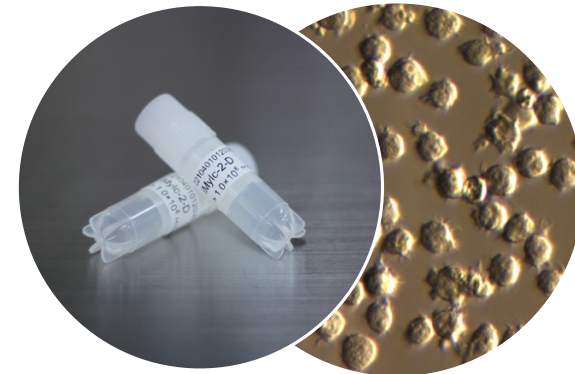


[Animal source]



[Alternative source]



安全性“試験”の新スタンダード ～動物実験代替への取組み～

マイキャン・テクノロジーズ株式会社
Founder & CEO
Kazuo Miyazaki

本日の内容：

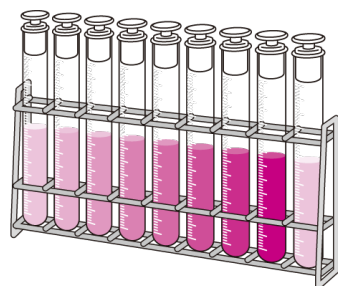
- 1) 発熱性物質とは
- 2) 発熱性物質試験とは
- 3) MAT試験を含む局方改正の動きについて（欧州・国内）
- 4) MAT製品の種類について
- 5) MylcMAT細胞について
- 6) MAT試験方法について（MylcMATを事例に）

- 7) Q&A

発熱性物質とは

ヒトまたは動物に対して発熱反応を生じさせる物質

微量でもマクロファージや樹状細胞などの免疫細胞に作用し、生体反応を引き起こす



発熱性物質

大きく分けて2種類

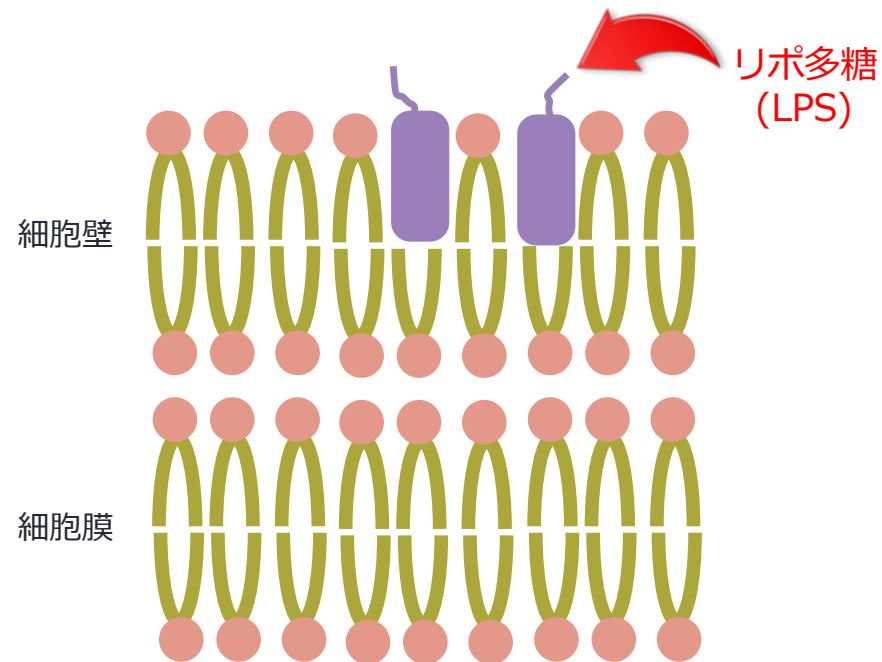
エンドトシキン

非エンドトシキン

注射剤、医療機器、再生医療製品、バイオ医薬品製品、透析用剤などの出荷前には
発熱性物質の混入が検出しないことチェックが必須

発熱性物質の種類 1. : エンドトキシンとは

グラム陰性菌 (大腸菌、赤痢菌、サルモネラなど)が持つ毒素



毒素となる部分は共通で細胞壁の成分、細菌表面の毛のようなリポ多糖体 (LPS)

発熱性物質の種類 2. : 非エンドトキシンとは

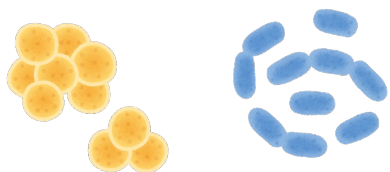
非エンドトキシン (Non-Endotoxin Pyrogen, NEP)

グラム陽性菌

黄色ブドウ球菌

乳酸菌

結核菌 など



真菌など

酵母

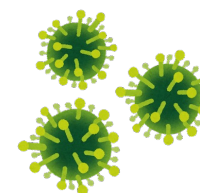
カビ など



ウイルス

DNA ウイルス

RNA ウイルス



エンドトキシン（グラム陰性菌）以外の、発熱性物質として様々なものがある。

発熱性物質の混在の影響

例:

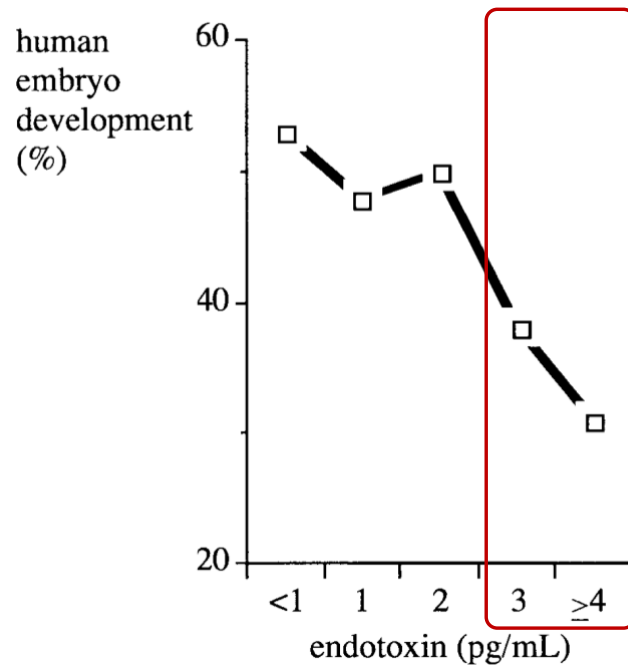


図1. 培養液エンドトキシン濃度とヒト胚盤胞発生率⁵⁾
胚移植後の余剰胚211個を5日間培養し、胚盤胞への発生を観察。エンドトキシン1 pg/mL未満での144個の胚盤胞発生率53%, 1 pg/mLでは27胚48%, 2 pg/mLでは14胚50%, 3 pg/mLでは13胚38%, 4 pg/mL以上では13胚31%であった。培養胚数の母数が少ないため統計学的有意差は見られなかったが、エンドトキシン濃度2 pg/mLを超えると胚盤胞発生率は低下した。

Ref. 培養液とエンドトキシン Nagata et al.,
J. Mamm Ova Res. Vol.20, 2003, pp51

例えば、エンドトキシンが、わずか数pg/mL入っているだけで、受胎率が大きく下がる。

2) 発熱性物質試験とは

MiCAN

発熱性物質試験は、大きく分けて、4つの試験法があります

日本薬局方(JP)収載

動物資源を
使用するもの



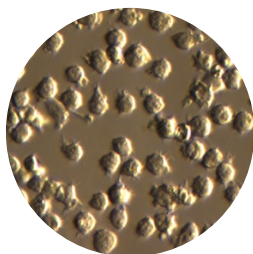
ウサギ発熱性試験

*2026年までに欧州で中止

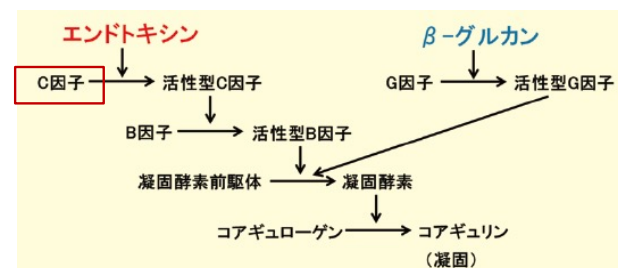


LAL試験(カブトガニ)

細胞や合成物を
使用するもの



MAT試験
(monocyte activation test)



組替C因子試験
(rFC; recombinant factor C)

欧州薬局方(Ph. Eur.)収載

4試験法は、それぞれ特徴があります。

ウサギ発熱性試験

試験法:

ウサギに被検体(もしくは被検体を浸した液)を静注し、ウサギの体温変化で発熱性物質の有無を評価する試験(定性評価)

利点:

- ・ in vivo試験である。
- ・ 簡単な試験である。
- ・ 数時間で結果が出る。

欠点:

- ・ ウサギを多量に使う。
(3匹1群で、1匹のみ発熱すると再試)
- ・ ヒトでの反応性は不明
- ・ 抗がん剤や免疫抑制剤などは適応不可

LAL試験

rFC試験

C因子を人工作製したもの

試験法:

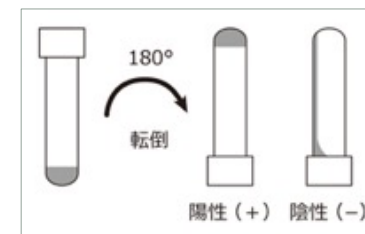
カブトガニの血液が、エンドトキシンにより凝塊形成する現象を利用し、エンドトキシンの有無を評価する試験(定量評価)

利点:

- ・ 簡単な試験である。
- ・ ウサギよりも100倍の感度
- ・ 自動化装置・蛍光など簡便化している

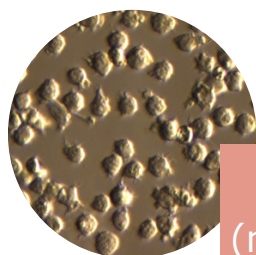
欠点:

- ・ カブトガニの血液を使用
(rFCは組替え製品)
- ・ 非エンドトキシンが測定できない
(発熱性物質の40%とも言われる)



富士フィルム和光純薬(株)HPより抜粋

単球活性化試験(MAT試験とは)



MAT試験
(monocyte activation test)

試験法:

ヒト白血球細胞を使用し、免疫反応
(サイトカイン産生量)により発熱物質の有無を評価する試験
(定量試験)

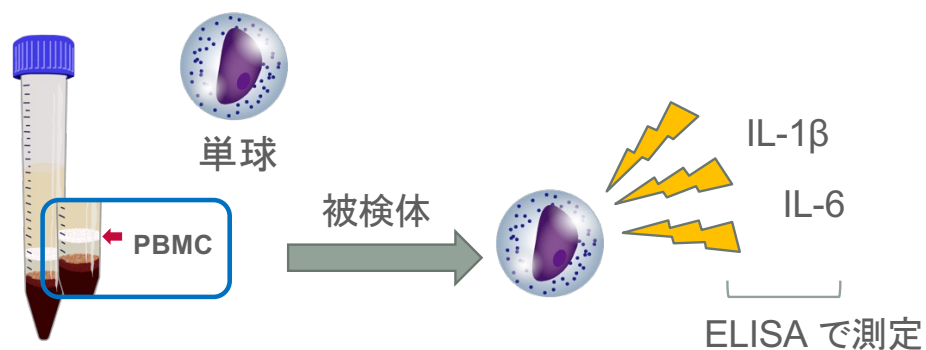
利点:

- ・ in vitro試験
- ・ ヒトでの反応が評価できる。
- ・ 動物資源を必要としない。

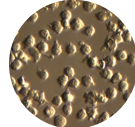
欠点:

- ・ 普及はこれから(国内ではこれから収載)
- ・ 既存の2試験に比べ、テクニカルな面*がある。

*テクニカル面については後述



発熱性物質試験の比較

	 LAL試験	 ウサギ発熱性試験	 rFC	 MAT試験
検査法	Ex vivo	In vivo	In vitro	In vitro
感受性 (LOD)	0.005 EU/ml	0.05 EU/ml	0.005 EU/ml	0.004 EU/ml
結果	定量的/定性的	定性的	定量的	定量的
グラム陰性菌	✓	✓	✓	✓
グラム陽性菌	×	✓	×	✓
酵母やカビ	×	✓	×	✓
ウイルス	×	✓/×	×	✓
医薬品	✓	✓	✓	✓
医療機器	✓/×	✓	✓/×	✓
バイオ製剤	✓/×	✓	✓/×	✓
再生医療等製品	✓/×	×	✓/×	✓



生物製剤などの新規モダリティに懸念される、ヒトに感染するウイルスなどは、既存法では対応できない。

そのため、MAT試験が新試験法として注目されている。

発熱性物質試験の動向

動物資源を使用せず、エンドトキシンと非エンドトキシン性の両方の発熱物質の検出が可能なMATが今後の主流

ウサギ発熱性物質試験 (RPT)



1951

日本で薬局方収載

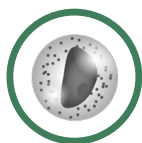
LAL試験



1988

日本で薬局方収載

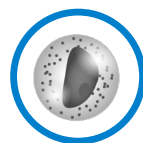
MAT



2010

欧州薬局方収載

MAT



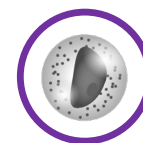
2012

アメリカ
FDAでも紹介

(参考)

2018 インド薬局方収載

MAT



2021

日本 第18改正薬局方
代替試験法として参考情報

RPT



2026

欧州でRPT使用禁止

日本でも局方収載に
向けた動き

MAT



Strategy for removing or replacing the rabbit pyrogen test: New pyrogenicity strategy of the European Pharmacopoeia Commission September 2022

New pyrogenicity strategy

1. Introducing a new general chapter, 5.1.13. *Pyrogenicity*
製品の発熱性物質試験を行うためのガイドラインの追加
BETで検出できない発熱性物質が含まれる可能性のリスクアセスメント
2. Revision of Ph. Eur. texts in Which the RPT is mentioned
ウサギ発熱性試験の必然性を削減する方向で局方内を改定
特に、MAT試験のみでウサギの発熱性試験に置き換わるように文言修正
3. Revision of general chapters 2.6.30 and 5.1.10
 - ・ MATの経験を反映させ、ユーザーから報告された問題を修正するために、2.6.30章(技術的な大幅な改訂)の改訂
 - ・ 主な変更点は、感度に関する新しい記述、エンドトキシン標準曲線の妥当性基準の改訂、方法AおよびBを単一の半定量検査に統合すること、およびアッセイ受容基準の改訂です。

However, despite the publication of the MAT chapter and multiple efforts since then to encourage developers to apply the MAT instead of the RPT, rabbits continue to be used extensively to detect pyrogenic substances.

The complete removal of the RPT from the Ph. Eur. is therefore necessary if the aim is **to move towards the exclusive use of *in vitro* tests (i.e. BET or MAT) for the control of pyrogenicity (endotoxins and non-endotoxins).**

2022年9月 ウサギ発熱性試験の代替を進めるための戦略を発表

- ✓ ウサギ発熱性試験の代替として、MAT試験をPh. Eur.に載せたにも関わらず、以前置き換えが進んでいないことに委員会は問題を提起
- ✓ 移行のためにはウサギ発熱性試験の削除が必要であり、そのためにMAT試験規定の改訂を進めている。
- ✓ 2.6.30章の大幅改訂を計画しており、Pharmeuropa 35.1 (Jan/2023)で公開

BET : Bacterial Endotoxin Test

Timelines

This 5-year project officially started in June 2021, with the endorsement by the Ph. Eur. Commission of a way towards the deletion of the RPT from the Ph. Eur. It is considered that a further 4 years will be necessary to complete the suppression of the RPT from the Ph. Eur. The table below gives a *tentative* schedule for publication in *Pharmeuropa* and the envisaged implementation dates for all the Ph. Eur. texts impacted.

Assuming that all the elaborations and revisions take place according to schedule, by July 2025 all references to 2.6.8 will have been removed from these texts, although the chapter itself will still be included in the Ph. Eur. Deletion of the chapter will then ensue (by 1 July 2026).

Text	Publication in Pharmeuropa	Envisaged implementation date
New general chapter 5.1.13	Jan 2023 (Pharmeuropa 35.1)	July 2025
Revision of general chapter 5.1.10	Jan 2023 (Pharmeuropa 35.1)	July 2025
Revision of general chapter 2.6.30	Apr 2022 (Pharmeuropa 34.2)	July 2024
Revision of general monograph 2034	Jan 2023 (Pharmeuropa 35.1)	July 2025
Revision of dosage form monograph 0520	Jan 2023 (Pharmeuropa 35.1)	July 2025
Revision of other Ph. Eur. texts referencing the RPT	Jan 2023 (Pharmeuropa 35.1)	July 2025
Suppression of general chapter 2.6.8		July 2026

ウサギ発熱性試験の項目削除へのタイムライン

- ・MAT試験など代替法への移行ができるように修正・改訂が進む。
- ・計画通り進むとすると、2025年7月までにウサギ発熱性試験を必要としない（関連付けがされない）法令へと変更になる。
- ・ウサギ発熱性試験の章の削除が2026年7月を予定している。

3) MAT試験を含む局方改正の動きについて（欧州・国内）

国内の動向について

分類	試験名	バリデーション 研究	専門家による 第三者評価	プロトコル	テスト ガイドライン	JaCVAMからの 行政への提案
14 発熱性物質試験	01 <i>In vitro</i> PBMC法	EURL ECVAM 	EURL ECVAM or ICCVAM 		Ph. Eur. 	2010年7月 
	02 PyroMAT法	Merck 		Merck 	Ph.Eur 	
	03 MylcMAT法	JaCVAM 				

 終了
  進行中
  保留または中断
  未着手

JaCVAM HPより抜粋

- ✓ JaCVAM(日本実験動物代替法評価センター)が中心となり発熱性物質試験の代替試験の評価を進めている。
- ✓ 日本薬局方改正のタイミングで、我が国でもMAT試験の収載が期待される。

MAT試験に対する各社製品について

血液 (PBMC)



CTL MAT
(MAT Biotech)



MATR kit
(MAT research)



PyroCell
(Lonza)



HaemoMAT など多数

単球系細胞株

Mono-Mac-6



PyroMAT
(Merck)

aMylc cell



MylcMAT
(マイキャン・テクノロジーズ)

製品写真・各社HPより抜粋

- ✓ PBMCを用いた製品が多数販売されている。
- ✓ Cell lineとしては、Mono-Mac-6細胞を使用したMerck社のPyroMATがある。
- ✓ マイキャンからは、MylcMAT製品を開発中である(有償試作品提供中)。

参考：マイキャン・テクノロジーズ社について

MiCAN

マイキャン・テクノロジーズ株式会社

再生医療技術を活用した特殊な血球提供を通じ、
世界のあらゆる人々の健康に貢献する

設立： 2016年7月

本社・研究所：京都市西京区御陵大原1-36
京大桂ベンチャープラザ

神戸研究所：神戸市中央区港島南町6-3-7

代表取締役CEO 宮崎 和雄

資本金：3,000万円
従業員：18名



研究開発型バイオベンチャー企業

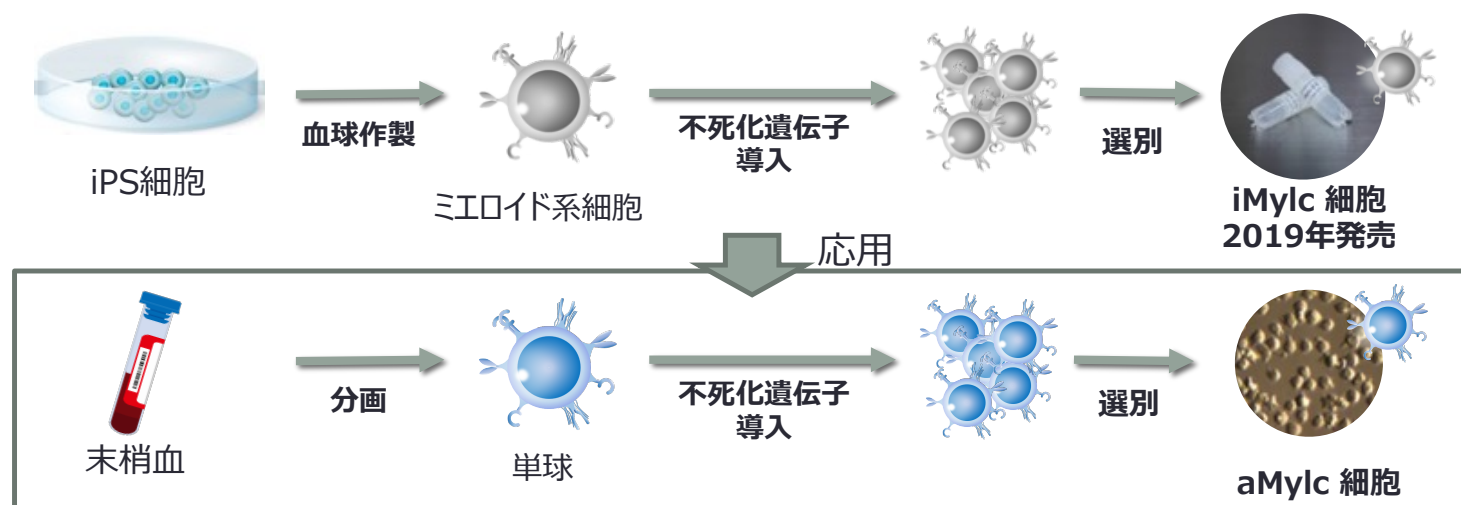
製品：研究用血球細胞

- ・未成熟樹状細胞（Mylc）
- ・未成熟網状赤血球(Mpv)

サービス：評価受託、オーダーメイド細胞開発

Mylc細胞について

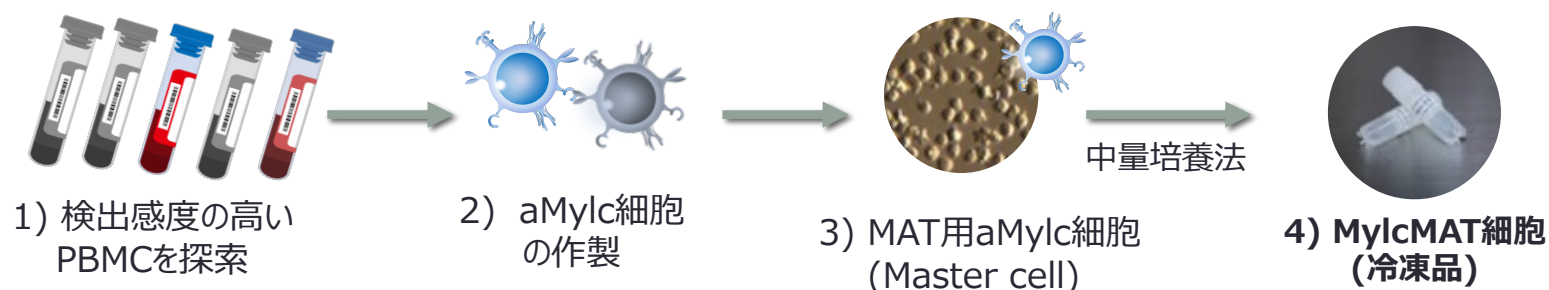
◆当社のコア技術



種類	直径	発現受容体			サイトカイン産生量	
	大きさ	LPS受容体	TLR受容体	CTL受容体	IL-6	IL-8
末梢血単核球 (PBMC)	15μm	○～◎	○	○	△～◎	△～◎
aMylc細胞	15-20μm	◎	○	○	◎	◎

MylcMAT細胞は、検出感度の高いPBMCから樹立した細胞です。

◆MAT試験用aMylc細胞（MylcMAT細胞）

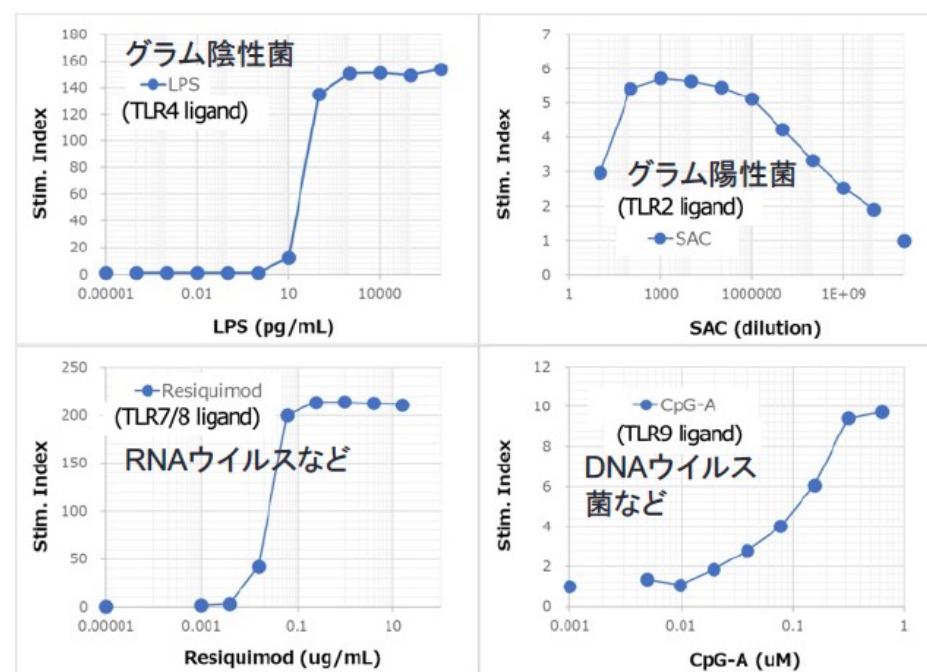


製品名			MylcMAT
製造元			MiCAN
❶ 動物資源			完全不使用
Endotoxin	❷ 規定との差		8.3倍
Non- Endotoxin 検出限界濃度	Pam3CSK4	(TLR1/2)	0.0125 ng/mL
	HKSA	(TLR2)	1/1,000,000 dilution
	Poly-IC	(TLR3)	0.98 µg/mL
	Flagelin	(TLR5)	0.0063 µg/mL
	CpG	(TLR9)	10 µg/mL

MylcMAT細胞は、様々な微生物の検出に対応できます。

微生物が作用するToll様受容体を発現している

	微生物由来のリガンド (例)	TLR
エンドトキシン	グラム陰性菌 (リポ多糖)	TLR4
NEP (非 エンドトキ シン パイロジェン)	グラム陽性菌 (トリアシルリポ プロテイン)	TLR1/2
	グラム陽性菌 (ペプチドグリカ ン、HKSA)	TLR2
	RNA ウイルス(dsRNA)	TLR3
	細菌のべん毛 (フラジェリン)	TLR5
	RNA ウイルス (1本鎖 RNA)	TLR7/8
	DNA ウイルス(CpG-DNA)	TLR9



(図 18. aMylc 細胞が反応する微生物由来リガンド)

MAT試験方法について



3. 基本手法(2.6.30より抜粋・日本語訳)

検査する溶液を、ヒトの単球または単球系細胞を含む材料(例えば、できれば4時間以内に採取したヒトのヘパリン加末梢血、もしくはその血液の単球を含む細胞画分(例えば密度勾配遠心分離法などで分離したヒトの末梢血単核細胞[PBMNC])、または単球系細胞株))とともにインキュベートする。

選択したリードアウト(炎症性または発熱性のサイトカイン等)の試料溶液に対する反応を、エンドトキシン標準品または検証する調整液の基準ロットに対する反応と比較する。

MAT試験について：予備試験

6. 予備試験（2.6.30より抜粋・日本語訳）

検査の精度および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、**エンドトキシン基準曲線の基準**が満たされており、溶液が検査に干渉せず、検査でエンドトキシンおよ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。

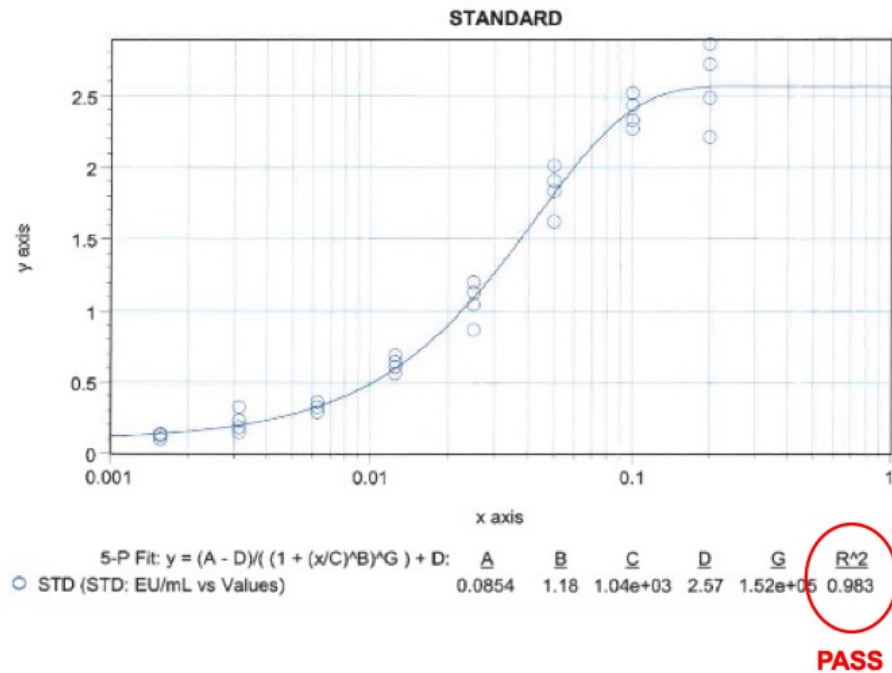
6-1. エンドトキシン標準曲線の基準の保証

標準エンドトキシン溶液を用いて、標準曲線を作成するために少なくとも4つのエンドトキシン濃度を調製する。標準エンドトキシンの各濃度を少なくとも4回繰り返し検査する。

標準曲線については2つの許容基準が存在する。

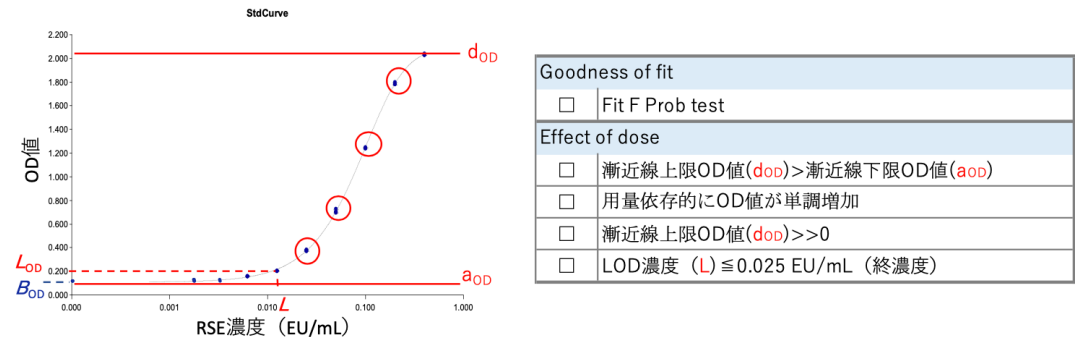
- ・Log10用量反応の回帰（必要に応じて適切に変換）が統計的に有意である($p < 0.01$)
- ・Log10用量反応の回帰が有意に直線から逸脱しない($p > 0.05$)

エンドトキシン標準曲線の基準の保証：MylcMAT細胞の場合



8-2 RSE 用量曲線成立条件

1. 用量曲線が適合していること (Fit of F probe test を実施、 $p > 0.05$)
2. 用量曲線が次の条件を満たしていること (漸近線上限 OD 値 $>$ 漸近線下限 OD 値、用量依存的に OD 値が単調増加していること、漸近線上限 OD 値 $>> 0$)
3. LOD 濃度は 0.025 EU/mL (最終濃度) 以下。
4. LOD 濃度は Cut-off 値を超える用量曲線の最小濃度 (最小水準点) とする。Cut-off 値は 4 つのブランクの平均値に標準偏差を 3 倍したものを加算して求める。
5. 用量曲線が成立しない場合、再試験を行うこと。



Fit of F probe test: 5パラメーターで検量線を書いた際に出てくる値、Gen5などの解析ソフトに内包されている。

予備試験：干渉因子の調査

6-2. 干渉因子の検査 (2.6.30より抜粋・日本語訳)

検査の妥当性を検証するため予備試験を実施し、試料溶液が検査に干渉しないことを確認する。適切な希釈剤を用いて試料溶液を幾何学的段階で希釈するが、すべての希釈がMVDを超えないようにする。

エンドトキシン無添加溶液中で検出されたエンドトキシン等価物を減じた後、エンドトキシン添加試料溶液のエンドトキシン等価物の測定値が添加濃度の**50～200%以内の場合、試料溶液には干渉因子がない**ものとみなされる。この基準が満たされない場合、方法Cが方法Aや方法Bよりも好ましいとされる*

* 現在のPh. Eur.の改訂によりA/B/Cの群わけから、method 1,2へ半定量法での評価に重きを置くように移行が図られている。

5 サンプルの調製

5-1 サンプル干渉影響排除条件設定(Product Specific Validation)

96 well plate には2 サンプルの試験が可能である。各種サンプルはあらかじめアッセイに干渉しない希釈倍率を設定しておくこと。希釈倍率の最大値は Maximum valid dilution(MVD)であり、CLC(汚染限界濃度)が検出できる最大希釈倍率を意味する。当該キット LOD は 0.05 EU/mL (サンプル濃度、なお最終濃度は 0.025 EU/mL)で計算する。

$$MVD = (CLC \times C) / LOD$$

MVD: Maximum Valid Dilution

CLC: Contaminant Limit Concentration (EU/mg or EU/mL)

C: Concentration of Sample Solution (mg/mL or mL/mL)

LOD: Limit of Detection, 0.05EU/mL (Sample Concentration)

6-3. 非エンドトキシン単球活性化汚染因子に関する方法検証

予備試験は選択した検査システムが細菌性エンドトキシンの他にも非エンドトキシン炎症性や発熱性汚染因子を検出することも示すことになる。特定の製品に対するこの方法の適切性を検証する必要がある。これは非エンドトキシン汚染因子により汚染されており、ウサギ発熱性物質試験にて陽性反応を引き起こした、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**には、**2つ以上のToll様受容体の非エンドトキシンリガンド**(ペプチドグリカン、リポタイコ酸、合成細菌性リポタンパク質、フラジェリン、粗細菌全細胞抽出物)を用いた(そのうちの1つ以上を試料溶液に加えた)検査システムの検証を含むものとする。

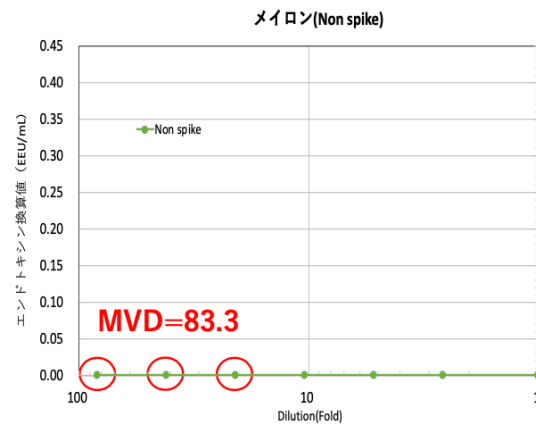
6-4. 検出システムにおける干渉

さらなる試験に向けた試料溶液の最適希釈を確認後、その希釈を選択したリードアウトの検出システム(ELISA等)の干渉について検証する。

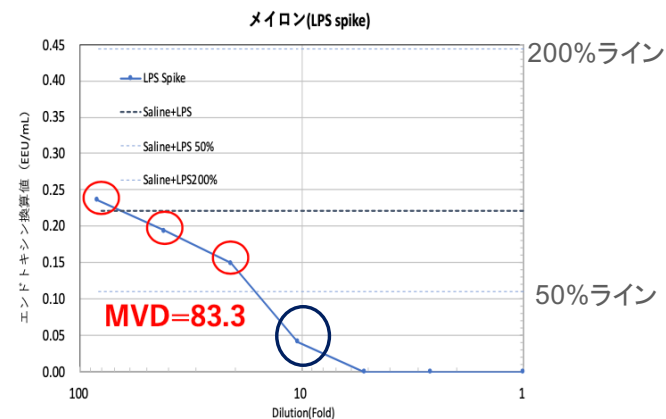
干渉因子の調査：MylcMATの場合

干渉実験

メイロン静注7%



LPS spike



メイロン(炭酸水素ナトリウム)7%静注を例に取り説明する

- ✓ MVDは83.3である。(赤丸は近傍のdilution 82, 41, 20.5倍希釈; 2倍公比である)
- ✓ LPSスパイクした際に、20.5より濃度の高い、10.25倍希釈(青丸)では50%を下回る。(つまり、干渉が起きていると判断する)
- ✓ 干渉しない領域(50%-200%の範囲)での評価を実施するための前試験

MAT試験：MylcMATの場合

4 用量曲線の作成、サンプル添加用 LPS、NEP の調製

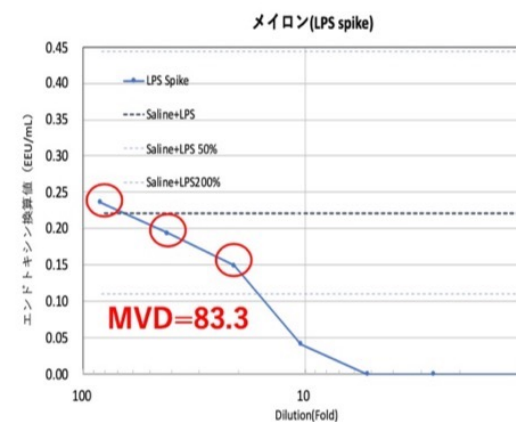
取扱留意事項 1～9 を参照の上、以下の調製を行う。また、試薬類は常温になっていることを確認する。ストック溶液解凍後から希釈、96-well プレートへ移す間の均一化の操作はピペティングとし、ボルテックスミキサーを使用しない。注1)

LPS 標準液(2000 EU/mL)を **RSE 用希釈液**を用いて 9 種類(サンプル添加用 1 種類、用量曲線用 8 種類：最終濃度 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.013、0.0065、0.00313 EU/mL)の濃度となる様に段階希釈を行う。

<プレートデザイン例>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RSE(LPS) 0.400 EU/mL		Sample 1 Dilution 1 Non spiked		Sample 2 Dilution 1 Non spiked							
B	Final conc. 0.200 EU/mL		LPS spiked		LPS spiked							
C	0.1 EU/mL		Sample 1 Dilution 2 Non spiked		Sample 2 Dilution 2 Non spiked							
D	0.05 EU/mL		LPS spiked		LPS spiked							
E	0.025 EU/mL		Sample 1 Dilution 3 Non spiked		Sample 2 Dilution 3 Non spiked							
F	0.0125 EU/mL		LPS spiked		LPS spiked							
G	0.00625 EU/mL		Sample 1 Dilution 1 NEP spiked		Sample 2 Dilution 1 NEP spiked							
H	0.00313 EU/mL		Blank		NEP							

LPS spike



Non-Endotoxin 検出限界濃度	Pam3CSK4	(TLR1/2)	0.0125 ng/mL
	HKSA	(TLR2)	1/1,000,000 dilution
	Poly-IC	(TLR3)	0.98 µg/mL
	Flagelin	(TLR5)	0.0063 µg/mL
	CpG	(TLR9)	10 µg/mL

- ✓ 干渉しない濃度3点でのスパイク有無で測定し、標準曲線でエンドトキシン換算し、検出規定値以下かどうかで判断
- ✓ NEPについても測定 (新しいPh. Eurでは2種を推奨しよう)

まとめ

- ✓ 発熱性物質試験の新試験法として、MAT試験がある。
- ✓ MAT試験は、欧州ではすでに局方収載であり、国内でもJaCVAMを中心に新試験法として評価が進む
次回の日本薬局方改正での収載を目指している。
- ✓ MAT試験は、単球系の細胞を使用し、被検体感を作させ、細胞が産生するIL-6をELISAで測定する。
- ✓ MAT試験前に、被検体（医薬品等）の干渉しない領域をあらかじめ判断する。
- ✓ MAT試験では、LPS標準曲線に対し、医薬品及びLPS感作した医薬品での比活性（EEU/mL）で評価する。
- ✓ 本試験について、さらに詳しく対応しますのでご興味のある方は、お問い合わせください。

弊社では、2つの製品でMAT試験の導入を支援します。

