



# LAL Update

Volume 28, number 1

October, 2012

## FDA の新規業界向けガイダンス<sup>1</sup> パイロジェンおよびエンドトキシンの試験 質疑応答

Michael Dawson, Ph.D., RAC

編集部より

LAL Update 日本語版は Associates of Cape Cod, Inc. (米国)にて作成されたLAL Updateを和訳したものです。日本語版の記載内容は、英語版作成時点のものであり、現状にそぐわない場合がありますので、各種規制等に関連する内容につきましては、当該規制、関連規制等でご確認ください。

LAL ユーザー各位:

2012年6月29日に、FDAは、前ガイダンス文書(1987年の「ヒトおよび動物用非経口医薬品、生物学的製剤、医療機器の最終製品のエンドトキシン検査としてのリムルス(Limulus Amebocyte Lysate [LAL])試験法のバリデーションに関するガイドライン(Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices)」および1991年の「ヒトおよび動物用医薬品および生物学的製剤に関する暫定ガイダンス:カイネティック LAL 試験法(Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals: Kinetic LAL Techniques)」)の取り下げからほぼ一年後に、待望のパイロジェンおよびエンドトキシンの試験に関するガイダンス文書を発表しました。この新しいガイダンス文書は、より広い範囲に渡って言及していることに注目したい。取り下げられたガイダンス文書とは異なり、表題、質問の一つ、この試験法が使われる適切なタイミングにおいてパイロジェン試験が含まれている。しかし、より広範にみると、質疑応答文書では、特定の問題に重点が置かれ、序論に明記されているように、エンドトキシン(又はパイロジェン)試験の範囲を網羅するとは書かれていない。

本記事では、質疑応答文書本文のほとんどを記載し、セクションごとにコメントを記載している。元の質疑応答では、参考文献が各ページの最後(末尾)に脚注として記載されていることに留意されたい。本記事では、参考文献を本文の最後にまとめた。多くの引用を数回繰り返していることに留意されたい。

新しい質疑応答文書に関するコメントをお待ちしています。 [mdawson@acciusa.com](mailto:mdawson@acciusa.com) までご送信下さい。

Michael Dawson, Ph.D., RAC



# 業界向けガイダンス<sup>1</sup> パイロジェンおよびエンドトキシンの試験 質疑応答

[www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM310098.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM310098.pdf)

## I. 序論

本ガイダンスには、米国薬局方第 85 章「細菌性エンドトキシン試験」、米国薬局方第 161 章「輸血および注入装置ならびに類似の医療機器」、および米国医療器具開発協会 (AAMI) の「細菌性エンドトキシン試験法、日常的なモニタリング、およびバッチ試験の代替法」(ST72: 2002/R2010)<sup>iii</sup>に記載されている試験法の推奨事項および許容基準に関する FDA の現在の見解について、生物学的製剤、医薬品、および医療機器を扱う企業に対する推奨事項が記されている。上記 3 つの文書には、ゲル化法、光学的試験法、およびカイネティック試験法の基本原則が記載されており、適切な部品および最終製品のパイロジェンおよびエンドトキシンの有無を試験するよう推奨している。

本ガイダンスはパイロジェンおよびエンドトキシン試験を網羅するものではなく、誤って解釈される可能性がある事項、および公定手順や現行ガイダンス文書で触れられていない問題点について述べる。このような文書について十分理解した上で、本ガイダンスを使用すること。

本ガイダンスを含む FDA のガイダンス文書は法的強制力のある義務を課すものではないが、ある問題に対する FDA の現時点の見解を示しており、具体的な規制・法定事項が引用されている場合を除き、推奨事項と考えてよい。政府機関のガイダンス中の「～すること (should)」という言葉は、「提案、推奨」されているの意味であり、「要求」されているのではない。

### <コメント>

米国国家規格協会 (ANSI)/AAMI 基準 ST72 の最新改訂版は 2011 年であり、2002/R2010 ではないことに留意されたい。ST72 の 2 バージョンの原則は概ね一貫しているが、新しい改訂版には追加情報が記されているため、最新バージョンの使用を推奨する。

## II. 背景

30 年以上にわたり、FDA はウサギ発熱性試験の代替法としてリムルス試験 (Limulus Amoebocyte Lysate [LAL]) によるエンドトキシン検査法を受け入れてきた。1977 年 11 月 4 日付け連邦政府官報 (42 FR 57749) にて、FDA は最終製品のエンドトキシン試験に LAL を用いる場合の条件を通知した<sup>v</sup>。1983 年までには、FDA は最終製品のエンドトキシン試験に LAL 試験を用いてもよいとガイダンスの中で述べている。LAL 試験については一連のガイダンス草案および最終版に記載されている。最後のガイダンス文書「ヒトおよび動物用非経口医薬品、生物学的製剤、医療機器の最終製品のエンドトキシン検査としての LAL 試験法のバリデーションに関するガイドライン (Guideline on Validation of the Limulus Amoebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral drugs, biological products, and medical devices)」は 1987 年に発表された (1987 年ガイダンス)。

パイロジェンおよびエンドトキシンの試験法および限度値の計算<sup>vi</sup>について、これまでに発行された USP および AAMI 文書の記載内容は企業に適切な情報を与えるものであったと FDA は認識している。また USP 85 章および 161 章ならびに FDA ガイダンスは改訂され続けていることにも注目している。FDA は 1987 ガイダンスを取り下げたが、それは FDA の当該検査に対する現在の見解を反映しなくなったためである。

しかし、USP の章および基準は規制上の観点について触れていない場合があるため、FDA は本書において補足情報を提供し、FDA 規制対象製品に対するパイロジェンおよびエンドトキシン試験結果の提出と試験の継続に関する FDA の現在の見解を説明している。

### <コメント>

背景のセクションでは、1991 年の暫定ガイダンス文書に言及していない。暫定ガイダンスは、比濁法や発色法による医薬品および生物学的製剤の試験に特有のものであった。同ガイダンスは 1987 年のガイダンスと同時に取り下げられた。

## III. 質問および回答

### 1. 工程内試験および最終製品出荷時のサンプリング計画はどのように立てればよいのか？

医薬品および医療機器の最終製品の品質システム管理に関する現行の GMP 規制 (CGMP) では、科学的に妥当で適切なサンプリング計画を含めた管理体制の構築が求められている<sup>vii</sup>。

サンプリング計画については AAMI ST72 に記載されているが、USP 85 章には記載がない。企業はサンプリング計画を申請書類の一部として記載すること。サンプリング計画では、原料、工程内材料、および最終製品が汚染される可能性について考慮すること。具体的には、製造工程の一貫性、工程内保持時間が与える影響、エンドトキシン除去工程、最終製品のエンドトキシン規格値などを含ま製造設計について考慮すること。サンプリング計画は変化するものと認識し、当初は最大限のサンプリング数で実施し、製造工程でのエンドトキシン混入防止に対する確信が得られたら、サンプリング計画を調整すること。サンプリング計画を調整した時は、企業は当局への申請書類を更新すること。医薬品および生物学的製剤については、工程内でのサンプリング計画変更は、年次報告としてよい<sup>ix</sup>。医療機器については、工程内のサンプリング計画変更は 30 日通知が適切であろう<sup>x</sup>。

### <コメント>

1987 年のガイドラインには「サンプリング法の選択と試験単位数は、製造手順やバッチサイズに基づくこと。1 ロットにつき、始め、中間、終わりにあたる 3 単位以上について試験を行うこと。」との記載があった。新しい文言では、適切なサンプリング法の妥当性をより重視している。これに伴い、適切な試験履歴が記録されるまで、試験レベルを高める必要性が生じる可能性がある。製造工程の始め、中間、終わりからのサンプリングに関する質問 1 に対する回答では触れていないが、質問 4 に対する回答では触れている。参考文献 vi では、ANSI/AAMI 基準 ST72 が USP 第 161 章の参考文献に混じって記載されていることに留意されたい。基準の番号が記されていない。さらに、セクション I の序論に関する最初のコメントで述べたように、同基準の最新改訂版は 2011 年であり、2002/R2010 ではない。

### 2. 再試験が適切な場合は？

1 回の試験内で矛盾する結果が出た場合、USP 第 85 章「ゲル化法、限度試験 - 判定」に再試験に関する手引きがあるので参考にすること。第 85 章に規定されているように、最大有効希釈倍数 (MVD) 未満で試験が失敗した場合、MVD を上回らない範囲で希釈率を上げて再試験を行うこと。実験結果記録には失敗した結果も含めること。MVD で試験を実施し、試験上の誤りが原因とは考えられない規格外 (OOS) の試験結果が出た場合は、当該ロットは不合格となる<sup>xi</sup>。上述の制限内での再試験の手順を含め、試験手順はすべて企業の品質管理部門から承認を受けた標準操作手順書に予め規定されたものであること。

<コメント>

以前、FDA の報道官は、前ガイダンス文書記載の再試験に関する時代遅れの規定が同文書取り下げの第一理由であったと会議で発言していた。FDA ガイダンス文書は、1993 年の Barr 決定の前、および 2006 年に FDA が規格外(OOS)ガイダンスを発行する前に書かれた。前ガイダンス文書は、最新の OOS ガイダンスや現在の FDA の考えと矛盾していた。新ガイダンス文書は、一貫性のある指針を示し、2006 年 OOS ガイダンス文書に言及している。

3. サンプルの保管および取り扱いが重要か？

重要である。エンドトキシンの検出能力は保管および取り扱いに左右される。エンドトキシンの分析可能量の安定性を実証する実験データに基づき、細菌性エンドトキシン分析時のサンプルの保管および取り扱い手順(製品の混合も含む)を企業は設定すること。単離後の細菌性エンドトキシンは元のエンドトキシンとは異なって反応する可能性があることを念頭に入れ、本試験で用いるエンドトキシンの発生源について考慮して手順を定めること。

<コメント>

サンプルの保管および取扱いは、FDA が 20 年以上、常に懸念を表明してきた点である(例えば、Guilfoyle, D.E., J. F. Yager および S. L. Carito, 1989, 「冷却および混合がリムルス試験による非経口薬に含まれるエンドトキシンの検出に及ぼす影響」、J. Parenter. Sci. Technol. 43(4):183-187 を参照)。この問題をまだ検討していない場合は、検討すること。サンプルの保管および取り扱いについては、LAL Update 第 22 巻 1 号 1 ページ掲載の記事「使い捨て検査製品および LAL 試験」で触れた。また、サンプルの安定性は、以下の質問 4 に対する回答中、医療機器抽出物に関する考察の中で言及されている。

4. 細菌性エンドトキシンの分析に用いる最終製品サンプルをプールし、複数のサンプルを混ぜて分析用サンプルとしてもよいか？

よい。下記の例外を除き、単品の最終医薬品製品をプールし、複数を混ぜてサンプルとし、細菌性エンドトキシンの分析を行ってもよい。混合サンプルは、水溶性医薬品の場合、1 製造ロット分の最終製品容器に入った単位容量全体または一部分(等容量)から調製してよい。有害濃度のエンドトキシンを含む単品を、有害性が低い濃度のエンドトキシンを含む別の単品で希釈してしまう可能性があるため、少容量の非経口薬(100 mL 以下)の場合は MVD に比例した小さい値に調整すれば、プールしてもよい。この「補正 MVD」は、プールするサンプルの総数で、各サンプルに対して算出された MVD を除して求める。製造初期、中間、および最終の製品サンプル容器を検査するという概念に沿って、混合サンプルのプールは単品で 3 個分以下にするよう FDA は推奨する。上述のように MVD を下げることで希釈が不十分となり、製品関連の分析干渉が抑制できなくなった場合は、サンプルを単体で検査すること。

医療機器最終製品もプールして混合サンプルとし、細菌性エンドトキシン試験を行ってもよい。医療機器の試験は、ISO 10993-114<sup>xiii</sup>および ISO 10993-12<sup>xiii</sup>に記載の洗浄・抽出ならびにサンプリング法を用いて実施するべきである。なお、これらの手法は阻害・促進実験でも用いられる。サンプリングは特殊な状況に応じて調整してもよい。最終製品のあるロットから適切な溶出液/抽出液プールが得られたら、このプール抽出液を安定性が保証されている条件下で保存し、デュプリケート(二重測定)で試験すること。

各製品容器から(30 秒以上激しく振とう後)無菌的に分取し、混合してプールサンプルとすることを FDA は推奨する<sup>xv</sup>。これにより、

プールサンプルの結果が規格外(OOS)の場合、元の容器を個別に再試験にかけることができる。

プールしてはいけない種類の製品がある。たとえば当初の MVD が低い医薬品(上述の「補正 MVD」の内容を参照)や、懸濁液として製造された製品である。それは分取サンプルの均質性の問題が分析上、重大な障害を起こす可能性によるものである。試験材料の均質性の保証が難しい可能性があるため、FDA は複数の製造工程段階で採取した工程内サンプルをプールしないよう推奨している。

<コメント>

医薬品のサンプルのプールや MVD の調整は、FDA 報道官が長年の間、会議で提起してきた問題であり、講演の資料に記載されている。ガイダンス文書で医薬品のプールについて言及されたのはこれが初めてである。医薬品が入った個別のバイアル/容器の試験を行う場合(プール単位ではなく)、MVD を減らす必要はない(および当然のことながら、当該製品のエンドトキシン限度値を厳格にする必要もない)。また、個別の単位の試験を行うと、サンプル間の変動性に関するより多くの情報が得られ、その情報はバイアルをプールすると失われる。

5. 企業は USP 記載の公定法に対する代替法を使用してもよいか？

よい。真度、感度、精度、選択性、自動化およびデータ自動整理への適合性の点で、又はそれ以外の特別な状況で利点があれば、代替方法および手順を用いてよい。そのような代替手順および方法は USP 総則第 1225 章「公定書手順のバリデーション」<sup>xvii</sup>の記載に従いバリデートされ、同等以上の結果が得られることが実証されていること<sup>xviii</sup>。代替法により差が生じたり、係争が生じた場合、試験対象製品に関するモノグラフ(医薬品各条)に特に記載がない限り、USP 公定のゲル化法を基準にして最終判定を行う<sup>xix</sup>。

代替法として次の 2 例を挙げる。

(1) 組み換えカプトガン C 因子アッセイ法

製造業者が組み換え C 因子を基にしたアッセイを用いると決めた場合、分析法バリデーションは、USP 第 85 章「細菌性エンドトキシン検査」の「光学的定量法」の項ならびに USP 第 1225 章「公定書手順のバリデーション」に記載された要件に従うこと<sup>xx</sup>。

(2) 単球活性化型パイロジェン試験

ある試験物質・試験材料が単球活性化法による評価に適していることを実証するためには、製品ごとのバリデーションが必要である。バリデーションには、干渉試験、各試験検体に含まれるパイロジェンが正確に検出できるか、医療機器の場合は単球に直接接触することができる試験系であるかの検討が含まれるべきだが、これらに限定されない。

<コメント>

この回答は、非公定法に関して明確で一貫している。

6. 細菌性エンドトキシン試験(BET)のある代替法を他の代替法に移行する際の最良の手順は？

同一対象(LAL カスケードなど)を測定する試験法間の移行については、2つの試験を比較し、新しい方法の同等性を検証すればよい<sup>xxi</sup>。検出限界および阻害/促進について比較するのが基本である。新しい方法の感度は、エンドトキシン添加製品サンプルで評価できる<sup>xxii</sup>。添加サンプルに加え、陽性と判明している一連の製品実サンプルは対象の両試験方法による結果を比較する時

に良い供給源(例)になりうる。試験方法のバリデーションでは、通常の方法で試験した場合の変動および製造環境の変動(例: 原材料の変更又は季節変動)の問題についても検討すること<sup>xiii</sup>。

医薬品、動物医薬品、および生物学的製剤について、新しい方法への移行は事前承認追加申請(PAS)で提出すること。あるいは企業が試験の移行に関する通常手順を設定している場合、PAS一同等性試験実施計画書(CP)にその手順を記載して提出してもよい。CPには試験法の移行手順と、新しい方法の同等性を立証する時に用いる許容基準について詳述すること。CPの承認後、CPの実施結果は簡易報告の分類で報告するよう指示される場合がある(FDA受領時点で変更が有効となる追加申請又は年次報告又は特別報告(21 CFR 314.80))。FDA審査に備え、企業は試験実施計画書、最終報告書、および全データを施設内に保管すること。企業は適切な審査部門と共同で申請手順を確認してからCPを提出すること。クラス IIIの医療機器については、21 CFR 814.39(e)の規定により新試験法への移行には30日通知が必要である。FDAガイダンス「市販前承認(PMA)を受ける医療機器に対する変更—PMA追加申請意思決定プロセス」参照:  
<http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM089360.pdf>。クラス I および II 医療機器の製造上の変更は、品質システム規制(21 CFR part 820)に従うこと。設計管理、製造、および工程管理に関する要求事項は21 CFR 820.30、21 CFR 820.70、21 CFR 820.72、および21 CFR 820.75に記載されている。

医療機器の場合、滅菌前の非滅菌サンプルに対する最終製品のパイロジェン試験を含め、入荷部品、原料、工程内機器、又は最終機器に関する品質管理試験の変更には30日通知が適切であろう<sup>xiv</sup>。医療機器の製造業者は、医療機器の人体への適用経路や接触方法に感度が左右されないことを証明すること。代替試験法と USP 参照標準法の間に再現性のある相関性が証明できたら、製造業者はエンドトキシンの代替試験法を使用してもよい。

#### <コメント>

この回答は、企業がある試験方法の変更のバリデーション要件を慎重に検討すべきであるということの意味している。従って、実サンプルで試験を行うとの提案を受け入れるかどうかを含めて、バリデーションに対して取るアプローチの論理的根拠を示すことについては慎重に当たっていただきたい。回答では、「エンドトキン添加製品サンプル」が、希釈前の製品のエンドトキン添加を指しているのか、通常は陽性対照製品を調製するために行われる、希釈後の製品のエンドトキン添加を指しているのかは明らかでない。

USP 第 1225 章「公定書手順のバリデーション」を参考にしているのには少々驚かされる。第 1225 章には、USP 記載の手順(即ち、公定書手順)のバリデーション要件が記されている。この質疑応答で問題としている試験方法は、USP BET の章に記載されているため、既にその妥当性が確認されている公定書手順である。第 1225 章について言及している第 1226 章「公定書手順の検証」を参考にした方が適切であった。

製造業者の異なる試薬への変更(試験方法の変更は伴わない)に必要な試験については触れていない。従って、変更のための適切な妥当性確認や文書化は企業に委ねられている。このプロセスには、Associates of Cape Cod 社から入手できる試薬移行手順書が役立つ。

#### 7. 1987 年ガイダンスの付録 E のエンドトキン限度値の表はどのようなのか?

1987 年ガイダンスのエンドトキン限度値の表は、1987 年ガイダンス発表以後の用量数(投与方法)および医薬品の力価の増加の

ために時代遅れとなった。エンドトキン限度値の設定には、USP 又は AAMI 基準に記載されている計算法を用いるとよい。USP モノグラフ(医薬品各条)の限度値は、現行製品の力価や用量・用法を考慮していない可能性があるため、上記基準で推奨されている計算法を用いて確認すること。

最終製品に複数の成分が含まれる場合、非経口投与製品については個々の成分のエンドトキン限界値に関係なく、全体のエンドトキン限界値が USP 第 85 章「細菌性エンドトキン試験」に規定されている総閾値を超えないようにすること。脊髄腔内に投与する製品、眼科医薬品、又は医療機器については(医療機器については質問 11 を参照)は、非経口投与製品用の計算法によらないエンドトキン限界値の要求条件があるかもしれない。上記製品については、企業は適切な部門又は審査部門に確認を取ることを FDA は推奨する。

#### <コメント>

付録 E は、USP モノグラフなどの一次情報源に言及するよう使用者に強制するものであったため、その取り下げは前進である。回答には、製品の力価や用量・用法が USP モノグラフのエンドトキン限度値の計算に使用したものと異なっているため、USP モノグラフのエンドトキン限度値は特定の製品には適していないという事実の重要な認識が含まれている。従って、当該製品の添付文書記載の情報を活用してエンドトキン限度値を再計算して検証することを慎重に行う必要がある。

#### 8. クオリティバイデザインの考え方によってエンドトキン限度値はいかに支持されるのか?<sup>xv</sup>

クオリティバイデザインの考えを実践する際は、エンドトキン試験計画は、最終製品の品質の一貫性を確保するために、製品およびプロセスの理解に基づき、リスク管理も考慮に入れたものでなければならない。エンドトキシンの生成、混入リスクがある製造工程エリアを評価するために、適切な工程内試験を行う必要がある。すでに多くの企業が、処理用水を含め入荷原料および部品のエンドトキン汚染を監視する手順を持っている。試験対象となる各製造段階の工程内限度値を決める際は、最終製品の出荷規格を考慮すること。製品汚染の相対リスクを評価する目的で、規格外や製品不良が発生する以前に、製品品質の傾向分析を容易にし、ズレを確認、修正するためには、限度試験よりも定量試験の方が望ましい場合がある。エンドトキン限度値は個別に妥当性を確認する必要があり、限度値は関連の承認申請又は追加申請ごとに申請対象の一部として評価される。

#### <コメント>

この項目は、FDA が工程管理に合わせている焦点を強めている。最終製品の品質保証における原料、製剤の成分、工程内サンプルのエンドトキン試験の重要性を強調している。

#### 9. USP 第 151 章「発熱性試験(ウサギによるパイロジェン試験)」が適切な場合とは?

ある種の生物学的製剤に関しては、21 CFR 610.13(b)ではウサギによるパイロジェン試験が要求される。ある試験法とウサギによるパイロジェン試験との同等性が 21 CFR 610.9 に従って証明された場合は、21 CFR 610.13(b)の要求事項は適用されない。

ヒトおよび動物用医薬品については、いくつかの USP モノグラフ(医薬品各条)は依然、ウサギによるパイロジェン試験を要求している。USP モノグラフではそのように記載されているが、パイロジェン検出力が同等であることを企業が証明できれば、エンドトキン試験又は細胞による代替試験法を代用してもよい。適切な FDA 審査部門が個別に単球活性化などの代替法を考慮する。

医療機器および医薬品原料について、企業は非エンドトキシン性パイロジェンの含有リスクを評価すること。リスク評価で非エンドトキシン性パイロジェンが存在する可能性が示されたら、ウサギによるパイロジェン試験を使用した方が適切かもしれない。

細菌性エンドトキシン評価は、試験物質の理学的および化学的特性に関連した様々な干渉を受ける。サンプル希釈(MVD 以下の)やその他の実証済のサンプル調製法によってこれらの干渉を軽減できない場合、企業はウサギによるパイロジェン試験を行うこと。

#### <コメント>

この回答では、非エンドトキシン性パイロジェンによる製品汚染の可能性を指摘している。この可能性は否定できないが、実際の発生例は極めて少ない。しかし、この事実から、BET がパイロジェン試験の代替法として受け入れられたり、又は BET がパイロジェン試験に大きく取って代わるといえることにはなっていない。(インターロイキン-2 などの一部の治療用医薬品が、パイロジェンであることは注目に値する。)

#### 10. 複数の動物種を対象にした動物用製品に対し、適切なエンドトキシン限度値をどのように決めればよいのか？

複数の動物種を適応対象とする動物用製品については、限度値は最小動物種に対する製品の最大用量を基に限度値を決めること。当該製品が若年および成熟動物に使用可と表示されている場合、若年動物をワーストケースと考える。用量計算に動物の体重が必要な場合、企業は当該動物種の平均体重を用いること。動物の平均体重表については、FDA の業界向けガイダンス(案)「可溶性経口粉末製剤およびタイプ A 動物用医薬品における生物学的等価性の生体内証明の免除」を参照のこと。このガイダンスに記載がない動物の体重については、FDA 動物薬センターに連絡すること。

#### <コメント>

「動物用製品のエンドトキシン限度値は最小動物種に対する製品の最大用量を基に限度値を決めること」という記述には驚かされる。というのは、単位質量あたりの最大用量が、より大型の種に投与される場合に混乱が生じる恐れがあるからである。

#### 11. 医療機器のエンドトキシン限度値とは？

医療機器・放射線保健センター(CDRH)は USP エンドトキシン参照標準品および医療機器抽出物に対する EU/mL で表記される限度値を採用している。USP 第 161 章「輸血および注入装置ならびに類似の医療機器」は医療機器の限度値をその範囲(scope)の中で示している。医療機器のエンドトキシン限度値は、医療機器の用途と医療機器の接触対象(例:血液、心血管系、脳脊髄液、鞘内投与経路、永久移植医療機器、皮下移植した医療機器)に左右される<sup>xxxv</sup>。

医療機器については、下記の抽出量に関する推奨に従うと、心血管系およびリンパ系に直接又は間接的に接触する製品の限度値は 0.5 EU/mL 又は医療機器 1 台あたり 20 EU である。脳脊髄液に接触する医療機器については、限度値は 0.06 EU/mL 又は機器 1 台あたり 2.15 EU である。眼内で直接又は非直接的に接触する医療機器については、ある低いエンドトキシン限度値を適用することがある。個別の推奨事項については適切な審査部門に問い合わせること。

試験用溶出液/抽出液の調製法は医療機器毎に異なる場合がある。洗浄可能な医療機器もあれば、浸漬の必要な機器もあり、分解が必要な機器もある。他の公定基準で指示がない限り、FDA

の洗浄液の推奨容量は以下の通りである。(1)試験対象 10 単体毎にパイロジェン非含有水 40 mL で洗浄する。(2)機器が通常より小さいあるいは大きい場合、患者と接触する医療機器の表面積を補正因子として洗浄又は抽出容量を決める。これに伴いエンドトキシン限度値を調整してもよい。いずれの場合も、洗浄/抽出手順によって USP 第 85 章の推奨よりもエンドトキシン希釈倍数が大きくなるようにすること。阻害/促進試験については、洗浄/抽出溶液および医療機器の溶出/抽出液双方を試験対象とすること。

試験上や干渉の問題がある医療機器の例は、抗凝固薬でコーティングされた医療機器、重金属含有機器、又は微粒子を含む場合である。こうした事例で干渉に対処する方法としては、消化、希釈、緩衝液添加、遠心分離、ろ過等がある。

一製造業者の同型医療機器複数台を同一術部に対し同一手術法で用いたり移植する場合は通常、一般的にその手術に機器 1 台を適用する時のエンドトキシン限度値を満たすこと。1 回の手術に同型医療機器複数台を使用することが知られ、あるいはそのように意図されており、本ガイダンスで示したエンドトキシンの合計限度値から逸脱する場合、製造業者はその理由を説明すること。

医療機器製造業者が本ガイダンス又は認知されている基準から有意に逸脱した LAL 試験を計画する際は、連邦食品医薬品化粧品法第 510 条第 k 項に基づく市販前届(510(k))又は同法第 515 項に基づく市販前承認申請(PMA)を提出すること。有意な逸脱とは、出荷試験でのエンドトキシン規格値が高い場合、阻害/促進試験用のサンプリングが 2 ロット以下の場合、エンドトキシンの検出感度が低い場合、医療機器洗浄実施計画によって本ガイダンスの推奨よりエンドトキシンの希釈倍数が高くなる場合などで、またこれらに限らない。

#### <コメント>

機器 1 台あたり 20 EU および機器 1 台あたり 2.15 EU(それぞれ心血管系又はリンパ系に接触する機器、脳脊髄液[CSF]に接触する機器)という USP 第 161 章記載の限度値のほか、回答では、0.5 EU/mL、0.06 EU/mL という限度値も示している。これらの限度値は、次の段落で推奨されている抽出容量 40 mL と関連している。容量の減少又は増加に関する規定は、通常より小さいあるいは大きい医療機器に対応するために設けられている。(機器 1 台あたり 40 mL という容量は、パイロジェン試験でウサギに 10 EU/kg 投与するのに十分な容量が必要であることに由来する。)回答では、抽出容量を変更する場合はエンドトキシン限度値を調整してよいとしているが、抽出容量からエンドトキシン限度値を決定する計算式が USP 第 161 章に記載されていることには触れていない。また、CSF に接触する機器に関する USP 第 161 章記載の式に抽出容量 40 mL を使うと、エンドトキシン限度値が 0.05375 EU/mL となることにも注目すべきである。これは上記の回答で述べられている限度値 0.06 EU/mL より厳格である。

回答では、「阻害/促進試験については、洗浄/抽出溶液および医療機器の溶出/抽出液双方を試験対象とすること。」としている。従って、この質疑応答では、試験対象機器からの抽出に使用する溶液や、その機器から取り出した後の溶液の双方を試験することを推奨している。溶液の試験は、当該機器抽出物の試験結果が陽性であった場合に対照となる。

1987 年のガイドライン文書が取り下げられた時点で、医療機器のエンドトキシン限度値は、抽出物をプールすると全てのエンドトキシンが単独の機器から発生する可能性を計算に入れている、という事実に関する説明がなくなった。この点は、ANSI/AAMI ST72:2011 で

明確に取り上げられている。

質問 11 への回答は、処置当たり複数個の機器が使用される場合には、より厳しいエンドトキシン限度値が適用されるべきということ、複数個の機器は 1 個の機器と同じエンドトキシン規格値に適合しなければならないことを述べている。このことは、限度値は 1 個当たりの値(すなわち 20EU)を 1 処置に使用するであろう最大機器数で割った値でなければならないことを意味する。これは FDA の新しい考え方を示していると思われる。

## 12. 治療用医薬品の通常スクリーニングに対して FDA は何を期待しているのか？

LAL 試験で阻害／促進がない限り、希釈前の製品をスクリーニングするのが理想である。しかし、製剤によっては成分が LAL 試験を妨害する。そのような製剤について、USP では阻害、促進作用を克服できる程度に製品を希釈することを推奨している。算出された MVD は、エンドトキシン限度値が検出可能なサンプルの希釈倍数であるが、MVD を通常試験の希釈倍数にしないこと。開発中に製品による妨害問題が生じたら、企業は妨害状態を中和する製品の最小希釈倍数を求めることを FDA は推奨する。

その後の製品スクリーニングについては、企業は妨害が中和された希釈倍数を少し上回る希釈倍数で開始することを FDA は推奨する。たとえば、製品の MVD が 100 倍で、10 倍で製品による阻害があるが 20 倍ではない場合、製品スクリーニングは 30 倍で行うのが良いであろう。この希釈率で細菌性エンドトキシンが検出されたら、企業は当該製品のエンドトキシン量測定を詳細に行い、真のエンドトキシンの量を求める。

### <コメント>

この回答は、合理的に可能な(即ち、MVD から離れている)製品の最高濃度で試験を行うことで、エンドトキシン試験の最高検出感度を FDA が奨励していることを示している。

試験を妨害しない初回希釈倍数が 20 倍の場合は、製品の試験を希釈倍数 30 倍で行うようにとの提案では、その後のバッチの阻害レベルの方が若干高いと妨害問題が生じるおそれがある。業界へのより一般的な推奨としては、妨害が中和される希釈倍数の 2 倍以上の希釈倍数で試験を行うこと(その希釈倍数が MVD を超えない限り)。提示された例であれば、希釈倍数は 40 となる。

## 13. 対照標準エンドトキシンは、現行の細菌性エンドトキシン試験において、引き続き使用してよいか？

対照標準エンドトキシン(CSE)は、国際又は国家参照標準品以外のエンドトキシン調製品であり、評定において国際参照標準品にトレーサブル(追跡可能)なものである。CSE は第二次又は第三次の標準品で、通常は LAL 試薬の製造業者が特定の測定条件下で特定ロットの試薬とともに使用するために製造および保証するものである。CSE は標準曲線の検量用試料調製の原液として、また分析の対照として受け入れられており、LAL ユーザーには経費削減になり、一次標準品の在庫維持に役立ってきた。国際参照エンドトキシンに対して適切に校正された CSE を引き続き使用することを FDA は推奨する。

### <コメント>

この回答で、適切に校正された CSE の使用を FDA は推奨することを明確に示した。

## 省略されたトピック

質問および回答文書のコメントに加えて、取り下げられた 1987 年および 1991 年の文書中のいくつかのトピックは扱われていないことに留意されたい。

取り下げられた 1987 年の FDA ガイドラインでは、医薬品および生物学的製剤に関する部分に検査室の初期適格性評価の項目が含まれていた。この項目は検査室の変動性評価と分析者の適格性評価を要求していた。これらは GMP の一般的な要件で、新しい質問および回答文書では具体的に扱われていない。USP の細菌性エンドトキシン試験の章に LAL 試薬の各ロットの性能検証が明記されているが、検査室と分析者の適格性評価については明記されていない。

新しい質問および回答文書に製品検量線は含まれていない。製品検量線は欧州薬局方、第 5.1.10 章「細菌性エンドトキシン試験の実施に関するガイドライン」で言及されている。

恐らく最も注目すべき省略は、保存検量線およびその妥当性の検証に用いる対照についての言及がないことである。現在どの規制文書、ガイダンス、規格にも保存検量線についての言及はない。

## 結論

新しい質問および回答文書は、USP 第 85 章の細菌性エンドトキシン試験、および ANSI/AAMI 規格の ST72 に言及している。このことはエンドトキシン試験のどの側面も本質的に変更するものではない。従って、エンドトキシン試験を根本的に変えるとは予測されない。序論で明らかにしているように、本文書は全てを網羅することを意図しておらず、限られた数の課題についてのみ対応している。含まれていないトピックの 1 つに、保存検量線(およびその妥当性を検証するための対照)の使用がある。質問および回答文書は多くの課題に関する有用な情報を提供するだけでなく、企業が試験活動(サンプリング計画や試験方法変更のバリデーションを含む)の正当理由を持つことが期待される風潮に寄与しており、ガイダンス文書の単なる言及とは対照的である。本文書は科学的説明が可能な決定と工程管理を強調している。

I 本ガイダンスはFDAの医薬品評価研究センター(CDER)法令遵守局、製造および製品品質課が、生物製剤評価研究センター(CBER)、動物薬センター(CMV)、医療機器・放射線保健センター(VDRH)および統制問題事務局(ORA)と共同して作成した。

i USP, 2011 第85章「細菌性エンドトキシン試験」

ii USP, 2011 第161章「輸血および注入装置ならびに類似の医療機器」

iii 米国医療器具開発協会(AAMI), 2002/R2010「細菌性エンドトキシン試験法、日常的なモニタリング、およびバッチ試験の代替法」

**<コメント> 規格番号、ST72はこの参考文献から省かれており、本規格の最新改訂版はST72:2011であることに留意されたい。**

iv 動物用医薬品の発熱性の安全性評価に関する要求事項は、ヒト用医薬品の要求事項に類似している(21 CFR 514.1(b)(5)(v)、および514.1(b)(5)(vii)(b))  
v 「ウサギ発熱性物質試験の代替法としてのLALの使用許可(1977年11月4日付42 FR 57749)。

vi USP, 2011 第85章「細菌性エンドトキシン試験」、USP, 2011 第161章「輸血および注入装置ならびに類似の医療機器」、米国医療器具開発協会(AAMI) 2002/R2010「細菌性エンドトキシン試験法、日常的なモニタリング、およびバッチ試験の代替法」  
vii 21CFR 211.160を参照。

viii 21CFR 820.70 および21CFR 820.250を参照。

ix 21 CFR 314.81(b)(2)(iv)参照。

x 30日通知の提出時期および提出方法に関するガイダンスについては、FDA 業界およびFDA スタッフ向けガイダンス「30日通知、135日市販前承認追加申請(PMA)、および製造法・プロセス変更のための75日人道主義的使用のための医療機器に対する除外(HDE)追加申請(HDE) (2011年4月13日発行)」を参照。http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM080194.pdf。

xi 21CFR 814.39(f)。

xii 許容限界を上回る結果に関する検討方法のガイダンスについては、FDAの業界向けガイダンス「医薬品の規格外試験結果の調査」を参照。本ガイダンスは生物学的アッセイを取り扱うものではないが、本書の概念の多くが細菌性エンドトキシン試験に適用できる。FDAは定期的にガイダンス文書を更新している。FDA 医薬品ガイダンスのウェブサイト(http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm)をチェックし、常にガイダンスの最新版を準備しておきたい。

xiii ISO 10993-1:2009 医療機器の生物学的評価—第1部:リスク管理手順における評価および試験

xiv ISO 10993-12:2007 医療機器の生物学的評価—第12部:試料調製および標準物質

xv 21 CFR 211.84(c)(3)参照

xvi USP 通則 6.30.「代替・調和手法および手順」

xvii USP, 2011 第1225章「公定書手順のバリデーション」

xviii USP, 通則 6.30.「代替・調和手法および手順」

xix USP, 2011 第85章「細菌性エンドトキシン試験」

xx USP, 2011 第1225章「公定書手順のバリデーション」

xxi USP, 2011 第1225章「公定書手順のバリデーション」

xxii 日米EU 医薬品規制調和国際会議(ICH)Q2(R1)分析法バリデーションに関するテキストおよび実施方法(1994); USP, 2008 第1225章「公定書手順のバリデーション」

xxiii Thompson, M. et al., 2002, 「単一研究室における分析法バリデーションの調和ガイドライン」: IUPAC テクニカルレポート, Pure Appl. Chem., Vol.74, No.5, pp. 835-855.

xxiv 21 CFR 814.39(f)

xxv ICH 三極調和ガイドラインQ8(R2) 医薬品開発ステップ4 (2009年)

xxvi USP, 2011 第161章「輸血および注入装置ならびに類似の医療機器」

資料請求先

生化学工業株式会社 LAL営業グループ  
〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目6-1  
Tel.03-5220-8953 Fax.03-5220-8956  
E-mail:lal@seikagaku.co.jp

発売元



**生化学工業株式会社**

〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目6-1

LAL20130410-1