

1 単球活性化試験による発熱性物質試験法の代替法〈G4-13-190〉

1. はじめに

発熱性物質試験法〈4.04〉は、発熱性物質の存在をウサギを用いて試験する方法であるが、動物福祉の観点から、その代替法として単球活性化試験(Monocyte Activation Test : MAT)が開発された。単球活性化試験はグラム陰性菌由来のエンドトキシンのほか、非エンドトキシン汚染因子として、グラム陽性菌、グラム陰性菌、ウイルス及び真菌に由来する病原体関連分子パターン(Pathogen-Associated Molecular Patterns : PAMPs)並びに医薬品の製造過程に起因する生物学的及び化学的汚染因子を検出する。

本参考情報では、単球活性化試験を発熱性物質試験法の代替法とする際の留意点について述べる。

2. 単球活性化試験の概要

単球活性化試験は、ヒトの単球や単球系細胞を活性化して腫瘍壊死因子 α (TNF- α)やインターロイキン- 1β 、インターロイキン-6などの炎症性サイトカインなど内因性物質の産生を誘導する物質を検出又は定量する方法である。これらの物質が発熱機序に関与しているため、単球活性化試験は間接的に試料中の発熱性物質を検出することになる。

非エンドトキシン汚染因子は多様で、通常は試料溶液の汚染因子の同定は困難であるため、汚染因子のレベルはエンドトキシン標準品に対する反応との比較若しくは試料溶液の基準ロットに対する反応との比較のいずれかにより相当するエンドトキシンの量(エンドトキシン単位 : EU)で表記される。

発熱・炎症応答を惹起する非エンドトキシン汚染因子を含む医薬品は、エンドトキシンの用量反応曲線と比較して急勾配の用量反応曲線を示すことがある。そのため、非エンドトキシン汚染因子を含む又は含んでいる可能性のある製剤は、最小希釈倍率を含む複数の希釈倍率で試験を行う必要がある。また、本試験は発熱性物質の汚染を回避する方法で行う。

3. 基本手法

試料溶液を、ヒトの単球又は単球系細胞を含む材料(例えば末梢血単核細胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells : PBMC)、単球系細胞株、又は同等性が示された細胞株)を試料と共に培養する。選択した測定指標が適切に評価可能な期間を培養時間とする。試料溶液について選択した測定指標の試験結果を、エンドトキシン標準品又は試料溶液の基準ロットに関する測定指標の試験結果と比較する。

4. 器具

全てのガラス製品及びその他の耐熱性器具を、検証された方法を用いて乾熱処理を行い、発熱性物質を除去又は不活化する。マルチウエルプレートやマイクロピペット用チップなどのプラスチック製器具を使用する場合は、発熱性物質による汚染がなく試験に干渉しないことが確認されたものを使用する。

5. 使用する細胞

5.1. 全血

5.3., 5.4., 5.5.及び該当する場合は6.3.に記載する条件を満たす単一の提供者に由来する全血又は複数の提供者に由来する全血を使用する。

5.2. 末梢血単核細胞(PBMC)

PBMCは、5.3., 5.4., 5.5.及び該当する場合は6.3.に記載する条件を満たす単一の提供者又は複数の提供者に由来する全血から分離する。

5.3. 血液提供者の条件

血液提供者は健康、安全性、倫理的懸念に関連する条件を満たす者でなければならない。

5.4. 複数の提供者に由来する細胞の条件

複数の提供者に由来する全血を使用する場合は6.3.に記載するように非エンドトキシン汚染因子を検出することを確認する。

5.5. 冷凍保存細胞の条件

単球活性化試験での使用を意図した細胞(ヒト全血、PBMCなどの血液分画物や単球系細胞株)を冷凍保存することも可能である。複数の提供者に由来する冷凍保存細胞は、冷凍前に調製するか、若しくは冷凍保存していた単一血液を解凍直後に混和するなどによって調製する。エンドトキシンに対する用量反応曲線を6.1.に従って確認する。また、非エンドトキシン汚染因子検出を目的とする場合には、6.3.に従って検証する。

5.6. 単球系細胞株

単球系細胞株は、以下の要件が確認されればエンドトキシン及び非エンドトキシン汚染因子の検出に適している。

単球活性化試験に十分供給できるだけのヒト単球系細胞株を培養する。供給手段を最適化するためにクローン化された細胞株を使用する場合もある。

細胞は無菌条件下で管理し、定期的にマイコプラズマなどの汚染の有無を確認する。さらに細胞の特性(倍加時間、形態、機能など)を定期的に確認する。細胞株の機能的安定性は継代数に応じて細胞の特性のモニタリングを行うことで評価する。機能的安定性の基準を確立する必要がある。これには増殖性や試験で得られる最大シグナル、背景ノイズ、受容体シグナル伝達が含まれる場合がある。受容体シグナル伝達は、パターン認識受容体(例えばToll様受容体)に対する特定のリガンド(特定の受容体と特異的に結合して生物学的応答を引き起こす物質)で試験することができる。

エンドトキシンに対する用量反応曲線を6.1.に従って確認する。また、非エンドトキシン汚染因子検出を目的とする場合には、6.3.に従って検証する。

なお、測定指標に炎症性サイトカインの発現に関わる転写因子などを用いる場合は、非エンドトキシン汚染因子検出の妥当性を示す必要がある。

6. 測定上の留意点

試験の妥当性を検証するため予備試験を実施する。この予備試験において、6.1.に記載するエンドトキシン標準曲線の条件が満たされており、試料溶液が試験に干渉せず、試験でエンドトキシン及び非エンドトキシン汚染因子が検出され、溶液が検出システムに干渉しないことを確認する。

試験結果に影響するおそれのある試験条件の変更がある場合はその都度予備試験が必要となる。

6.1. エンドトキシン標準曲線の保証

エンドトキシン標準溶液を用いて、標準曲線を作成するために少なくとも四つのエンドトキシン濃度を調製する。エンドトキシン標準溶液の各濃度を少なくとも $n=4$ で試験する。

ブランク(エンドトキシン標準溶液の添加がない条件)の測定値は可能な限り低くすることが望ましい。

標準曲線については統計的に適切な手法によって有効性を保証する。

6.2. 干渉因子の検証

試験の妥当性を検証するため予備試験を実施し、試料が試験に干渉しないことを確認する。適切な希釈溶媒を用いて試料を段階希釈するが、全ての希釈が最大有効希釈倍数(試料中に存在する反応干渉因子の影響を希釈によって回避できるとき、許容される試料の最大の希釈倍数)を超えないようにする。試料溶液及びエンドトキシン標準品を適切な濃度で添加した試料溶液を使用し、エンドトキシン標準曲線を用いて各溶液中のエンドトキシン濃度に相当する発熱性物質濃度を算出する。エンドトキシン添加試料溶液で検出された発熱性物質濃度から、エンドトキシン無添加試料溶液で検出された発熱性物質の平均濃度を減じて、エンドトキシン添加試料溶液中のエンドトキシン濃度を算出した後、添加したエンドトキシンの平均回収率を算出する。平均回収率が50～200%の場合、試料には干渉因子がないものとみなされる。

6.3. 非エンドトキシン汚染因子に関する検証

予備試験では選択した試験系がエンドトキシンの他に非エンドトキシン汚染因子を検出することを確認する。確認の際は、非エンドトキシン汚染因子によって汚染されており、発熱性物質試験法(4.04)にて陽性と判定された、あるいはヒトにおいて有害反応を生じさせたことが明らかになっている過去のバッチを用いて行うことが可能である。そのようなバッチが入手不可能な場合、予備試験では、二つ以上のパターン認識受容体(例えばToll様受容体)に対する特定のリガンドを用いて試験系を検証する。添加した非エンドトキシン汚染因子の回収率が50～200%の場合、試料溶液には干渉因子がないものとみなされる。ただし、非エンドトキシンに対するリガンドと試料の間に相乗効果が認められる場合、回収率が50%以上であれば十分であり、200%を越えてもよい。検証に使用する非エンドトキシン発熱性物質の選択は、試料溶液に含まれている可能性の高い汚染因子を反映するものとする。試験系は少なくともToll様受容体4と他の二つのToll様受容体のリガンドが検出されることを確認する必要がある。

6.4. 検出システムにおける干渉

試料溶液の最適な希釈倍数を確認後、選択した測定指標の検出システム(酵素免疫測定法など)の干渉について検証する。

7. 試験法

以下に示す二つの方法がある。予備試験後に実施する。

方法1：半定量試験

方法2：参照ロット比較試験

方法1では、試験される試料溶液とエンドトキシン標準溶液の標準曲線との比較が行われる。予備試験と同様に、試験ごとにエンドトキシン標準曲線を作成し、反応干渉因子の影響を確認する。方法2では、試料溶液が最大有効希釈倍数を超えない範囲では反応干渉因子の影響を回避できない場合や、非エンドトキシン汚染因子が含まれていると考えられる場合に、試験される試料溶液と検証済み参照ロット(臨床試験などを通じて安全性及び有効性が検証済の製剤)との比較が行われる。いずれの方法も試験ごとにエンドトキシン標準品を用いた陽性対照と適切な陰性対照を置き、具体的な手順及び判定については妥当性が検証された単球活性化試験の方法に従う。

8. 参考資料

1) European Pharmacopoeia Supplement 11.5 (2023) 2.6.30. Monocyte-activation test.

2) European Pharmacopoeia Supplement 11.5 (2023) 2.6.40. Monocyte-activation test for vaccines containing inherently pyrogenic components.