

In vitro 発熱性物質試験の第三者評価報告書

平成 22 年（2010 年）8 月 18 日

発熱性物質試験評価委員会

発熱性物質試験評価委員

中澤憲一 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部)

篠田和俊 (医薬品医療機器総合機構)

小島肇 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部)

吉村功 (東京理科大学)

西岡吾朗 (扶桑薬品工業)

石井健 (大阪大学)

オブザーバー

内藤 誠之郎 (国立感染症研究所)

用語集

BET : Bacterial Endotoxin Test : Limulus amoebocyte Lysate (: LAL) TESTING (エンドトキシン試験)

BRD: Background Review Document

ECVAM: European Center for the Validation of Alternative methods

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

GD: Guidance Document

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

IL: Interleukin (インターロイキン)

IL-1 β : Interleukin 1 β

IL-6: Interleukin 6

IL-8: Interleukin 8

LAL: Limulus amoebocyte Lysate (カプトガニ血球抽出物)

LPS : Lipopolysaccharide (リポ多糖)

LTA:Lipoteichoic acid (リポテイコ酸)

MM: Monocytoid Cell Line Nono Mac (単球細胞株)

OECD : Organization for Economic Co-operation and Development

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell (末梢血単核細胞)

RPT : Rabbit Pyrogen Test (ウサギ発熱性物質試験)

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

WB: Whole Blood(全血)

要旨

当委員会は、製剤の発熱性物質（パイロジェン）の検査法である発熱性物質試験に関して提案されている新規試験法について、その妥当性を検討することを目的とする。この新規試験法は、従来の発熱性物質試験に代わるとされる *in vitro* 発熱性物質試験法であり、採取したヒト末梢血単核細胞（PBMC）から分泌されるサイトカイン（インターロイキン；IL）の量を指標とする。この試験法に対し、各委員が以下のような観点で考察を加え、その妥当性を総合的に評価した。

1) 試験法の科学的、規制の上での妥当性

従来の発熱性物質の検査法であるウサギを用いた発熱性物質試験法とカプトガニの血球抽出成分の凝固反応によるエンドトキシン試験法（リムルス試験）、さらに、今回新たに提案された *in vitro* 発熱性物質試験法（以後、*in vitro* PBMC 試験法と記す）について、検出可能な発熱性物質の種類について考察を加えた。ウサギによる発熱性物質試験ではエンドトキシン、非エンドトキシンを問わず発熱性物質の検出が可能であるが、試験法が煩雑であり、また、検査に多数の動物を必要とする。これに対し、エンドトキシン試験は簡便であり、医薬品の品質管理上問題となるエンドトキシンに対し優れた検出力を有するが、非エンドトキシンの発熱性物質試験には無効である。*in vitro* PBMC 試験法は発熱の生化学的メカニズムに立脚しており、理論上はエンドトキシン、非エンドトキシンの両者に対応が可能であるが、これまでに提出されているデータは主としてエンドトキシンに関するもので、非エンドトキシンの発熱性物質検出に有効であるかどうかは明確には示されていない。エンドトキシンの検出には現在用いられているエンドトキシン試験が有効であるため、動物実験代替法（以下、代替法と記す）としては非エンドトキシンをもカバーするウサギによる発熱性物質試験に代わる役割が期待されるが、個々の事例について検証する必要があると考えられる。また、ヒトの血液等を用いるので、ヒトへの影響を直接的に評価できるという利点も想定されるが、日本人の血液を用いる場合にはその検証が必要となろう。

2) プロトコールの妥当性およびバリデーション研究に用いた被験物質

in vitro PBMC 試験法の5つのプロトコールを詳細に検討し、例数およびそれに基づく解釈についての疑念に加えるとともに、日本における採血実施に伴うウイルス感染への危惧を指摘した。非エンドトキシンの発熱性物質についての考慮不足が懸念された。

3) 試験法の正確性・信頼性についての考察

文献1. ICCVAM Test Method Evaluation Report, および、文献2. ICCVAM Background Review Document の2つのデータを精査し、その問題点を詳細に指摘している。文献1における ICCVAM の総合評価は、“5種の *in vitro* PBMC 試験法は非経口投与によるエンドトキシンの発熱性物質試験として利用可能であるが、他の物質や器具の評価法としては不十分である”，というものであった。これは OECD の指針書 Guidance Document (GD)

34 に従ってなされている。データの質を吟味する上で、恣意的な選択がなされていないか、判定基準が後づけでないか、などの観点からの考慮が必要であり、質の良くないデータを削除した痕跡等の問題が文献1および2に散見された。しかし、文献のデータの吟味を行った13名の委員からなる *in vitro* Pyrogenicity Independent Peer Review Panel の中には統計に詳しいと思われる委員もおり、データの細部に性能を高め評価する偏りが多少見受けられるものの、ICCVAM の総合評価の結果から *in vitro* PBMC 試験法をおおむね受け入れて差し支えないものと考えられた。

4) 試験法の正確性を評価する物質の *in vivo* および参照データ

in vitro PBMC 試験法のバリデーションに用いられた13の物質に関し、比較のためのウサギを用いた発熱性物質試験は行われておらず、その代わりとして過去にドイツで行われたウサギによるデータとの比較がなされていることをまず指摘している。この比較はエンドトキシン試験の結果をも加えて行っている。ここで、実際の臨床使用で発熱が報告された物質に対する応答性を比較したところでは、必ずしもウサギで発熱が認められるとは限らず、例えば、ヒト血清アルブミン製剤については、*in vitro* PBMC 試験法では5例で平均5.52倍の応答が認められたが、ウサギではすべて陰性であった。エンドトキシンをスパイクした試料でのウサギを用いた試験との比較においても、第VIII因子製剤あるいはヒト血清アルブミンの発熱性について、*in vitro* PBMC 試験法ははるかに優れた応答性を示した。また、発熱性を示したゼラチン含有輸液製剤2バッチを用いた比較では、*in vitro* PBMC 試験法はともに陽性を示したが、エンドトキシン試験はともに陰性であり、ウサギは一方が陽性、他方が陰性であった。以上のように、*in vitro* PBMC 試験法はウサギを用いる方法あるいはエンドトキシン試験よりもヒトの発熱性を的確に検出できる可能

性があることが文献的に示された。

しかし、実際の製剤の原料や製造工程において、エンドトキシン以外の発熱性物質の汚染が考えられない場合には、現状のエンドトキシン試験で対応が可能である。また、ウサギによる発熱性物質試験のすべてを今回の新規試験法に切り替えるのが適当とは思われず、例えば、何らかの理由でエンドトキシン試験が適用できない場合に、ウサギによる発熱性物質試験の代替として *in vitro* PBMC 試験法を採用するといった限定的な使用にとどめるべきであるという考察がなされており、本委員会も同様に考える。

5) 試験法の科学的根拠および有用性と限界

in vitro PBMC 試験法以外にも、*in vitro* 発熱性物質試験法は提案されており、発熱あるいはそれに類するバイオマーカーを指標とする多様な系が開発されつつある。しかしながら、*in vitro* PBMC 試験法については、ICCVAM の報告書にもあるように、ウサギ発熱性物質試験との相関についてはエンドトキシン試験を引用しており、また、IL-1、IL-6 といったマーカーが発熱性について普遍性があるとは言えない。よって、*in vitro* PBMC 試験法をウサギ発熱性物質試験の代替法とすることには無理がある。発熱性の作用機序については、*in vitro* のみならず、*in vivo* のウサギにおいても、科学的に十分に解明されているとは言いがたい。最新の知見を踏まえた上で現行の試験法の可否と新たな試験法の必要性を論じる必要がある、という考察がなされており、本委員会も同様に考える。

6) 結論

上記の各考察より、今回提案された *in vitro* PBMC 試験法は、ウサギの使用数を削減可能とし、また、作用機序に立脚した発熱性物質試験の新たな方向性として評価でき、さらに、バリデーションでのデータの扱いに関しても納得のできる基準を満たしていると考えられる。しかし、ウサギを用いた発熱性物質試験との互換性については不明な点が多く、この試験法の代替法とするには、問題がある。国内ではウサギ発熱性物質試験からエンドトキシン試験への移行の問題も残されており、これに優先して独立した代替法とすることには無理がある。しかしながら、エンドトキシン試験が使用できないような特殊な状況やウサギとヒトでの発熱性に関する種差が想定されるような状況においてウサギ発熱性物質試験と併用するなど、限定的な使用については推奨できよう。このような *in vitro* PBMC 試験法が科学的根拠に基づいた研究により、さらに広範囲な状況で使用可能となることが望まれる。

補) エンドトキシン試験と発熱性物質試験に関する実態調査結果報告

2009年1月に日本製薬工業協会の協力を得て、アンケートを行い、36社から回答を得た。エンドトキシン試験法が、日本薬局方で優先すべき試験法として推奨されていることもあり、最も広く用いられていた。エンドトキシン試験法の原理は一連の酵素活性化反応であるため、これらの系に影響する反応干渉因子が存在する。しかし、実際には干渉のメカニズムが既知の物質については、製剤そのものが体温に影響する場合を含め、ほとんどが検証可能であった。今回提案されている新規試験法 (*in vitro* PBMC 試験法) の実施経験の報告は皆無であった。また、ヒトの血液の入手あるいはバイオハザードの問題などがあり、動物愛護の観点等からウサギを用いた発熱性物質試験法から代替法へと切り替えるにしても、エンドトキシン試験法への変更が妥当であると考えられた。上述したように、現状ではエンドトキシン試験法は日本薬局方においてその使用が推奨され最も汎用されている系ではあるが、推奨される以前にウサギによる発熱性物質試験のデータを用いて承認を受けた医薬品に関しては、動物愛護の観点を含めこれをエンドトキシン試験法に変更することが望まれる。しかし、実行するとなると、両者の同等性を示すために多数のウサギを使用しなければならない、というジレンマが生じる。

0. 評価資料

- 1) ICCVAM Test Method Evaluation Report
- 2) ICCVAM Background Review Document (BRD)
- 3) EC STATEMENT ON THE VALIDITY OF IN-VITRO PYROGEN TESTS
- 4) ECVAM BRD

1. 試験法の科学的、規制の上での妥当性

発熱性物質（ピロジェン）は、体温調節中枢である視床下部に直接的あるいは間接的に作用して体温を上昇させる物質である。主に、細菌やウイルス、菌類等の微生物に由来し、生体はこのような物質の暴露に反応して、前炎症性サイトカインである IL-1 や IL-6, TNF- α 等の内因性発熱性物質を産生分泌し、これらがプロスタグランジンの合成を促進して中枢神経系に作用することにより発熱を生じる。発熱性物質のタイプや量、あるいは暴露を受けた個人の感受性によっては、サイトカインが過剰に放出され、ショックや多臓器不全を発症して死に至る場合もあり、注射剤等の医薬品や医療用具の品質および安全性確保の観点から、発熱性物質の存在を適切かつ確実に評価できる試験法を確立することが重要である。

日本薬局方においては、2種類の試験、すなわち、「発熱性物質試験法」および「エンドトキシン試験法」（リムルス試験）が収載されている。試料をウサギの静脈内に投与して体温上昇（発熱）を測定する「発熱性物質試験法」は、前述の微生物由来物質のほか、化学的発熱性物質を含むさまざまなタイプの発熱性物質を検出できるが、実験操作が煩雑であることに加えて、多数の動物を使用することから、その動物実験代替法（以下、代替法と記す）として、カプトガニの血球抽出成分に対する凝固能を指標とした「エンドトキシン試験法」が開発された。

エンドトキシンは極めて活性の高い発熱性物質で、グラム陰性菌の細胞壁成分のリポ多糖であり、環境中に広く存在するとともに、その失活や除去が困難であることから、医薬品等の品質管理を行う上で特に重要である。2006年に告示された第十五改正日本薬局方（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、発熱性物質の検出において、「エンドトキシン試験法」が優先され、「発熱性物質試験法」はその補助的な試験法として位置づけられた。しかし、「エンドトキシン試験法」はグラム陰性菌由来のエンドトキシンの検出において感度が高いものの、非エンドトキシン型の発熱性に対しては反応せず、また、ある種の物質（ β -グルカン等）や試料によっては検出系が干渉され、適用が困難な場合もあり、さらに、「輸液用ゴム栓試験法」（15局）や「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）においては「発熱性物質試験法」の実施が要求されていることから、未だに多くのウサギが試験に用いられているのが現状である。また、ウサギには発熱性を示さないがヒトでは発熱性を示す物質については、「発熱性物質試験法」では検出できない。従って、規制の上からも、発熱性物質の検出において、ウサギでの「発熱性物質試験法」に代わり得る、新規の *in vitro* 発熱性物質試験法の開発は有意義であると考えられる。

今回提案された新規の *in vitro* 発熱性物質試験法（*in vitro* PBMC 試験法）は、ウサギでの「発熱性物質試験法」が *in vivo* での体温上昇（発熱）を測定するのに対して、発熱反応における単球の役割に注目し、ヒト血液（新鮮血／凍結血）由来あるいは株化されたヒト単球様細胞から培養液中に分泌される前炎症性サイトカイン（インターロイキン（IL）-1 β あるいはIL-6）を測定するものである。ウサギでの発熱性物質投与前後のサイトカイン濃度の変動に関するデータは得られておらず、発熱とサイトカインとの関係を直接比較することはできないが、前述のように、発熱性物質による発熱は、主に前炎症性サイトカインの放出を引き金として誘発されることから、これらのサイトカイン濃度と発熱が相関するとの仮定は科学的に妥当と考えられる。さらに、検出系がヒトに由来することから、「エンドトキシン試験法」や「発熱性物質試験法」よりもヒトにおける発熱性を正確に予測できる可能性も示唆される（表1：Biotest社資料より引用）。

しかし、今回 ECVAM（European Center for the Validation of Alternative methods）から提出された試験成績においては、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、エンドトキシンに対する個々の試験法の反応性や適切性に関するデータは示されているものの、非エンドトキシン型の発熱性について十分な検証がなされていない。従って、現時点では、*in vitro* PBMC 試験法は、ウサギでの「発熱性物質試験法」の完全な代替法とはなりえず、試料の検出系に対する干渉や試料が非エンドトキシン型の発熱性物質を含む等の理由から「エンドトキシン試験法」の適用が困難であり、「発熱性物質試験法」の実施が求められる個々の事例について、「発熱性物質試験法」と同等以上の検出感度を有することを検証した上で、ケースバイケースで適用することが妥当と考えられる。なお、これらの試験法の国内での実施にあたっては、ヒト試料を用いることによるバイオハザードの問題を解決するとともに、日本人の

血液を用いる場合にはその検証を行う必要がある。

Comparison of Pyrogen Test Methods				
	Rabbit	LAL	PyroDetect	
Test principle	Fever reaction in mammal	Defence mechanism	Fever reaction in human	
Contamination	Gram-negative (LPS)	+	+	
	Gram-positive (LTA)	+	+	
	Yeasts & Molds	+	+	
	Virus	+/- ¹	-	+
Application	Pharmaceuticals	+	+	
	Biologicals (e.g. gene therapy, recombinant therapeutic proteins)	+	+/- ²	+
	Medical devices	+ ³	+/- ³	+
	Cell therapeutics (e.g. monoclonal antibody)	-	+/-	+

¹ Variable pyrogen results, ² Rabbit test often required, ³ Indirect test with solution in pyrogen-free water

表 1: Comparison of the Rabbit Test, the LAL Test and the PyroDetect System.

2. プロトコールの妥当性

2-1. 試験名

ボランティアから供与を受けた全血を用い、採血後4時間以内に実施すべき試験が2種、保存血（凍結保存）を用いる試験が1種、全血から取り出したPBMC（末梢血単核細胞）を用いる試験が1種、細胞株を用いる試験が1種記載されている。これらを総称して *in vitro* PBMC 試験法とした。

- 1) 全血 (Whole Blood: WB) /IL-1
- 2) 保存血 CryoWB/IL-1
- 3) WB/IL-6
- 4) PBMC/IL-6
- 5) 単球細胞株 MM6/IL-6

2-2. 試験法

試験法として提案されている5種の試験のプロトコールはいずれも明確である。試験法の共通事項を以下にまとめた。試験法の詳細は添付資料2にまとめた。

- 1) 予備試験 エンドトキシンスパイク回収率（50～200％）のために必要な最低希釈濃度を定めるための相互試験
- 2) 使用限界 相互試験の結果による非経口医薬品、生物学製品、医療機器
- 3) 測定キット ELISA(1測定/n=4)
- 4) 陽性対照(PC) 0.5EU/mL WHO-LPS94/580(E.coli0113:h10:K-)
- 陽性製品対照 (PPC) 0.5EU/mLの陽性対照を添加した製品
- 5) 陰性対照(NC) 生理食塩水
- 陰性製品対照 (NPC) 生理食塩水を添加した製品
- 6) 測定値 吸光度の平均値±標準偏差
- 7) 陽性基準 セクション 4.2 で定められた発熱性閾値を基準にした発熱性様反応を示す >0.5EU/mL

これらの相違点のみを表2-1にまとめた。

表 2-1. 試験法の相違点一覧

試験法	WB/IL-1	CryoWB/IL-1	WB/IL-6	PBMC/IL-6	MM6/IL-6
起源	ヒト全血	ヒト全血	ヒト全血	ヒト全血	MM 細胞バンク
培養液	生理食塩水	RPMI1640	生理食塩水	RPMI1640	10 または 2% 非動化した牛胎児血清を含む RPMI1640
測定指標	IL-1 β	IL-1 β	IL-6	IL-6	IL-6
前処理	採血後, 4 時間以内に使用	Konstanz または PEI 法で凍結保存	採血後, 4 時間以内に使用	白血球および PBMC を遠心分離	MM6 細胞 4 \times 10 ⁵ 細胞/mL
被験物質の適用法	20 μ L サンプル + 200 μ L 生理食塩水 + 血液 20 μ L	Konstanz 法 20 μ L サンプル + PRMI 200 μ L + 血液 20 μ L, PEI 法 20 μ L サンプル + RPMI 180 μ L + 血液 40 μ L	50 μ L サンプル + 生理食塩水 100 μ L + 血液 50 μ L	50 μ L サンプル + PRPMI-C100 μ L + PBMC 100 μ L	50 μ L サンプル + PRPMI-C100 μ L + 細胞 100 μ L 100 μ L
適用時間	10-24 時間	10-24 時間	16-24 時間	16-24 時間	16-24 時間
ELISA 測定物	10000g, 2 分処理後の上清	混合物	混合物	上清	上清
n	1	5 (プール品)	3	3 - 4	1
適合基準 (陽性対照)	陽性対照 OD1.6 倍 > 陰性対照, 陽性製品対照 OD1.6 倍 > 陰性製品対照, 陽性製品対照の OD は陽性対照 OD の 50-200% 内	陽性対照 OD1.6 倍 > 陰性対照, 陽性製品対照 OD1.6 倍 > 陰性製品対照, 陽性製品対照の OD は陽性対照 OD の 50-200% 内	陽性製品対照の OD は陽性対照 OD の 50-200% 内	陽性製品対照の OD は陽性対照 OD の 50-200% 内, 1EU/mL の OD が > 1000 pg/mL IL-6	陽性対照 期待値 (0.5EU/mL) OD \pm 20%, 陽性製品対照の OD は陽性対照 OD の 50-200% 内
適合基準 (陰性対照)	OD \leq 0.1	OD \leq 0.1	OD < 200pg/mL IL-6	OD < 0.15 および OD < 500pg/mL IL-6	OD < 0.2
その他	特許あり (US6696261 B2)	特許あり (USPTO 436518000)	特許あり (US6696261 B2)		Prf. Ziegler-Heitbrock (German Collection of Microorganisms and Cell bank) のライセンス

これに対して, ICCVAM が第三者評価を実施し, 表 2-2 に示すような主に採用基準に関して推奨プロトコールを示している。

表 2-2. ICCVAM が推奨するプロトコール

試験法	WB/IL-1	CryoWB/IL-1	WB/IL-6	PBMC/IL-6	MM6/IL-6
被験物質	最大有効希釈濃度を越えず、干渉のない原液または段階希釈				
ドナー数	最小 3 (個々またはプールされたもの)				適用外
反応干渉の基準	陽性製品対照の平均 OD が 1.0EU/mL EC で 50-200%	陽性製品対照の平均 OD が 0.5EU/mL EC で 50-200%	陽性製品対照の平均 OD が 1.0EU/mL EC で 50-200%	陽性製品対照の平均 OD が 0.25EU/mL EC で 50-200%	陽性製品対照の平均 OD が 1.0EU/mL EC で 50-200%
培養プレート	陰性対照 (1)				
	エンドトキシンコントロール (5)				
	被験物質 (14)				
	陽性製品対照 (0)				
ELISA プレート	IL-1 β を 7 点およびブランク 2 点		IL-6 を 7 点およびブランク 2 点		
	陰性製品対照 (0)				
アッセイ採用基準	陰性対照の平均 OD \leq 0.15				
	IL-1 β 標準曲線が二次関数で r \geq 0.95		IL-6 標準曲線が二次関数で r \geq 0.95		
	エンドトキシン標準曲線の OE 値がシグモイド濃度反応で上がる				
	適用外	適用外	高反応ドナー (> 200pg/mL IL-6) は除外	高反応ドナー (> 200 pg/mL IL-6) または低反応ドナー (1 EU/mL のエンドトキシンコントロール < 1000 pg/mL) は除外	適用外
Dioxin's テストを用いる棄却検定					
発熱性陽性基準	被験物質中のエンドトキシン濃度 > 被験物質中のエンドトキシン測定限界濃度				

以下に評価委員会の意見を記す。

- 1) 日本での実施においては、採血を伴う試験の普及度が気掛かりである。試験者が試験によって未知のウイルスによる感染する恐れも否定できず、可能であれば細胞株の利用を推し進めるべきであろう。
- 2) 指標としては、インターロイキン 1 β (IL-1 β) が 2 種、または IL-6 が 3 種の試験で提案されており、ELISA 法で簡便に測定できる。
- 3) ECVAM では、PBMC の場合、ドナーのバラツキを考慮して n=3~4、保存血の n=5 と妥当な数を推奨している。これらの結果の多数決で判定される。WB/IL-6 が n=3 であるのに対し、WB/IL-1 の n が 1 であることには納得できていない。検体数は ICCVAM が推奨するように、最少でも 3 以上とすべきである。
- 4) 陽性対照は、大腸菌の抽出液 (WHO-リポポリサッカライド 94/580) という標準品 (エンドトキシン) であり、0.25~5.0EU/mL で検量線を求め、その基準と合わせ妥当な選択がなされていると考える。
ECVAM では、0.5 エンドトキシンユニット (EU) /mL を越えた場合を陽性とし、ICCVAM では試験法によって、0.25~1.0 (EU) /mL としている。ICCVAM が試験法毎に基準を変えている理由が明確でなく、判断できない。
- 5) エンドトキシンを添加していない対照品も試験されており、コントロールの設定は適切であると考えられる。
- 6) 本研究は将来、n 数を増やし、エンドトキシンを添加せずとも発熱性物質試験で陽性となるような被験物質を用いた追加バリデーション研究が必要であると考えられる。現状では、発熱性物質試験の完全な代替法とはいえ、補完試験の位置付けである。

3. バリデーション研究に用いた被験物質

表 3-1 および 3-2 に示すように、正確性の確認のために 10 物質、再現性確認のために 3 物質が実験に利用されている。

表 3-1. 正確性を求めるためにバリデーション研究に用いられた 10 物質

Test Substance ²	Source	Active Ingredient	Indication	MVD (-fold)
Beloc [®]	Astra Zeneca	Metoprolol tartrate	Heart dysfunction	140
Binotal [®]	Aventis	Ampicillin	Antibiotic	140
Ethanol 13% (w/w)	B. Braun	Ethanol	Diluent	35
Fenistil [®]	Novartis	Dimetindenmaleat	Antiallergic	175
Glucose 5% (w/v)	Eifel	Glucose	Nutrition	70
MCP [®]	Hexal	Metoclopramid	Antiemetic	350
Orasthin [®]	Aventis	Oxytocin	Initiation of delivery	700
Sostril [®]	GSK	Ranitidine	Antiacidic	140
Drug A - 0.9% NaCl	-	0.9% NaCl	-	35
Drug B - 0.9% NaCl	-	0.9% NaCl	-	70

Abbreviations: MVD = Maximum valid dilution; GSK = GlaxoSmithKline; NaCl = Sodium chloride; w/w = Weight/weight; w/v = Weight/volume

¹Each substance was tested in all five *in vitro* pyrogenicity test methods.

²Each test substance was spiked with 0, 0.25, 0.5, 0.5, or 1.0 EU/mL of endotoxin (WHO-LPS 94/580 [*E. coli* O113:H10:K-]). Each sample contained the appropriate spike concentration when tested at its Maximum Valid Dilution (MVD).

表 3-2. 再現性を確認するためにバリデーション研究に用いられた 3 物質

Test Substance ²	Source	Agent	Indication
Gelafundin [®]	Braun Melsungen	Gelatin	Transfusion
Jonosteril [®]	Fresenius	Electrolytes	Infusion
Haemate [®]	Aventis	Factor VIII	Hemophilia

¹Each substance was tested in all five *in vitro* pyrogenicity test methods.

²Each test substance was spiked with 0, 0.5, or 1.0 EU/mL of endotoxin (WHO-LPS 94/580 [*E. coli* O113:H10:K-]). Each sample contained the appropriate spike concentration when tested at its Maximum Valid Dilution (MVD).

表 3-1 および 3-2 に示すような合計 13 物質を用いたバリデーション研究は少なすぎる。エンドトキシンを製剤にスパイクしたものを被験物質として使用しており、この方式では被験物質を増やしたから適切であるとは言い切れない。選ばれている製品はコード化されたものが、医薬品しか実施されていない。生物製品、医療機器などの結果がない。

いずれもエンドキシンを製品に添加した被験物質を試験に用いているが、エンドトキシンをスパイクせずとも発熱試験で陽性となるような被験物質における結果が必要である。また、エンドトキシンを産生するグラム陰性細菌の評価は可能であるとしても、その他細菌による発熱作用は判別できているとはいえ、その使用は限定的であると考えられる。

4. 試験法の正確性・信頼性を評価するデータについての考察

試験法の正確性や信頼性の評価に用いられているデータの質について述べる。検討したものは、次の二つの冊子の中で説明されているデータとそれを評価に利用したときの方法論である。

文献 1. ICCVAM Test Method Evaluation Report

文献 2. ICCVAM Background Review Document

ICCVAM のこの検討結果は、2008 年 5 月に公開されたものであり、それより前の ECVAM の検討結果を利用している。従って、データを吟味するという面では、最新でかつ最も網羅的なものと考えられる。

実際、文献 2 の § 9 では、ECVAM が 2005 年に「RPT, BET, *in vitro* pyrogen test について、実験データを持っている場合は提供してほしいと呼びかけたが反応は皆無であった」と述べている。そして、文献検索で入手した報告において、試験プロトコールが異なるがゆえに総合評価に用いなかった 10 報告 (§ 9.1) と、被験物質の関係で総合評価に取り入れなかった 9 報告 (§ 9.2) について、概要を述べている。

以上の状況を考えると、5 つの *in vitro* PBMC 試験法の性能評価は、文献 2 に採録されている資料に基づいて行うのが妥当と考えられる。

文献1において ICCVAM は、検討した5試験について、「これらの5試験は経口でない投与におけるグラム陰性エンドトキシンによる発熱性物質を評価・同定するための代替法として、完全ではないが利用可能である（… can be considered for use to detect … in human parenteral drugs on a case-by-case basis）. しかし、他の物質や器具の評価法としては不十分である。」と総合評価している（p. xvi）.

この妥当性評価は、OECDの指針書（GD34）にしたがっている。そこでの要確認項目（Modular approach）は次の通りである。

- (i) 当該試験法の定義（目的、必要性、科学的根拠を含む） Test definition (including purpose, need and scientific basis)
- (ii) 施設内の同等性・再現性 intra-laboratory repeatability and reproducibility
- (iii) 施設間の易移転性 inter-laboratory transferability
- (iv) 施設間の再現性 inter-laboratory reproducibility
- (v) 予測能（正確性） predictive capacity (accuracy)
- (vi) 適用限界 applicability domain
- (vii) 性能標準 performance standards

これらの各確認項目のうち、(i) 試験の標準手順とその正当化、(vi) 適用限界、(vii) 標準性能、については、被験物質や試験条件の技術的吟味が主要で、データの質について議論する事柄はほとんどない。

データの質について着目すべき吟味点は次の通りである。

(ii) 「施設内同等性・再現性」の根拠とされたデータの完全性（integrity）を確認するには、同じときに反復したとされる実験が、「・試料名をコード化してかつ適切に混ぜて行われたものかどうか、・どの程度の時間範囲で行われたか、・恣意的なデータ選択が行われなかったか、・判定基準が後知恵的でなかったか、」などを吟味することが必要である。

(iii) 「施設間の易移転性」を確認する方法論は国際的にも、国内的にも確立していないので、これについてはどのような検討がされているかを吟味することが必要である。

(iv) 「施設間の再現性」については、多くの被験物質を多くの施設で分業的に確認する、という方針を過去の日本でのバリデーション研究で取ってきたが、欧米ではそうではなく、少数の被験物質を多くの施設で共通に確かめることと、多くの被験物質を少数の施設で確かめること、の両方で良いとしてきた。このECVAMとICCVAMの方針に基づいて得られた結果が適切かどうかを、日本の方針に基づいて吟味することが必要がある。

(v) 「予測能（正確性）」については、黄金標準となる真の評価が本当に「真」なものかどうか疑問が生じることが稀でない。実際、人での結果と動物（*in vivo*）での結果の類似性（similarity）は、完全に一致するものではないことが知られている。これについて吟味することが必要である。

(v) で取り上げられている正確度について、文献1は表4-1のデータを示している。ただしこの表では、英語で“accuracy”と書かれているものを一致度（concordance）と置き換えてある。概念としての正確性と、数値としての比率を区別するためである。

表 4-1

Test method	Concordance	Sensitivity	Specificity
Cryo WB/IL-1	92% (110/120)	97% (75/77)	81% (35/43)
MM6/IL-6	93% (138/148)	96% (85/89)	90% (53/59)
PBMC/IL-6	93% (140/150)	92% (83/90)	95% (57/60)
PBMC/IL-6 (Cryo) *	87% (130/150)	93% (84/90)	77% (46/60)
WB/IL-6	92% (136/138)	89% (79/89)	97% (57/59)
WB/IL-1 (Tube)	81% (119/147)	73% (64/88)	93% (55/59)
WB/IL-1 (96-well plate) *	93% (129/139)	99% (83/84)	84% (46/55)

文献の1, 2ではこの種の表に、偽陰性率、偽陽性率等の数値も併記されているが、これらは感度と特異度から引き算で簡単に計算されるものであるから、データの質の吟味には不要である。

評価される試験法が5試験なのに、この表に7試験があるのは、*をつけた試験がそのすぐ上の試験の変法として ECVAM のバリデーション研究で実験が行われ、データが評価に利用されたためである。

表 4-1 に示されている値は、ウサギを用いる発熱性物質試験を黄金標準として示されている。文献 2 ではこれについて、ウサギでの結果とヒトでの結果はおおむね類似している、と述べている。ただし、用量反応関係はウサギよりヒトの方が急峻になる傾向があることを注意している。これがどのように発熱性評価に影響するかは明らかでないが、代替法としての評価には影響しない程度と考えられる。

表 4-1 で示されている予測性能は、PBMC/IL-6 については原法、WB/IL-6 については変法の標準作業手順 (SOP) を用いることで、どの試験法も非常に良いことを示している。

問題としては、この変法がどのような経緯でバリデーション研究に加えられたかである。評価においては、SOP を固定して比較するのが原則だからである。

表 4-1 のデータについては、評価に採用されている実験データの量が、試験毎に異なっていることを注意しなければならない。この理由について、文献 1 は、§ 5.3 “Description of the Statistical Approaches Used to Evaluate the Resulting Data” において次のように述べている。

「再現性解析においては、1 実験 (run) が 4 反復 (quadruplicate) の測定値からなっているので、その変動係数 (coefficient of variation: CV) で反復におけるデータの精度を評価し、試験毎に多少異なる、 $CV < 0.25$ から $CV < 0.45$ という基準でデータの採否を決めた。」

これは、バリデーション研究の実験データから、精度の悪さを反映しているデータを除去して計算したことを意味している。この基準をいつの時点 (事前か事後か) どのような正当化に基づいて導入されたかは、明らかでない。

データの最大量が、10 物質 x 5 施設 x 3 実験、の 150 実験 (runs) であるから、データ量が少ない試験は、それだけ試験法としての再現性が悪かったと評価すべきである。たとえば、Cryo WB/IL-1 や WB/IL-1 (96-well plate) における高い感度は、陽性物質 90 実験の 14%、7% を除外して評価した値であることに注意すべきである。極端な場合として、除外されたものがすべて「適正に評価されなかったもの」とすれば、Cryo WB/IL-1 の感度は、83%になる。

感度と特異度は、取引関係 (trade-off relationship) を持っている。すなわち、判定限界値 (cut-off value) を変えれば、一方が大きくなることで他方が小さくなる、という関係を持っている。このデータに基づいて判定限界値を調整することで、感度や特異度は変更できる。しかしそうすると、バリデーション研究の正統的遂行がおかされる。このデータに基づいて、SOP の変更を行ったとすると、その妥当性を新たに検証しなければならない。

文献 2 の § 5.5 によると、被験物質は基本的にはコードをつけて実験に供されたが、3 物質だけは例外であった。すなわち、「the identity of the three test substances was not blinded」とされている。その理由が明らかでない。

ICCVAM は易移転性についての検討を全くしていない。これは、わずか 3 施設しかバリデーション研究に参加させていなかったためと考えられる。GD34 では、要確認項目としているのに、ECVAM も ICCVAM も、試験法の易移転性は重視していないようである。

実際に易移転性を評価するには、日本のバリデーション研究で行っているように、比較的広い範囲で一般を代表できる施設で実験を行うべきであるが、ECVAM にも ICCVAM にも、そのような視点が存在していないようである。これが問題であることは、日本から提起・発信していくべきではないだろうか。

実験の反復安定性 (repeatability) と施設内再現性 (intra-laboratory reproducibility) は、概念としては違うことが GD34 の用語集 (Glossary) で示されている。しかし ECVAM のバリデーション研究では、この区別がされておらず、文献 2 では、§ 7.2.2 で両方を 3 実験 (runs) での結果の対ごとの一致率で評価している。この評価法自体は悪くないが、その際に都合の悪いデータの除去が行われたようである。これについては元データを吟味する必要がある。

Lab 2 には問題があるようで、データが除外されているだけでなく、“not included” の欄が一つあって、“NI: Not included due to lack of sufficient data. The sensitivity criteria were not met for 1 of 3 substances in run 2, and 1 of 3 substances in run 3” と注記されている。

数値としては悪くないが、Lab 2 での除外が何を意味するか、検討が必要である。

表 4-2

Lab	WB/IL-1			WB/IL-6			PBMC/IL-6			MM6/IL-6		
	Lab1	Lab2	Lab3	Lab1	Lab2	Lab3	Lab1	Lab2	Lab3	Lab1	Lab2	Lab3
1vs2	92%(1/12)	100%(8/8)	100%(12/12)	75%(9/12)	92%(1/12)	100%(12/12)	92%(1/12)	100%(12/12)	100%(12/12)	100%(12/12)	92%(1/12)	100%(12/12)
1vs3	83%(0/12)	88%(7/8)	92%(1/12)	100%(12/12)	92%(1/12)	100%(12/12)	100%(12/12)	100%(12/12)	92%(1/12)	100%(12/12)	92%(1/12)	92%(1/12)
2vs3	92%(1/12)	NI	92%(1/12)	75%(9/12)	92%(1/12)	100%(12/12)	92%(1/12)	100%(12/12)	92%(1/12)	100%(12/12)	100%(12/12)	92%(1/12)
All	83%		92%	75%	92%	100%	92%	100%	94%	100%	92%	92%

施設間再現性 (inter-laboratory reproducibility) も施設内再現性と同一ように、一致率で検討がされている。結果は表 4-3 にまとめられている。

表 4-3

Lab.	Test Method				
	WB/IL-1	Cryo WB/IL-1	WB/IL-6	PBMC/IL-6	MM6/IL-6
1vs2	92%(77/84)	92%(11/12)	72%(78/108)	81%(87/108)	97%(105/108)
1vs3	77%(83/108)	92%(11/12)	75%(81/108)	86%(93/108)	89%(96/108)
2vs3	68%(57/84)	92%(11/12)	97%(105/108)	89%(96/108)	86%(93/108)
All3	58%(167/288)	92%(11/12)	72%(234/324)	78%(252/324)	86%(279/324)

特定の施設が他とかけ離れている、という現象は起こっていない。WB/IL-1 β の施設間再現性が悪いようである。

データの吟味は、13人の委員からなる、*in vitro* Pyrogenicity Independent Peer review Panel (Panel) で行われた。委員の中には統計に詳しいと思われる委員が一人、日本人が一人含まれている。

文献1のExecutive Summary (p. xv) の中段に「The Panel ... to review the ICCVAM draft BRD for errors and omissions and to discuss the current validation status to the five *in vitro* test methods.」という記載がある。この中の、「errors and omissions」がデータの何を意味するのであれば、データの取舍選択が問題になったことになる。

文献2の§5.3では、測定値の除外の方法についての約1ページにわたる記載があるが、最終的に定められた基準が、データを見てからの後付原則であるか、事前討議の結果であるか明らかでない。文脈をみると、前者のように感じられる。

以上、データの細部には、性能を高め評価する偏りの存在が見受けられるが、その影響はそれほど大きいものではない。ICCVAMの総合評価の結果は、おおむね受け入れて差し支えないと考えられる。

試験法の正確性を評価する物質の *in vivo* および参照データ

・ *In vivo* データについて

WB/IL-1, CRYO WB/IL-1, WB/IL-6, PBMC/IL-6, MM6/IL-6の5種類の *in vitro* PBMC試験法に関するECVAM BRD March, 2006 Section 3.3 (ICCVAM BRD Appendix A1 ~ A5 May 2008に収載) および ICCVAM BRD May, 2008 (Section 3.3) には、評価に使用した13種類の物質の一覧が記載されているが、ECVAM BRD March, 2006 Section 4.1 および ICCVAM BRD May 2008 (Section 4.2) によれば、これらの物質でのバリデーションには、倫理的な理由からウサギを使用した発熱性物質試験は実施されていない。

これは、エンドトキシンをスパイクした13種類の物質についてのウサギ発熱性物質試験での発熱に関する干渉作用の有無は明らかにされなかったことを意味する。これと同様に、13種類の物質でのエンドトキシン以外の発熱物質についての反応に対する干渉作用の有無が明らかではない。

その代わりに他の研究成果によるデータが参考資料として使用されている。これは、ドイツの

Paul-Ehrlich Instituteによって得られたデータで、エンドトキシンを用いた171羽のウサギ(Chinchilla Bastards種)による発熱閾値の調査で、被験ウサギの50%が0.55°Cの体温上昇を示す体重1kgあたりのエンドトキシン量は5EUであったとしている。

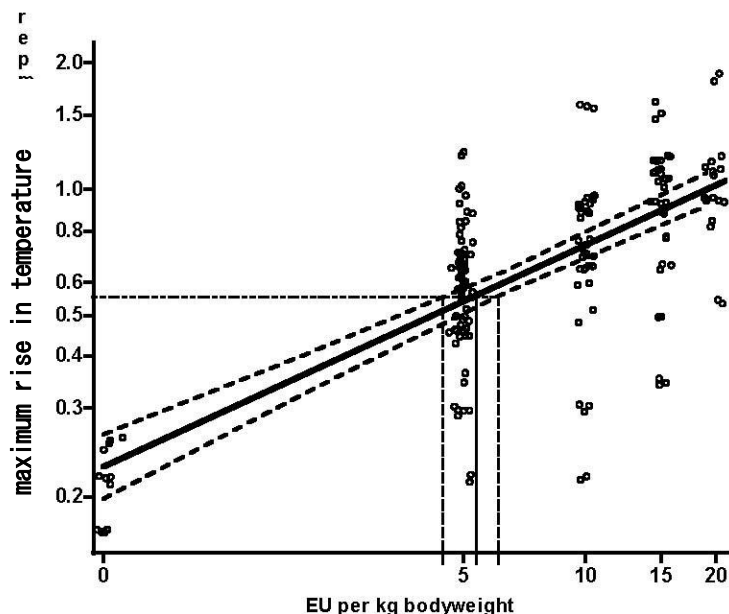


図4-1

ECVAM BRD March, 2006 Section 4.1 Figure 4.1.1 "Dose-Temperature of standard endotoxin applied to Chinchilla Bustards (n=171)"より

これは、ヒト男性ボランティアにエンドトキシンを投与した研究と同等の結果であり、エンドトキシンに対するウサギとヒトの発熱反応が類似であるとしている。(ECVAM BRD March, 2006 Section 4.5)

また、5種類のECVAM BRD March, 2006 Section 9およびECVAM Response to ICCVAM Questions (ICCVAM BRD Appendix Bに収載)にて、*in vitro* PBMC試験法、ウサギ発熱性物質試験、エンドトキシン試験についての過去の文献による比較が報告された。

ここでは、実際の臨床使用において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、および血漿分画製剤にエンドトキシンをスパイクした試料を用いて、ウサギ発熱性物質試験、エンドトキシン試験と、*in vitro* PBMC試験法の報告があり、非エンドトキシン性発熱物質やウサギで発熱を起こさないがヒトで発熱を起こす物質について、*in vitro* PBMC試験法により検出可能であったとしている。さらに、エンドトキシンと共に各種グルカンやリポテイコ酸(LTA)等での報告や、真菌孢子、各種医療材料、脂質等での報告があり、ここでも*in vitro* PBMC試験法で検出が可能であったとしている。内容を以下にまとめた。

- ・発熱の副作用報告のあったヒト血清アルブミン製剤について、ウサギ発熱性物質試験およびエンドトキシン試験では全て陰性であったが、*in vitro* PBMC試験法のうち、WBを用いる試験法では、ドナー数5の平均値が対照ロットの平均値と5.52倍の差が見られた事が示された。

表4-4

Donor	Incriminated batch IL-1 (pg/ml)	Control batch IL-1 (pg/ml)	Quotient incriminated/control
1	79.0	4.0	19.75
2	14.1	3.9	3.61
3	44.3	15.0	2.95
4	20.9	14.9	1.4
5	71.9	3.9	18.44
Mean	46.04	8.34	5.52

ECVAM Response to ICCVAM Questions 1. a "Fever reactions caused by a batch of Human Serum Albumin Table: Incriminated Human Serum Albumin" (ICCVAM BRD Appendix B)より

- ・第Ⅷ因子製剤について、6製造業者の製剤各3ロットに、エンドトキシンをスパイクした時のウサギ発熱性物質試験およびWBを用いる試験法による比較では、ウサギの発熱閾値に相当する5 IU/kg体重のエンドトキシンを投与されたウサギでは明らかな陽性の結果が得られなかったが、WBを用いる試験法(WB/IL-1)では全て陽性の結果が示された。

表4-5

Endotoxin (WHO Standard)		Rabbit Pyrogen Test 3 animals per test			WB n = 4 donors each	
Rabbit	IVPT	positive	repetition possible	negative	positive	negative
IU LPS/kg (1mL/kg)	IU LPS/mL	> 2.65 °C	> 1, 15 < 2.65 °C	< 1.15 °C		
0	0	0	0	18	0(1)*	72(71)*
5	5	0	17	1	72	0
15	15	11	7	0	72	0

ECVAM Response to ICCVAM Questions 1. b "Coagulation Factor VIII Concentrates Table: Comparison study Factor VIII (18 batches, 162 rabbits)" (ICCVAM BRD Appendix B) より

* testing the same sample, the blood of 3 donors remained negative, the blood of 1 donor reacted slightly positive in the first experiment, the repetition was negative

(* 初回の試験で1ドナーの血液のみ弱い陽性反応を示したため、同じ試料で再試験を実施した結果は陰性、他の3ドナーの血液も陰性。)

- ・発熱を起こした血漿分画製剤について、ウサギ発熱性物質試験で陽性、エンドトキシン試験で陰性であったと報告された。(図表なし: ECVAM Response to ICCVAM Questions 1. c "Pyrogenic batch of a plasma derivative" (ICCVAM BRD Appendix B) より)
- ・ヒト血清アルブミンについて、5製造業者の各種濃度製剤各3バッチ(合計29バッチ)に、エンドトキシンをスパイクした時のウサギ発熱性物質試験およびWBを用いる試験法による比較では、ウサギの発熱閾値に相当する5 IU/kg体重のエンドトキシンを投与されたウサギでは、29バッチの製剤中5バッチのみ陽性であったが、その他のバッチでは明らかな陽性の結果が得られなかった。一方、WBを用いる試験法では全て陽性の結果が示された。

表4-6

Endotoxin (WHO Standard)		Rabbit Pyrogen Test 3 animals per test			WB	
Rabbit	IVPT	positive	repetition possible	negative	positive	negative
IU LPS/kg (1mL/kg)	IU LPS/mL	> 2.65 °C	> 1, 15 < 2.65 °C	< 1.15 °C		
0	0	0	0	29	0	29
5	5	5	23	1	29	0
15	15	21	8	0	29	0

ECVAM Response to ICCVAM Questions 1. e "Table: Comparison study Human Serum Albumin (29 batches, 261 rabbits)" (ICCVAM BRD Appendix B) より

- ・発熱の副作用報告のあったゼラチン含有輸液製剤について、副作用事例の生じていない対照バッチと共に、エンドトキシン試験、ウサギ発熱性物質試験およびWBを用いる試験法で比較を行った結果、WBではヒトで発熱を起こした2つのバッチと陰性対照を識別できたのに対して、エンドトキシン試験では全て陰性、ウサギ発熱性試験ではヒトで発熱を起こした2バッチの内1バッチが陰性で、ヒトに発熱性を有するがウサギには発熱を起こさない事例が示された。

表 4-7

batch	LAL test	rabbit test	fever in patients	WB		
				IL-1 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF (pg/mL)
A	negative	negative	no	8.5	28.0	28.2
B	negative	positive	yes	142.6	654.4	67.6
C	negative	negative	yes	421.5	9444.0	116.7
cut off:				32.6	127.6	43.6

ECVAM Response to ICCVAM Questions 1. f (ICCVAM BRD Appendix B) "Table 5: Incriminated infusion solution containing gelatine"より

- 11の物質について、それぞれの試験法で反応を示した最小濃度 (ng/mL) が報告された。3種類のグルカンは、エンドトキシン試験で偽陽性の結果となり、エンドトキシン試験で偽陽性のグルカンとカードランに反応せず、エンドトキシン試験で偽陰性のLTAに反応したと報告された。

表4-8

	WBT/IL-1	WB/IL-6	PBMC/IL-6	MM6/IL-6	THP-1/Neo
Curdlan	1000	1000	100	1000	1000
Glucan-Barley	negative	negative	negative	negative	negative
Glucan-Yeast	not done	negative	negative	negative	negative
Zymosan	negative	10000	10000	negative	10000
PHA-L	100	10000	100	100	1000
PHA-E	negative	negative	negative	negative	negative
Lipid A	10000	1000	10000	1000	negative
Glucan STD	negative	negative	negative	negative	undiluted
Endotoxin-C	4	40	0.4	4	4
Endotoxin-G	0.4	40	4	4	4
LTA	1000	1000	100	1000	1000

ECVAM Response to ICCVAM Questions 2. (ICCVAM BRD Appendix B) "Table: Smallest concentration [ng/mL] or dilution of substances active in the respective method"より

- 12人のドナー血液によるエンドトキシン (0.5EU/mL) と B. subtilis 由来LTAの反応性について、いずれも明らかな陽性反応を示したと報告された。

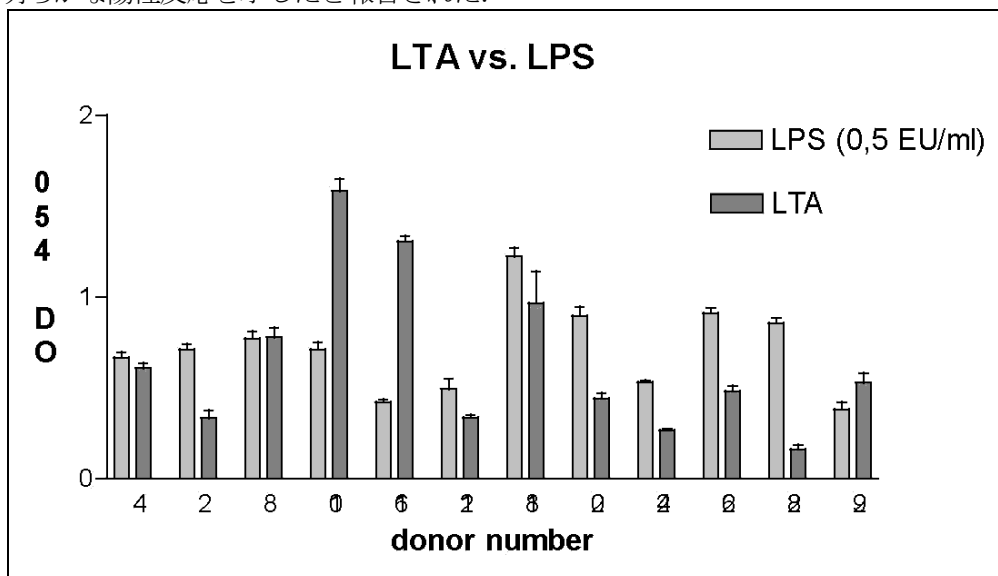


図4-2

ECVAM Response to ICCVAM Questions 2. "Fig. Reactivity of 12 donors towards LPS E. coli 0113: H10 (0.5 EU/mL) and LTA from B. subtilis"(ICCVAM BRD Appendix B)より

- 真菌胞子によるヒト全血のIL-1 β 放出は、リポ多糖 (LPS) 阻害物質であるポリミキシンBによって抑制されないことからエンドトキシンによる反応では無いことが示され(図4-3および4-4), 一方, *E. coli* 由来のLPSはポリミキシンBによってIL-1 β 放出が抑制される. したがって, 真菌由来の非エンドトキシン・発熱性に対しても活性を有することが示された.

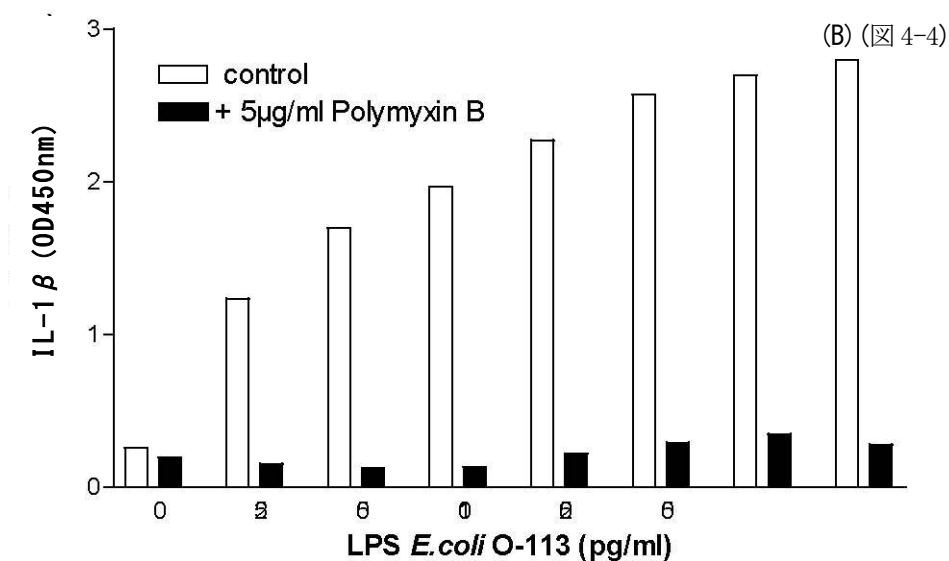
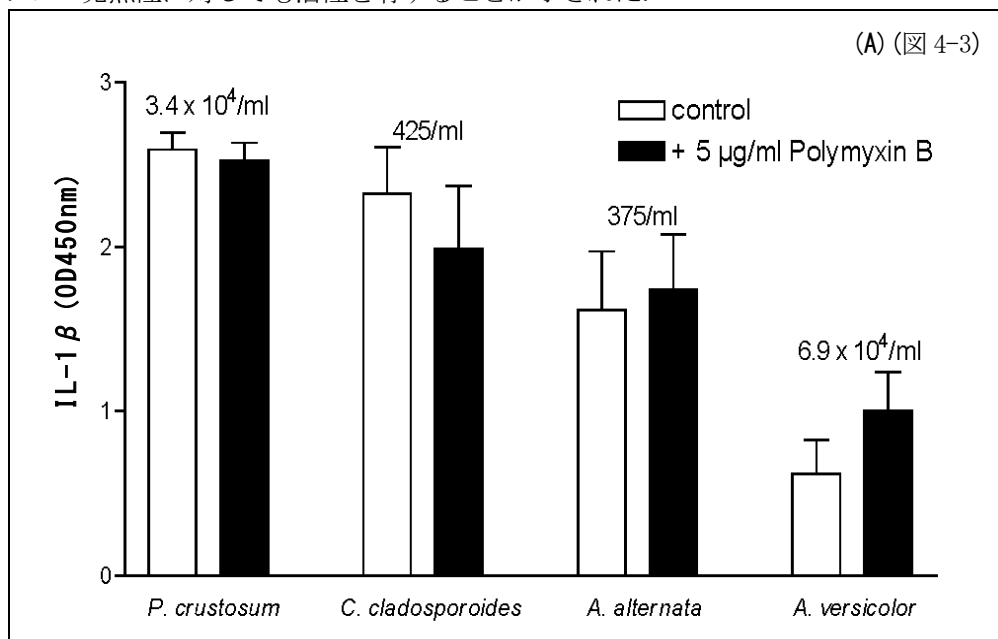


図4-3および4-4

ECVAM Response to ICCVAM Questions 2. "Figure 8: IL-1 release in human whole blood in response to fungal spores (A) is not inhibited by 5 µg/ml polymyxin B, mean of 4 donors (\pm SEM), numbers above the bars indicate the spore counts employed. In contrast (B), the response to LPS is inhibited over a wide concentration range, mean of double values." (ICCVAM BRD Appendix B) より

- 各種医療材料について, それら疑わしい物質の抽出液をウサギに移植することは, 侵襲性により発熱性汚染と関連しない反応を引き起こす可能性があり, 倫理面や科学的見地から問題があると述べている. *in vitro* PBMC試験法は抽出液が必須ではなく, 血液に直接接触させることで, エンドトキシンだけではなく全ての関連した発熱性を検出可能との報告が示された.

ECVAM Response to ICCVAM Questions 3. "Adaptation of the WB/IL-1 to biocompatible materials" (ICCVAM BRD Appendix B) より

- ・透析装置および透析液について、米国ではダイアライザーを再処理して使用している透析施設は72%あり、また、透析施設で透析液の調製に使用する純水や透析液、フィルターや透析装置内配管のデッドスペース、等による細菌の増殖に起因する腎不全患者の透析終了後の発熱が問題となり、Association for the

Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) によって1993年に処理水と透析液の従属栄養細菌に関する基準が設けられたが、1994年ドイツ、ギリシャ1998年、米国1990年、カナダ1995年の調査結果では、このAAMIの緩い基準でさえ完全に達成できていないことが示された。多数のグラム陽性菌汚染の報告もあり、透析チューブ内のバイオフィルム片を調査したところ、*in vitro* PBMC試験法では、エンドトキシン試験の20倍高い反応を示す調査結果も示された。エンドトキシンだけではなく菌体外毒素やペプチドグリカン等のサイトカイン誘導物質が透析膜を通過する可能性も指摘され、米国での1991年の調査では1年間に全透析施設の20%で複数の臨床的な発熱が報告されている。こうした慢性的に刺激を受けた患者の血液のサイトカインレベルは健常者のそれよりも高いとの報告が示された。(図表なし)

ECVAM Response to ICCVAM Questions 3. "Dialysis"(ICCVAM BRD Appendix B)より

- ・脂質製剤について、ビタミン剤やステロイド剤などの一部の製剤は非親水性の性状や筋注や皮下注等の投与経路の違いから、ウサギの静脈内に投与することが出来ず、また、エンドトキシン試験も水性試料を対象としているため試験が困難であるが、試験に対して非干渉性の油脂で希釈することにより、*in vitro* PBMC試験法の適用が可能となることが示された。(図表なし)

ECVAM Response to ICCVAM Questions 3. "Lipidic formulations"(ICCVAM BRD Appendix B)より

- ・発熱性物質の標準品について

in vitro PBMC試験法に関するECVAM BRD March, 2006 Section 2.1(ICCVAM BRD Appendix A1~A5 May 2008に収載)およびICCVAM BRD May 2008 Section 2.1によれば、発熱性物質の標準品として、WHO-LPS エンドトキシン標準品[(94/580, 0113:H10:K-)]が使用されており、エンドトキシンの由来となる大腸菌の株はU. S. Pharmacopoeia (USP) エンドトキシン標準品と同じものである。

発熱性物質の標準品としてエンドトキシンを使用した理由は、エンドトキシンが安定的に入手可能で高い検出精度を有する標準化された発熱物質であるからとされている。これは、既に広く普及しているカプトガニ血球成分から成るライセート試薬を用いたエンドトキシン試験において、このエンドトキシン標準品が使用されているからであるが、この選択理由は妥当と考える。ここで、エンドトキシン標準品の表示単位がエンドトキシン試験で得られた値であることに留意する必要があるが、過去に得られたウサギの結果でエンドトキシン投与量と体温上昇の直線性が確認され、ここで得られた発熱閾値を利用して、*in vitro* PBMC試験法は「ヒトに発熱性」または「ヒトに非発熱性」を判定している(ECVAM BRD March, 2006 Section 2.2.13)ことから、エンドトキシン試験という異なる尺度での表示単位で表された標準品を使用しても問題ないと考える。

- ・考察

in vitro PBMC試験法で、過去の文献により非エンドトキシン性発熱性の検出が確認されている。よって、この試験法は他の発熱機序によるものは別として、ヒトに特異的な発熱物質の検出法の一つとして有用であると思われる。ただし、原料や製造工程でエンドトキシン以外の発熱物質の汚染が考えられない場合には、エンドトキシン試験で代替可能と思われることから、現在、ウサギを用いて発熱性物質試験を行っている試験対象について、発熱性物質の検出の全てを*in vitro* PBMC試験法に代替を集約するのではなく、何らかの理由からエンドトキシン試験が適用できず、ウサギによる試験でしか発熱性物質の検出が可能な試料にのみ、この*in vitro* PBMC試験法を適用すべきと考える。

5. 他の科学的な報告

In vitro 発熱性物質試験に関してヒト末梢血由来細胞などを用いた IL-1 β , IL-6 測定系以外にもウサギ発熱性物質試験の代替として可能性のある試験法が提案されている。例を挙げると、末梢血前血を用いた IL-8 産生能に基づいた試験法は IL-1 β , IL-6 より感受性が高いとされ、多くの発熱性の受容体である Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) の強制発現細胞株などはその特異性は非常に高いことが知られている。(例: Journal of Immunological Methods 336 (2008)45-55)

また、発熱、もしくはそれに類する毒性のバイオマーカーとして多様な評価系が提案、もしくは開発研究を開始している。そのなかでも、Embryonic Stem (ES) 細胞や人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cells : iPS) 細胞を利用した毒性試験やトキシコパノミクス (トランスクリプト

ーム、プロテオーム、メタボロームを含めた網羅的な毒性解析)を利用した毒性試験などは *in vitro* と *in vivo* 試験それぞれの利点、欠点を補うものとしてその迅速な開発が期待されている。

6. 3Rs への関与

ヒト血液を用いるあるいは細胞を用いる試験法は、動物を用いた発熱性物質試験に置き換わる方法として動物福祉面で貢献するものである。

7. 本試験法の有用性と限界

in vitro PBMC 試験法のような人の白血球や細胞株によるサイトカインの産生量計測に基づく試験はウサギや人の発熱の誘導に相関はしているといえよう。しかしながら、ICCVAM の報告書にあるように、(ICCVAM (1.2.3)) 「ウサギ発熱性物質試験は(多様な原因、メカニズムに基づいて誘導される全身の発熱を検出するものであるが、本代替法は培養細胞の1-2種類のサイトカインを計量しているに過ぎない。)現時点で、IL-1 β およびIL-6が全身の発熱反応に必須であるという科学的根拠が欠落している。」とあり、「少なくともヒトの発熱反応とヒト由来細胞の培養におけるIL-1 β 、IL-6の産生との相関に関する情報をさらに追加する必要がある。特に異なる内毒素(エンドトキシン)に対する反応の仕方の違い等に留意する必要がある」と述べており、本代替法には科学的根拠が少ない、もしくは十分でないとの認識が強い。

ICCVAM の報告書でも述べられているが、ウサギ発熱性物質試験と *in vitro* PBMC 試験法の相関性に加え、他の類似点、相違点に関し多くの文献にて精査されていることも事実である。なかでも報告書が目し言及している点として、それらの文献の多くが、ウサギ発熱性物質試験の結果はヒトの発熱反応とよく相関している事実を再確認したことになっている点や、*in vitro* PBMC 試験法のウサギ発熱性物質試験との相関を示唆するデータはすべてグラム陰性細菌由来のエンドトキシンのみを引用していることがあげられる。言い換えれば代替法である *in vitro* PBMC 試験法があまりにかけ離れていてウサギ発熱性物質試験の「代替法」と定義、解釈することに無理があると思われる。

in vitro PBMC 試験法が開発された時点、ECCVAM の報告書、さらには ICCVAM の報告がなされた後も、自然免疫研究成果が新たに集積している。しかしながら、そのような最新の知識をもってしても、IL-1 β 、IL-6の本代替法はおろか、ウサギ発熱性物質試験においても、どのような「発熱性」があることが知られていて、それらがどのような細胞の受容体、シグナル伝達経路、遺伝子発現制御、転写後制御、細胞間相互作用などを介して、全身の「発熱」という計測可能なパラメーターに影響を及ぼしているか、科学的に見て明らかになったとは到底言い難い。ただし、上記の一部、たとえばエンドトキシンの自然免疫受容体、シグナル経路などは明らかになってきており、本代替法を上回る感受性、特異性をもった検出方法も知られるようになった(上記参照)。

ECCVAM、ICCVAM の報告は発表された時点で、その効力が及ぶ地域の文化的な背景に基づけば、ある程度妥当な意見が述べられている。しかし科学的な観点、および倫理的な観点から鑑みた場合、また、時間的な経過による影響も加味した上で、(必ずしも *in vitro* 発熱性物質試験の必要性があると断定はせずに)新たな発熱性テストの開発の可能性と、現行のテストの限界を独自に議論する必要があると考えられる。

8. 結論

上記の各考察より、今回提案された *in vitro* PBMC 試験法は、ウサギの使用数を削減可能とし、また、作用機序に立脚した発熱性物質試験の新たな方向性として評価でき、さらに、バリデーションでのデータの扱いに関しても納得のできる基準を満たしていると考えられる。しかし、ウサギを用いた発熱性物質試験との互換性については不明な点が多く、この試験法の代替法とするには、問題がある。国内ではウサギ発熱性物質試験からエンドトキシン試験への移行の問題も残されており、これに優先して独立した代替法とすることには無理がある。しかしながら、エンドトキシン試験が使用できないような特殊な状況やウサギとヒトでの発熱性に関する種差が想定されるような状況においてウサギ発熱性物質試験と併用するなど、限定的な使用については推奨できよう。このような *in vitro* PBMC 試験法が科学的根拠に基づいた研究により、さらに広範囲な状況で使用可能となることが望まれる。

エンドトキシン試験と発熱性物質試験に関する実態調査結果報告

日本薬局方に収載されているカプトガニ血球抽出物を用いたエンドトキシン試験法とウサギを用いた発熱性物質試験法、および *in vitro* 発熱性物質試験について、2009年1月に日本製薬工業協会の協力を得て「エンドトキシン試験と発熱性物質試験に関する現状調査のためのアンケート」と題した実態調査を行い36社(1社につき複数事業所含む)の回答を得たので、この調査結果を基に報告する。

一般にエンドトキシン試験での反応干渉因子には、ライセート試薬とエンドトキシンの一連の酵素活性化反応を阻害するものとして、酵素活性阻害剤、タンパク変性剤、キレート剤などがある。また、エンドトキシンに作用して反応を阻害するものとして、界面活性剤や、鉄、アルミニウムなどの金属イオンがある。一方、ライセート試薬とエンドトキシンの一連の酵素活性化反応を促進させるものとして、セリンプロテアーゼなどが挙げられる。その他に試料溶液の濁りや着色は光学的測定法に影響を及ぼすと言われている。また、リポソーム製剤なども反応を阻害する要因となる。実態調査の結果では、これらのエンドトキシン試験での反応干渉因子であっても、未確認の事例を除いて発熱性物質試験は実施可能であった。

日局発熱性物質試験の反応干渉因子として考えられるものは、製剤そのものが発熱または体温下降を起こす場合が考えられる。実態調査においてこのような反応干渉の報告があった3例は、未確認の事例を除いてエンドトキシン試験は実施可能であった。

In vitro 発熱性物質試験について、36社中に試験の実施経験を有する回答は無く、実例による反応干渉因子の報告は得られなかった。

実態調査で今回の評価に際して自由記入の形式で意見を募ったところ、多くの意見が寄せられた。まず、発熱性物質試験については、感度その他の問題や動物愛護の観点から、エンドトキシン試験を含めた何らかの代替法に切り替えたいという意見が多かった。

ただし、今回のヒト血液を用いる *in vitro* 発熱性物質試験 (*in vitro* PBMC 試験法) では、ヒト血液の入手方法やバイオハザードの問題、反応阻害や促進等の反応干渉因子試験の必要性を指摘する意見があった。

日本薬局方では発熱性物質試験法よりもエンドトキシン試験法を優先する規定があり、発熱性物質試験についてはエンドトキシン試験の適用が困難な品目に限り設定することとなっている。実際に新規製造品目の試験規格設定時ではこの規定が適用されており、実態調査においても最終製品での実施例について発熱性物質試験よりもエンドトキシン試験の実施頻度が高い結果となっている。しかし、日本薬局方でエンドトキシン試験が優先する規定が出来る以前は、容量10mLを超える注射剤には発熱性物質試験を適用する規定があったことから、この時期に製造(販売)承認を得た注射剤では発熱性物質試験が適用されているものが現在でも多く存在すると考えられる。これらの発熱性物質試験が適用された既承認医薬品に対して、原料や直接容器等にエンドトキシン以外の発熱性が存在する可能性がある品目やエンドトキシン試験が困難な品目を除き、現行の日本薬局方に則ってエンドトキシン試験への変更を促進することは理にかなうものと考えられる。しかし、これら発熱性物質試験が既に設定された既承認医薬品では、発熱性物質試験をエンドトキシン試験に変更するためには、変更申請時にウサギに大量のエンドトキシンを投与して得られる発熱データの提出を求められ、ウサギの個体差による感度のバラつきや動物愛護の観点等の問題で、エンドトキシン試験へ変更する際の障害となる場合もある。

エンドトキシン以外の発熱性が存在する可能性がある品目やエンドトキシン試験が困難な品目について、現状ではウサギを用いた発熱性物質試験しか方法が無い代替法の確立を望む意見が多く見受けられた。

現在行われている発熱性物質試験のすべてを今回のヒト血液を用いた代替法に切り替えるのではなく、エンドトキシン試験で代替可能なものはエンドトキシン試験に変更することが妥当と考えられ、実態調査における最終製品でのウサギ使用数内訳から見ても、エンドトキシン試験への変更だけでも相当数の発熱性物質試験に使用するウサギを減少させることが可能と考える。

エンドトキシン試験と発熱性物質試験に関する実態調査結果

2009年1月調査実施

*回答企業 36社の形態：

国内企業(本調査に該当する海外向け製品あり) : 10社
 国内企業(本調査に該当する海外向け製品なし) : 17社
 海外企業(米国系) : 4社
 海外企業(欧州系) : 5社

*日局エンドトキシン試験および日局発熱性物質試験の実施経験について

36社中(複数事業所を有する企業を含む)

エンドトキシン試験の実施経験あり : 32社
 エンドトキシン試験の実施経験なし : 4社
 発熱性物質試験の実施経験あり : 24社
 発熱性物質試験の実施経験なし : 12社

内訳：両試験共に経験あり : 24社
 エンドトキシン試験のみ経験あり : 8社
 発熱性物質試験のみ経験あり : 0社
 両試験共に経験なし : 4社

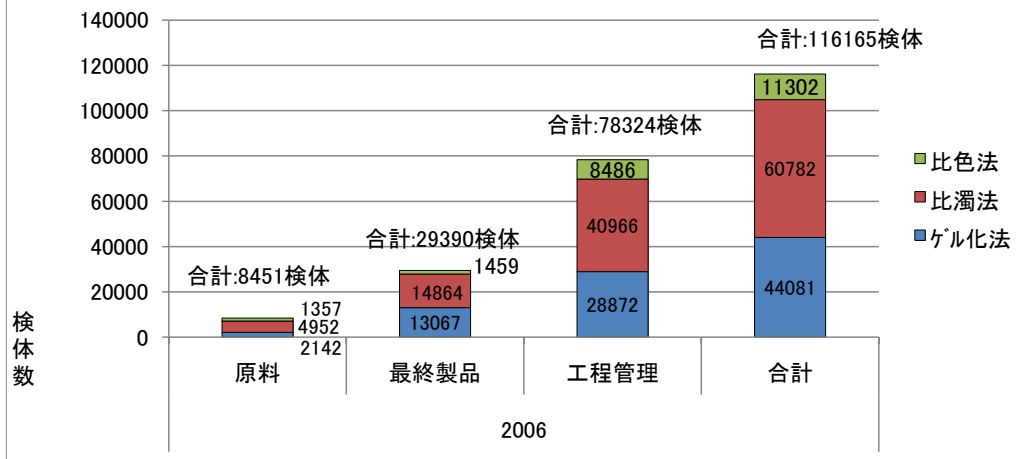
*日局エンドトキシン試験検体数内訳

36社集計		ゲル化法	比濁法	比色法	合計
2006年	原料	2142	4952	1357	8451
	最終製品	13067	14864	1459	29390
	製造工程管理	28872	40966	8486	78324
	合計	44081	60782	11302	116165
2007年	原料	3024	5912	1244	10180
	最終製品	14465	14536	1635	30636
	製造工程管理	34105	54875	8428	97408
	合計	51594	75323	11307	138224
2008年	原料	3285	5821	1189	10295
	最終製品	14461	13745	1936	30142
	製造工程管理	29408	44310	9351	83069
	合計	47154	63876	12476	123506

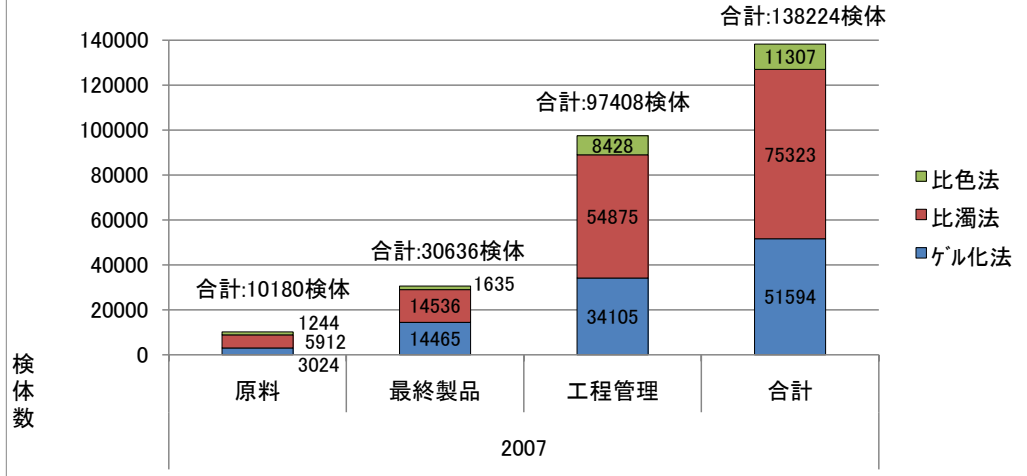
*日局発熱性物質試験検体数内訳

36社集計		検体数	ウサギ使用数(羽)
2006年	ゴム栓	561	1435
	原料	615	1570
	最終製品	2519	5715
	合計	3695	8720
2007年	ゴム栓	537	1356
	原料	495	1406
	最終製品	2618	6107
	合計	3650	8869
2008年	ゴム栓	608	1527
	原料	580	1442
	最終製品	2483	7293
	合計	3671	10262

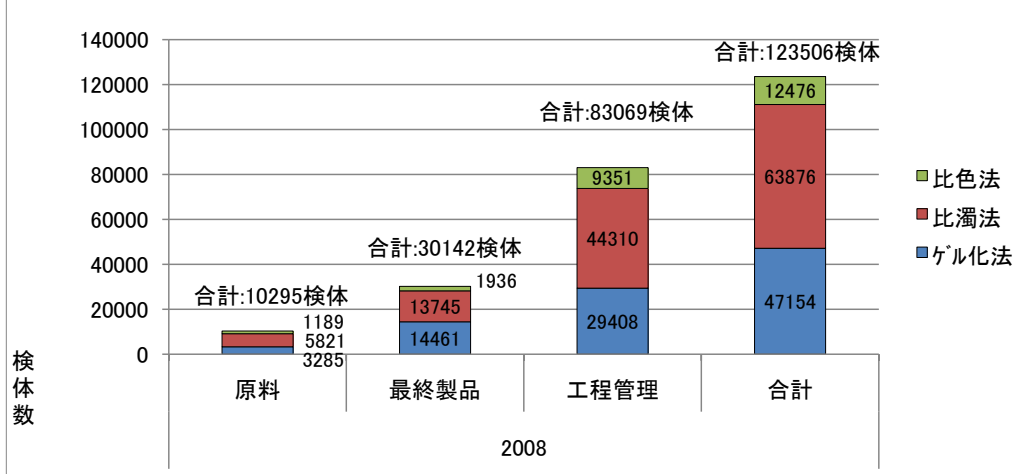
2006年 エンドトキシン試験検体数 32社集計



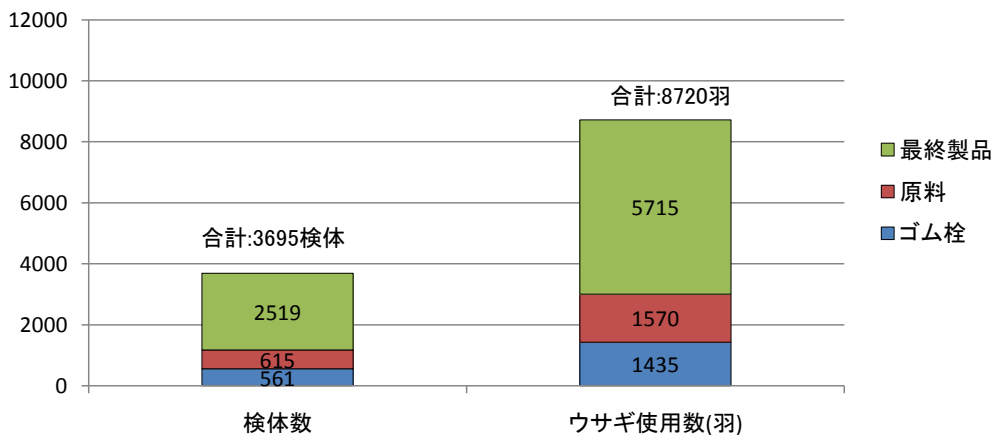
2007年 エンドトキシン試験検体数 32社集計



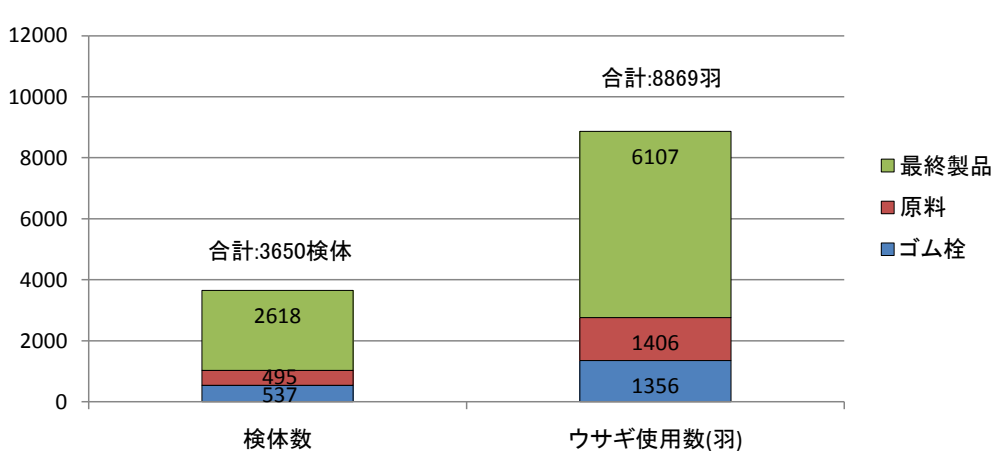
2008年 エンドトキシン試験検体数 32社集計



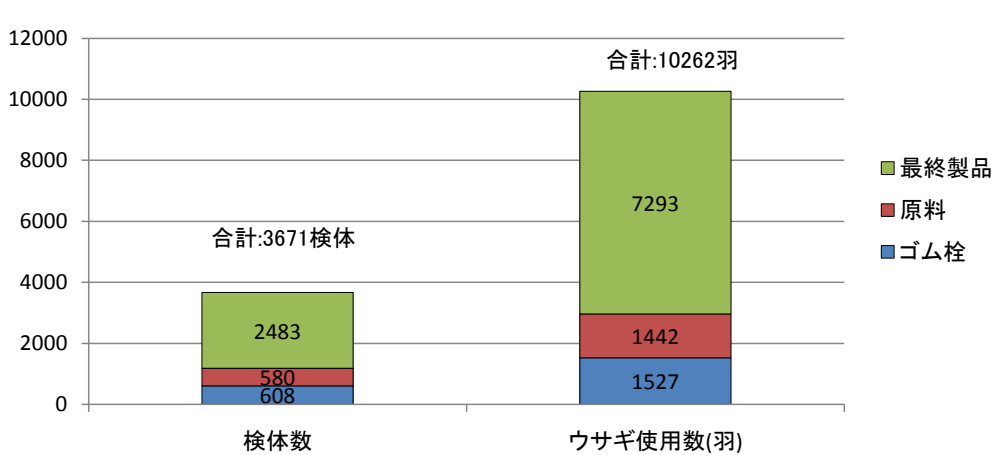
2006年 発熱性物質試験検体数 24社集計

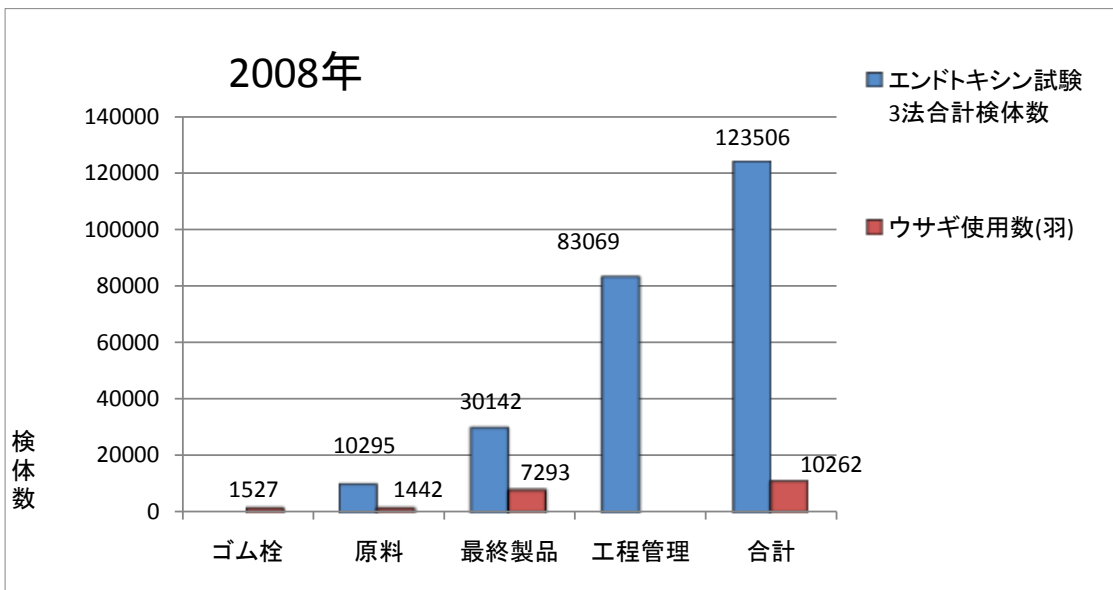
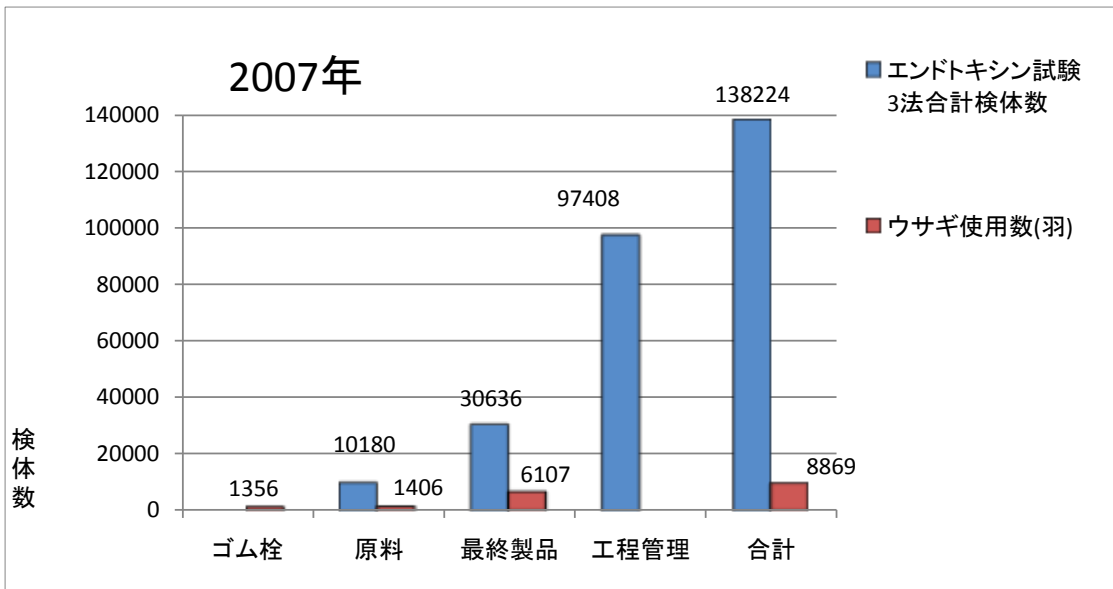
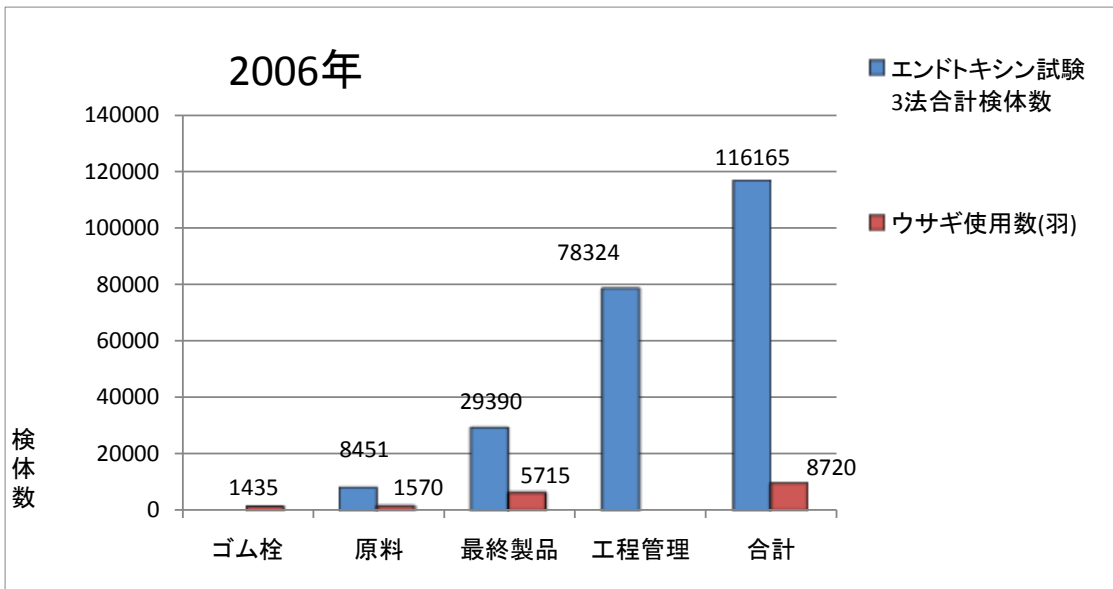


2007年 発熱性物質試験検体数 24社集計



2008年 発熱性物質試験検体数 24社集計





*日局エンドトキシン試験の実施が不可能であった事例について
 経験あり：8社
 経験なし：24社

*日局エンドトキシン試験の実施が不可能であった事例の内訳

事例	要因	薬効分類等	事例を確認した試験法	日局発熱性物質試験法の適用可否
反応阻害	アルミニウムゲルのため	(非公開)	比色法	不明
反応阻害	リポソームのため	(非公開)	ゲル化法	試験可能
反応阻害	原薬の酵素阻害作用のため	蛋白分解酵素阻害剤	ゲル化法 比濁法	試験可能
反応阻害	エマルジョン製剤であり、水層と油層の分離が困難	中枢神経系用薬	ゲル化法	試験可能
反応阻害	原薬の酵素阻害作用のため	蛋白分解酵素阻害剤	ゲル化法 比濁法 比色法	試験可能
反応阻害	リポソームのため	(非公開)	ゲル化法 比濁法 比色法	試験可能
反応促進	タンパクのため	血漿分画製剤	ゲル化法	試験可能
反応阻害	リポソームのため	抗生物質製剤	不明	試験可能

*日局発熱性物質試験の実施が不可能であった事例について
 経験あり：3社
 経験なし：21社

*日局発熱性物質試験の実施が不可能であった事例の内訳

事例	薬効分類等	日局エンドトキシン試験法の適用可否
発熱作用あり	制癌剤	試験可能
ウイルスの性状に起因した発熱作用	生物学的製剤	試験可能
抗発熱作用(阻害)	アミノ酸	不明

*in vitro 発熱性物質試験(エンドトキシン試験以外)の実施経験について
 経験あり：0社
 経験なし：36社

*エンドトキシン試験，発熱性物質試験，in vitro 発熱性物質試験についての意見
 意見あり：17社
 意見なし：19社

*エンドトキシン試験，発熱性物質試験，in vitro 発熱性物質試験についての意見

- ・ウサギを使った眼刺激性試験と同様、可能であれば *in vitro* 試験に変更すべき。
- ・局方で発熱性物質試験を規定されていない限りは、(新たな開発品に対して)発熱性物質試験規格は設定せず、エンドトキシン試験規格を設定する方針。
- ・実施経験がないが、今後必要となった場合には *in vitro* 試験での評価系が確立されていれば有用と考える。
- ・*in vitro* 発熱性物質試験について検討を考えたい。具体的な手順等を教えて頂ければありがたい。
- ・輸液用ゴム栓以外の発熱性評価は、エンドトキシン試験で十分評価できると考える。
また、動物愛護の観点から動物の使用を削減し代替法の導入が推奨されている。従って、輸液用ゴム栓以外の発熱性物質試験は必要ないと考え。
- ・発熱性物質試験はゴム栓で外部へ試験委託を行ってきたが、ここ3年間には行ってない。
- ・日局一般試験法、輸液用ゴム栓試験法および医薬品各条の一部に規定されている発熱性物質試験について、エンドトキシン試験への置き換えを要望する。
- ・今回の趣旨とは異なるが、日・EU相互承認協定(MRA)締結内容に早期の無菌医薬品および生物学的製剤の追加を望む。
- ・動物愛護と試験の効率化の観点から、発熱性物質試験からエンドトキシン試験への変更や、新規品目については開発当初からエンドトキシン試験を設定する事例が多いと考える。エンドトキシンは最も強力な発熱性物質に相違ないが、エンドトキシン試験では検出できない発熱性物質の存在を否定するために、エンドトキシン試験導入前に、発熱性物質試験においても問題ない結果が得られることを確認しておくことは重要と考える。
- ・発熱性物質試験の早期国際調和(EP, USP, JP)を希望する。
- ・エンドトキシン試験は、エンドトキシン以外の発熱性物質を検出できない課題がある一方、発熱性物質試験は感度が低く、動物愛護の面での問題も多い。よって、*in vitro* 発熱性物質試験が、将来にこれらの問題を解決する有力な手段であるならば、業界として積極的に導入することを期待する。
- ・発熱性物質試験について、当施設では、日局準拠ではないが、ほぼ同等の手順による「医療機器の生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について(事務連絡 医療機器審査 No. 36)」に基づき、医療機器の中間・最終製品もしくは原料・部材の安全性を評価する目的でウサギを用いた発熱性物質試験を実施している。医療機器の安全性評価の一環として実施する発熱性物質試験は、医療機器または原材料から抽出した抽出液中に、エンドトキシンおよび非エンドトキシン性発熱性物質が存在しないことを確認することを目的としており、特に、ウサギを用いた試験は化学物質等による「非エンドトキシン性発熱性物質」を検出する方法として、医療機器の承認・認証申請において審査当局から試験実施が規定されている。現在、公知の代替方法がないために、当施設では医療機器の安全性評価においてウサギを使用しており、動物愛護の面からも *in vitro* 発熱性物質試験のような動物を使用しない代替方法が受け入れられ、選択肢の1つとして拡充することに期待する。
- ・エンドトキシン試験は、比濁時間分析法で定量的にエンドトキシン濃度が判明するので、工程におけるエンドトキシン汚染の迅速管理に有効であることと、動物愛護的観点と動物飼育経費の削減に寄与してきた。また、発熱性物質試験は発熱増強活性^{*1}がない製剤に関しては、エンドトキシン試験に移行している。

(^{*1}:発熱性物質試験を実施したとき、製剤に0.5 EU/mLになるようにエンドトキシンを加えた液が、生理食塩液に0.5 EU/mLになるようにエンドトキシンを加えた対照液に比べて有意に発熱性を認めた場合、発熱増強活性があるものと判断。)

in vitro 発熱性物質試験の話題に変えると、ヒト単球を用いていることから、糖濃度が高いと、末梢血単球からのインターロイキン8(好中球、Tリンパ球に選択時に働く走化性因子である)の分泌が低下し、白血球の遊走能が低下することが知られている。このことから、製剤の成分が単球のサイトカインの分泌制御に影響し、*in vitro* 発熱性物質試験にも反応阻害などに対する反応干渉因子試験は必要なものと考え。

また、*in vitro* 発熱性物質試験は、生きた単球の安定供給、バイオハザード的観点にも問題があり、工程管理のためのエンドトキシン試験も含めてすべての試験を *in vitro* 発熱性物質試験に切り替えるのは疑問である。

医療用具および医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドラインに記載されている発熱性物質試験は、医療用具又は医用材料から抽出した抽出液中に、材料に由来するエンドトキシン以外の発熱性物質が存在しないことを確認する試験と記載されている。(エンドトキシンを確認するには、エンドトキシン試験が別途必要)。この観点からすると、医療機器の発熱性物質試験をエンドトキシン試験に置き換えるには、生産している製品材料に文献的に既知の発熱性化学物質(例えば、ゴムの老化防

止剤 n-phenyl- β -naphthylamine, aldol- α -naphthylamine (現在は使用禁止)などが含まれないことを確認して、試験法をエンドトキシン試験法に変更していく必要があると考える。よって、*in vitro* 発熱性物質試験が化学物質の発熱性を確認する手段となれば、医療用具の(材料に由来するエンドトキシン以外の発熱性物質が存在しないことの確認を目的とした)発熱性物質試験の有効な代替法になるものと考えます。

- 有限かつ高価な天然物試薬であるライセート試薬の低減化として、日局規定の各種試験の試験回数規定を試験の信頼性を欠くことなく最小限での試験を認めて欲しい。

(例えば)

(ゲル化法予備試験のライセート試薬の表示感度試験)

エンドトキシン標準原液を現行4濃度から3濃度以上とし、繰返し4回を3回以上とする。

(ゲル化法予備試験の反応干渉因子試験)

添加エンドトキシン濃度を現行4濃度から3濃度以上とし、繰返し回数を現行2および4回をすべて2回以上とする。

(ゲル化法限度試験法) エンドトキシン無添加の陰性試験を現行2回から1回以上とする。

(ゲル化法定量試験法)

現行エンドトキシン希釈倍数を4条件から3条件以上とする。エンドトキシン無添加の陰性試験を現行2回から1回以上とする。

(比濁法の予備試験の反応干渉因子試験)

エンドトキシン添加濃度を現行3濃度から2濃度以上とする。

- 日局では発熱性物質試験よりもエンドトキシン試験が優先される規定になっているが、このような規定が出来る以前に製造販売承認を取得した注射剤には、未だに発熱性物質試験が設定された製品が多い。一般の注射剤等で考えられる微生物汚染は、製造工程での水棲菌(主にグラム陰性菌)によるものが殆どと考えられるため、原料等がエンドトキシン以外の発熱性物質で汚染される可能性があるもの以外は、速やかにエンドトキシン試験へ変更できるよう(変更申請時に必要とされるデータの簡略化を)考慮すべきと考える。発熱性物質試験も動物を使用しない方法が良いと思うが、日常試験として実施するには、今回のようなヒト血液を用いる方法では、その入手方法やバイオハザード対策等で不安がある。動物を使用せずに代替するのであれば、輸液用ゴム栓などでは(輸液用プラスチック容器試験法からプラスチック製医薬品容器試験法への改正時のように)発熱だけに絞ったものでなく、既に日局にも収載されている細胞毒性試験などで代替することは出来ないか。
- 発熱性物質試験からエンドトキシン試験へ試験法を代替する場合に過剰な実験動物データを必要とされるため代替が困難である。現在検討されている *in vitro* 発熱性物質試験には、どのようなものがあるかご教示ください。
- ライセート試薬を使用しているが、高価な試薬なので安価になれば良いと思う。比濁法で実施しているが、試験管も使い捨てのため Reuse できる洗浄方法などがあれば良いと思う。
- 輸液用ゴム栓試験での発熱性物質試験はエンドトキシン試験への代替が可能なのか？

以上