要



エンドトキシン試験の手順（比濁法、比色法の例）

- エンドトキシン標準品を溶解
- エンドトキシン希釈液を調製
- 試料の希釈液を調製
- 試料希釈液にエンドトキシンを添加
- ライセート試薬を溶解
- 試料希釈液等をプレート等に分注
- ライセート試薬を添加
- 測定

【試料の種類】

- ✓ 陰性対照 (Negative Control, NC)
ライセート試薬や使用する水の汚染がないことを確認
- ✓ 陽性対照 (Positive Control, PC)
ライセート試薬の失活がないこと、エンドトキシンの活性の確認
- ✓ 製品 (Product, P)
製品中のエンドトキシン量の測定
- ✓ 製品陽性対照 (Positive Product Control, PPC)
製品の反応干渉がないことを確認

予備試験を行い、検量線の信頼性や反応干渉因子の有無を確認する
詳細については日本薬局方のエンドトキシン試験法を参照ください

