

*In vitro* 発熱性物質試験の評価会議報告書

2010年9月6日

#### JaCVAM 評価会議

西川秋佳（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）  
田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）  
吉田武美（昭和大学薬学部）  
横関博雄（東京医科歯科大学）  
吉村 功（東京理科大学）  
中村和市（日本製薬工業協会）  
岡本裕子（日本化粧品工業連合会）  
大島健幸（日本化学工業協会）  
小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）  
小笠原弘道（医薬品医療機器総合機構）  
吉田 緑（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部）  
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部）

#### オブザーバー：

柴辻正喜（厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室）  
実国慎一（経済産業省 製造産業局 化学物質安全対策室）

#### オブザーバー：JaCVAM 運営委員

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）  
関野祐子（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）  
増田光輝（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）  
小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）  
秋田正治（日本動物実験代替法学会）

*In vitro* 発熱性物質試験について、第三者評価委員会からの報告を受け、以下の 8 項目について審議した。本 2~8 項目は OECD ガイダンス文書 No. 34 に示された検討項目である。

< 検討項目 >

1. 検討対象の試験法は、日本のどの法規制やガイドラインに関係しているか。
2. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。
3. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは（同時に）そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。
4. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。
5. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。
6. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。
7. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。
8. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。

< 審議内容 >

1. 検討対象の試験法は、日本のどの法規制やガイドラインに関係しているか。  
第十五改正日本薬局方（15 局，2006 年）及び医療機器の生物学的安全性評価のための試験法（医薬局審査管理課事務連絡，医療機器審査 No. 36）が該当する。
  - ・ 日本薬局方 15 局は、発熱性物質の検出法として「発熱性物質試験法」及び「エンドトキシン試験法」（リムルス試験）を収載している。
  - ・ 日本薬局方 15 局の「製剤総則・注射剤」の項では「エンドトキシン試験法」が優先されているが、「エンドトキシン試験法の適用が困難な場合は、発熱性物質試験法を用いることができる」と規定されている。
  - ・ 「輸液用ゴム栓試験法」（日本薬局方 15 局）及び「医療機器の生物学的安全性評価のための試験法」では「発熱性物質試験法」の実施が要求されている。
2. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。
  - ・ ICCVAM が、ECVAM の検討結果（EC STATEMENT ON THE VALIDITY OF IN-VITRO TESTS 及び ECVAM Background Review Document (BRD)）を第 3 者評価し、2008 年 5 月に 2 つの報告書（ICCVAM Test Method Evaluation Report 及び ICCVAM Background Review Document (BRD)）を公表した。これらの報告書について JaCVAM 発熱性物質試験評価委員会が評価した。
  - ・ ICCVAM による妥当性評価では、OECD の指針書（GD34）に従って、要確認項目（Modular approach）が精査された。
  - ・ これらの報告書には評価した 5 つの試験のプロトコール及び被験物質が記載されている。

総合評価の資料として取り入れなかった報告については概要を示し、ウサギ「発熱性物質試験法」との相関性については参考資料を挙げて比較したことが示されている。

- ・ 資料には、データ処理の仕方に若干の問題があったが、その結論に与える影響は小さく、ICCVAM の総合評価は受け入れられるものである。
3. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは（同時に）そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。
- ・ *in vitro* 発熱性物質試験法（*in vitro* PBMC 試験法）においては、発熱性物質の存在を評価するために、ヒト末梢血単核細胞あるいは株化ヒト単球様細胞から分泌される炎症性サイトカイン（インターロイキン（IL） $-1\beta$  あるいは IL-6）を測定する。エンドトキシンを介した発熱の機序には即しており、科学的に妥当である。
  - ・ 試験法として標準的に参照されているウサギの体温上昇を測定する「発熱性物質試験法」、及び「エンドトキシン試験法」との比較を行い、結果が概ね一致していることを確かめている。
  - ・ ヒト由来の細胞を用いることから、異なる動物種を用いる「発熱性物質試験法」や「エンドトキシン試験法」よりもヒトでの発熱性を正確に予測できる可能性はあるが、それは検証されていない。
  - ・ 評価書では、グラム陰性菌由来のエンドトキシンについてのみ検証されており、非エンドトキシンについては十分な検証がなされていない。
4. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。  
当該試験法は、あるエンドトキシン投与量においてサイトカイン量がある値を越えているかで陽性・陰性を評価する試験法であり、ハザードは評価できる。ウサギを用いた発熱性物質試験法と同様、リスク評価を目的とするものではない。
5. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。
- ・ 当該試験法の正確性及び再現性は合計 13 物質のバリデーション研究によって評価されている。いずれもエンドトキシンを添加した医薬品で、エンドトキシンを添加せずとも発熱性を示す物質、生物学的製品及び医療機器などについては実施されていない。よって、非エンドトキシンの検出力が不明確である。当該試験法は非経口投与される医薬品のエンドトキシンによる発熱性の評価が可能であるが、医療機器や経口曝露される医薬品に対しては不十分であると考えられる。
  - ・ 参考資料として、臨床上で発熱の副作用報告のあったヒト血清アルブミン製剤、第Ⅷ因子製剤、及び血漿分画製剤にエンドトキシンを添加した試料について、ウサギ発熱性物質試験、エンドトキシン試験、*in vitro* PBMC 試験での結果を比較した報告が上げられている。また、当該試験法を用いた各種グルカン、リポテタイコ酸、真菌胞子、各種医療材料、脂質等での結果も報告として示されており、他の試験法では適用困難なものについても検出することが可能であった

としている。しかし、これらは検証的なデータとは言えない。

6. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者として適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。
  - ・ 採血後 4 時間以内のヒト全血、凍結保存血、全血から採取した末梢血単核細胞あるいは株化細胞を用い、IL-1 $\beta$  または IL-6 を測定する。組み合わせによって 5 つの試験法（全血（Whole Blood：WB）/IL-1、保存血 CryoWB/IL-1、WB/IL-6、PBMC/IL-6、単球細胞株 MM6/IL-6）があり、それらの推奨プロトコルが ICCVAM により提案されている。発熱性の予測性能としては、どの試験法ともほぼ同じ一致率を示している。
  - ・ PBMC/IL-6 及び WB/IL-1 については、変法が評価されている。しかし、その変法がどのような経緯で作られたか明らかではなく、頑健性については評価できない。
  - ・ ELISA キットを用いてサイトカインを測定するので、技術移転の容易性については検討されていないが、経験を有する人が技術習得することは容易であると思われる。WB/IL-1 についての施設間再現性が悪いが、他の試験法の施設間再現性および施設内再現性は良好とされている。
7. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。
  - ・ 多数の動物を用い、実施まで時間のかかるウサギを用いる「発熱性物質試験法」よりは時間的経費的に優位であると推察される。
  - ・ 「エンドトキシン試験法」と比較したときの時間的経費的な有用性については明らかではない。
  - ・ ヒト血液を用いる場合は、行政的な制約を伴う。
8. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。
  - ・ ウサギを用いる発熱性物質試験と比較した場合、当該試験法は新しい試験法であり、3Rs 原則を満たしており、経済的にも優位性がある。
  - ・ エンドトキシン試験と比較した場合、作用機序の異なる新しい試験法ではあるが、倫理的・経済的には優位性が明らかでない。

以上の審議の結果、JaCVAM 評価会議は、*In vitro* 発熱性物質試験について以下のように結論した。

- ・ 当該試験法は、エンドトキシンによる発熱の機序をもとに考案された方法であり、原理面で科学的な妥当性はある。
- ・ バリデーション研究によって、ウサギ発熱性物質試験法との相関性も概ね高いと思われるが、これを代替法として採用するためには、化合物数を増やし、多施設バリデーションを実施することが必要である。
- ・ 現時点でエンドトキシン試験にかわるものではない。本邦においては、日本薬局方 15 局でウサギを用いる発熱性物質試験からエンドトキシン試験への移行が進められている現状を踏まえると、利用価値は限定的と言える。
- ・ 有望な試験法と考えられるが、現時点では、ただちに代替法として採用することは妥当でない。

参考文献

1. OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005) 14