

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン標準品
(日本薬局方エンドトキシン標準品) (Control 971)

村井 敏美[#]・中川ゆかり・宮脇英美子・小川 義之・堀内 善信^{*}

The Endotoxin Reference Standard of the National Institute of Health Sciences
(the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin Reference Standard) (Control 971)

Toshimi Murai[#], Yukari Nakagawa, Emiko Miyawaki,
Yoshiyuki Ogawa and Yoshinobu Horiuchi^{*}

The third lot (Control 971) of the Endotoxin Reference Standard of the National Institute of Health Sciences (the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin Reference Standard) was prepared. The potency of the new lot was assayed against USP Endotoxin Reference Standard (EC-6) and defined as containing 13,000 endotoxin units (EU) per vial by a collaborative study of 7 laboratories.

Keywords : endotoxin, reference standard

(Received May 30, 1997)

前回製造した国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン標準品 (日本薬局方エンドトキシン標準品) (Control 891) の在庫が僅少となったため、新ロットによる第3回標準品 (Control 971) を製造したので報告する。

実験材料及び方法

1. 標準品原料

大腸菌 (*E. coli* UKT-B) 乾燥菌体より抽出精製したりポ多糖 LPS (前ロットで使用したものと同一原料で、 -20°C で保存したもの) を用いた。本原料をエンドトキシン試験用水に溶解し、これに賦形剤としてマンニトールを添加した後バイアルに無菌的に分注し (標準品原料 $2\ \mu\text{g}/\text{vial}$, マンニトール $40\ \text{mg}/\text{vial}$), 凍結乾燥したもの (和光純薬工業株式会社に依頼) を標準品候補品とした。

2. 力価 (エンドトキシン単位, EU) の検定

対照標準品として米国薬局方 (USP) エンドトキシン標準品 (EC-6, $10,000\ \text{EU}/\text{vial}$) を用い、これに対する相対力価を算出することにより標準品候補品の力価を求めた。力価検定に際しては、国立感染症研究所 (生物統計室), 東京都立駒込病院 (呼吸器内科), 和光純薬工業株式会社, 生化学工業株式会社, 第一化学薬品株式会社, 帝国臓器株式会社, 及び国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 (生物試

験部) の計7機関による共同検定を実施した。

3. 試験方法及び試薬

相対力価は、LAL 試薬を用いてカイネティック法、すなわち比濁法あるいは比色法により求めた。比濁法による測定には、和光純薬工業製の ES-II または ES-III、あるいは米国 ACC 社製の Pyrotell を、比色法による測定には、生化学工業社製の Endospecy あるいは第一化学薬品社製の Kinetic QCL Kit をそれぞれ用いた。測定に際しては、標準品候補品の力価を $19,000\ \text{EU}/\text{vial}$ と仮定し、本候補品及び EC-6 ($10,000\ \text{EU}/\text{vial}$) をそれぞれ大塚製薬社製注射用蒸留水で $10,000\ \text{EU}/\text{ml}$ の濃度となる様に溶解し、この原液から独立した4つの希釈系列を作成するか (希釈法 I), あるいは1つの希釈系列から4回サンプリングすることにより (希釈法 II), 同一濃度について4回測定を繰り返した。得られた測定値は統計学的に処理し、用量反応回帰の直線性、平行性が成立する回帰直線を用いて相対力価を算出した。

試験結果

力価を $19,000\ \text{EU}/\text{vial}$ と仮定した標準品候補品の 1 EU の力価と、EC-6 の 1 EU の力価を比較することにより、EC-6 に対する標準品候補品の相対力価を求めた。Table 1 に、各機関で実施した計19回の測定成績を示した。

通常、これら各測定で得られた相対力価 (M) の平均値は、それぞれの分散 (V_m) の逆数を重みとする加重幾何平均により求められる。しかし今回の測定値は、I と II, 2種

* 国立感染症研究所

[#] To whom correspondence should be addressed: Toshimi Murai; 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533 ext. 22; Fax: 06-942-0716; E-mail: murai@nihs.go.jp

Table 1. Summary of the collaborative study for determining relative potency of the candidate Endotoxin Reference Standard against USP Endotoxin Reference Standard (EC-6)

Exp. No.	Lab.	Reagent	M	ML	MU	Vm	Dil.
1	A	Endospey	0.591	0.563	0.620	0.00010	II
2	A	Endospey	0.585	0.556	0.614	0.00010	II
3	A	Endospey	0.682	0.650	0.715	0.00010	II
4	A	Endospey	0.669	0.636	0.704	0.00011	II
5	B	Endospey	0.706	0.661	0.754	0.00019	I
6	B	Endospey	0.638	0.597	0.681	0.00020	I
7	C	Endospey	0.610	0.555	0.669	0.00038	I
8	D	Endospey	0.597	0.581	0.612	0.00003	II
9	D	Endospey	0.586	0.562	0.611	0.00008	II
10	C	ES-II	0.882	0.822	0.947	0.00022	I
11	E	ES-II	0.779	0.750	0.810	0.00007	II
12	E	ES-II	0.773	0.737	0.811	0.00010	I
13	E	ES-II	0.887	0.854	0.922	0.00006	II
14	B	ES-III	0.683	0.639	0.730	0.00020	I
15	B	ES-III	0.717	0.671	0.766	0.00020	I
16	F	kinetic QCL	0.848	0.788	0.912	0.00240	I
17	F	kinetic QCL	0.967	0.902	1.038	0.00200	I
18	B	Pyrotell	0.644	0.572	0.723	0.00062	I
19	B	Pyrotell	0.704	0.626	0.790	0.00061	I

M: relative potency of the candidate Endotoxin Reference Standard against EC-6.

ML and MU: lower and upper limits of 95% confidential interval of relative potency (M), respectively.

Vm: variance of relative potency (M).

Dil: dilution method. I; multiple independent serial dilution. II; single serial dilution.

類の希釈法による成績を含んでおり、希釈法 I では変動因として希釈誤差が考慮されるが、希釈法 II では考慮されない。したがって、単純に得られた分散 (Vm) を用いて相対力価 (M) を加重平均すると、変動因の少ない希釈法 II の成績を過大に評価することとなり、実態とずれが生じる危険性がある。そこで、I, II 両希釈法の分散の大きさの比較をもとに重みの調整を行うことで、より実態に即した相対力価の近似推定が可能になると考えられた。ただし、用

いた測定法や試薬の違いにより、誤差分散や回帰係数が異なることから、各測定の回帰係数及び誤差分散とその自由度より精度係数 λ ($\lambda = s/b, s$; square root of variance, b ; regression coefficient) の平方を求め、この値を用いて I, II 両希釈法の比較を行うこととした。その結果、希釈法 I では $\lambda^2 = 0.00222$, 希釈法 II では $\lambda^2 = 0.00043$ となり、約 5 倍の違いと推定された。そこで希釈法 II については Vm 値に 5 を乗じることで近似補正を行った上、Vm の逆数を重みとして加重幾何平均 $M(M = (\sum(M_i/V_{mi})) / \sum(1/V_{mi}))$, M_i ; relative potency in each measurement, V_{mi} ; variance of each relative potency) を求めた。その結果、EC-6 に対する標準品候補品の相対力価の平均値は 0.7013 と算出された。この成績から、標準品候補品の力価は 13,324 EU/vial と推定された。なおデータは示さないが、参考としてゲル化法により標準品候補品の力価を求めた結果、ほぼ同等の値が得られた。

以上の成績に基づき、本標準品候補品の力価を 13,000 EU/vial と決定した。

結 論

今回新たに製造したエンドトキシン標準品候補品の力価について、米国薬局方エンドトキシン標準品 (EC-6) を対照として国内 7 機関による共同検定を行った結果、候補品の力価は 13,324 EU/vial と推定された。この成績に基づき、本候補品を国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン標準品 (日本薬局方エンドトキシン標準品) (Control 971) とし、その 1 バイアル中にエンドトキシン 13,000 EU を含むものと認定した。

終わりに、本標準品の製造にご協力頂いた東京都立駒込病院呼吸器内科 後藤 元 先生をはじめ、和光純薬工業株式会社 (土谷正和 大阪研究所研究開発促進室課長)、生化学工業株式会社 (田中重則 試薬診断事業技術部開発企画グループリーダー)、第一化学薬品株式会社 (松川正之 試薬事業部学術主任)、帝国臓器株式会社 (古澤良雄 天然物研究部部長) の関係各位に深謝致します。