

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン 10000 標準品 (日本薬局方エンドトキシン 10000 標準品) (Control 0001)

中川ゆかり[#]・前田秀子・村井敏美・堀内善信^{*}

The Endotoxin 10000 Reference Standard of the National Institute of Health Sciences (the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin 10000 Reference Standard) (Control 0001)

Yukari Nakagawa[#], Hideko Maeda, Toshimi Murai, Yoshinobu Horiuchi^{*}

To establish the fourth lot (Control 0001) of the Endotoxin 10000 Reference Standard of the National Institute of Health Sciences (the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin 10000 Reference Standard), a candidate standard (CS) was prepared and then evaluated. The potency of the CS was assayed against USP Endotoxin Reference Standard (Lot G-1) and defined as containing approximately 20,000 endotoxin units (EU) per vial by a collaborative study in which 5 laboratories participated. Based on the results, the CS was authorized to be the fourth lot of the Endotoxin 10000 Reference Standard containing 20,000 EU per vial.

Keywords: endotoxin, reference standard

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン 10000 標準品 (日本薬局方エンドトキシン 10000 標準品) の新ロット (第4回標準品, Control 0001) 候補品を調製し, 力価設定のための共同検定を実施したので報告する。なお, 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) は, 平成 12 年 4 月 1 日付で国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン 10000 標準品 (日本薬局方エンドトキシン 10000 標準品) と名称変更された。

実験材料及び方法

1. 標準品原料及び製造

当部において大腸菌 (*E. coli* UKT-B) 乾燥菌体より抽出精製したりポ多糖を原料 (前ロットで使用したものと同一原料) として用いた。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 µg/vial, マンニトール 40 mg/vial), 凍結乾燥したものを標準品候補品とした (和光純薬工業株式会社に製造を依頼した)。

2. 力価 (エンドトキシン単位, EU) の検定

標準品候補品の力価は, 米国薬局方標準品 (USP) エンドトキシン標準品 Lot G-1 (EC-6, 10,000 EU/vial) を基準としてこれに対する相対力価を算出することにより求めた。力価の検定は, 公的機関として国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 (生物試験部) 及び国立感染症研究所 (安全性研究部) の 2 機関, 国内の主要エンドトキシン定量試薬 (ライセート試薬) 関係企業として和光純薬工業株式会社, 生化学工業株式会社及び第一化学薬品株式会社の 3 社の計 5 機関による共同検定で行った。

3. 試薬及び測定

測定試薬のロットを統一するために, 参加各企業から 1 種類ずつ (計 3 種類) 同一ロットのライセート試薬が提供された (Limulus ES-II Test Wako, lot KMJ1317; 和光純薬工業, Endospecy ES-50M, lot 36M029; 生化学工業, Kinetic-QCL Kit, lot 9L1480; 第一化学薬品)。測定は第十三改正日本薬局方エンドトキシン試験法に準拠し, Limulus ES-II Test Wako はカイネティックー比濁法, Endospecy ES-50M 及び Kinetic-QCL Kit はカイネティックー比色法により行った。

4. 検定方法

方法及び操作は, 各参加機関とも詳細を規定した同一のプロトコールに従って行った。検定方法の概略を以下に記す。

USP 標準品及び標準品候補品 (17,000 EU/vial と仮定) をエンドトキシン試験用水に溶解し, 5,000 及び 10,000 EU/ml

^{*} 国立感染症研究所

[#] To whom correspondence should be addressed:

Yukari Nakagawa; 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540,
Japan; Tel: 06-6941-1533 ext. 21; Fax: 06-6941-5672; E-mail:
yukari@nihs.go.jp

の原液を調製した。なお、これらについてバイアル間ではらつきがある可能性を考慮し、USP標準品は3本分の原液を、標準品候補品は5本分の原液をプールして用いた。このプールした原液から、連続3日間にわたり、それぞれ3希釈系列を各日1回調製し測定を行った。企業各社は自社の測定試薬を用いて測定を行い、国立2機関は3種類すべての試薬を用いて測定を行った。

5. 相対力価の算出

得られた測定値から、用量反応回帰の直線性、平行性が成立する回帰線を用いて、平行線定量法（生物学的製剤基準エンドトキシン試験法第二法）により、USP標準品に対する標準品候補品の相対力価を算出した。得られた相対力価を対数変換したのち、以下の統計学的処理を行った。

1機関で1試薬について行った9回（3希釈系列×1回測定×3日間）の測定を同一条件下での9繰り返し測定とみなし、1機関1試薬単位での対数相対力価の平均値M及びMの分散の推定値Vmを求めた。3機関×3試薬での測定で得られた9個のMにつき、下式によりVmの逆数を重みとする加重平均値wMを求め、全体での平均相対力価とした。

$$wM = \{ \sum (M_i/V_{mi}) \} / \sum (1/V_{mi})$$

結果及び考察

標準品候補品の力価を17,000 EU/vialと仮定し、USP標準品に対する標準品候補品の相対力価を共同検定により求めた。共同検定の実施にあたっては、過去におけるエンドトキシン100標準品候補品の共同検定¹⁾において作成した

プロトコルに準拠し、力価検定用として選定された3種類の試薬を用いて実験を行った。プロトコルの作成に当たっては、偏りとなり得る様々な要因（変動因）をできるだけ排除し、また排除できない場合にはそれらが特定の試料の測定値に偏って働くことのないよう配慮した。

各機関で力価検定を実施し、3種類の試薬についてそれぞれ3機関（国立機関2機関、企業1機関）での測定データを得た。データの集計に際し、得られた測定値が正規性を示すか否かを累積確率プロットにより検討したところ、全データを一括して評価した場合には正規性は否定された（データは省略した）が、各試薬について機関ごとにデータを評価したところ、大部分のデータにおいて正規性が認められた（データは省略した）。そこで、Table 1に示したように、まず各試薬について機関（A～E）単位で対数相対力価（Log RP）の平均値Mを算出し、得られた9個のMについて、測定精度に応じて重みを与えて加重平均し、全体の平均相対力価を求めた。すなわち、Mの分散の推定値Vmを求め、その逆数を重みwとして加重平均値wMを求めた。その結果、wM=0.1081となり、その逆対数として求められる、全体の平均相対力価は1.2825と算定された。この成績より、標準品候補品の力価は21,800 EU/vialと推定された。なお、参考としてゲル化法（Pyrotell; ACC）により、標準品候補品の力価を求めた結果、19,300 EU/vialという値が得られた。

以上の成績に基づき、本標準品候補品の力価を20,000 EU/vialと決定した。

Table 1. Summary of the collaborative study for determining relative potency of the candidate standard against USP endotoxin reference standard

	LAL reagent/Laboratory								
	ES-II			Endospecy			Kinetic-QCL		
	A	B	E	A	C	E	A	D	E
M	0.1609	0.1937	0.1805	-0.0065	-0.0290	-0.0244	0.0048	0.0769	0.0680
Ve	0.0000465	0.0000047	0.0000769	0.0045158	0.0035566	0.0063236	0.0001366	0.0022869	0.0005625
Vm	0.000171	0.000038	0.000291	0.000315	0.000155	0.000254	0.000112	0.002332	0.000368
w	5852.8	26314.0	3434.7	3176.3	6442.3	3936.1	8911.4	428.8	2718.6
wM	0.1081								
antilog wM	1.2825								

M: mean log R. P. (n=9), R. P.: relative potency, Ve: error variance, Vm: variance of M, w: weight, wM: weighted mean of M.

A-E: laboratories participated in the collaborative study.

結 論

今回新たに製造したエンドトキシン 10000 標準品候補品の力価について、USP エンドトキシン標準品 Lot G-1 を対照として国内5機関による共同検定を行った結果、候補品の力価は 20,000 EU/vial のエンドトキシンを含有するものと認められた。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 10000 標準品（日本薬局方エンドトキシン 10000 標準品）（Lot 4, Control 0001）とし、その1バイアル中にエンドトキシン 20,000 EU を含むものと認定した。

終わりに、本標準品の製造に御協力頂いた和光純薬工業株式会社、生化学工業株式会社及び第一化学薬品株式会社の関係各位に深謝致します。

文 献

- 1) Murai, T., Nakagawa, Y., Maeda, H., Kawashima, K., Tanaka, S., Tamura, H., Tsuchiya, M., Takaoka, A., Matsukawa, M. and Horiuchi, Y.: *Iyakuhinkennyu*, **31**, 75-79 (2000)