

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン100標準品  
(日本薬局方エンドトキシン100標準品) (Control 0101)

中川ゆかり<sup>#</sup>・前田秀子・村井敏美・堀内善信<sup>\*</sup>

The Endotoxin 100 Reference Standard of the National Institute of Health Sciences  
(the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin 100 Reference Standard) (Control 0101)

Yukari Nakagawa<sup>#</sup>, Hideko Maeda, Toshimi Murai, Yoshinobu Horiuchi<sup>\*</sup>

To establish the second lot (Control 0101) of the Endotoxin 100 Reference Standard of the National Institute of Health Sciences (the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin 100 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 100 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 second lot of the Endotoxin 100 Reference Standard containing 100 EU of endotoxin per vial.

Keyword : endotoxin, reference standard

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン100標準品(日本薬局方エンドトキシン100標準品)の新ロット(第2回標準品, Control 0101)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。

#### 実験材料及び方法

##### 1. 標準品原料及び製造

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン10000標準品(1バイアル当たりエンドトキシン2 $\mu$ g, マンニトール40 mg/ml 含む)をエンドトキシン試験用水で溶解し, 安定剤として新たにポリエチレングリコール及びトリエタノールアミンを添加した。希釈により最終的に0.5 ml 当たりエンドトキシン12.9 ng, ポリエチレングリコール#6000 0.02 mg, グリセロール0.5  $\mu$ l, トリエタノールアミン0.005  $\mu$ l, マンニトール0.26 mgを含む溶液を調製した。この溶液を1バイアル当たり0.5 ml ずつ無菌的に充てんして凍結乾燥し, 窒素置換して打栓したものを標準品候補品とした(生化学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(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)関係企業として生化学工業株式会社, 和光純薬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(Endospey ES-50M, lot 36M037; 生化学工業, Limulus ES-II Test Wako, lot EMM2101; 和光純薬工業, Kinetic-QCL Kit, lot 0L126A; 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-比濁法, Endospey ES-50M及びKinetic-QCL Kitはカイネティック-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(140 EU/vialと仮定)をエンドトキシン試験用水に溶解し, 前者については5,000 EU/ml, 後者については100 EU/mlの原液を調製した。なお, これら

<sup>\*</sup>国立感染症研究所

<sup>#</sup>To Whom correspondence should be addressed:

Yukari Nakagawa; 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533 ext. 21; Fax: 06-6941-5672; E-mail: yukari@nihs.go.jp

についてバイアル間でば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。

$$wM = \{ \sum (Mi/Vmi) \} / \sum (1/Vmi)$$

結果及び考察

標準品候補品の力価を 140 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<sup>1)</sup>において作成したプロトコールに準拠し、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。プロトコー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 = -0.1360 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 0.7311 と算定された。この成績より、標準品候補品の力価は 102 EU/vial と推定された。

以上の成績に基づき、本標準品候補品の力価を 100 EU/vial と決定した。

	LAL reagent/Laboratory <sup>1)</sup>								
	ES-II			Endospey			Kinetic-QCL		
	A	B	E	A	C	E	A	D	E
M <sup>a)</sup>	0.0011	-0.1703	-0.0264	-0.1335	-0.2113	-0.1610	-0.1551	-0.2322	-0.1777
Ve <sup>b)</sup>	0.0000037	0.0000103	0.0000757	0.0052373	0.0012513	0.0029202	0.0001008	0.0001974	0.0002727
Vm <sup>c)</sup>	0.000095	0.000070	0.000126	0.000398	0.000090	0.000186	0.000113	0.000183	0.000245
w <sup>d)</sup>	10554.8	14352.2	7942.7	2510.5	11074.3	5371.4	8887.4	5451.9	4085.4
wM <sup>e)</sup>	-0.1360								
antilog wM	0.7311								

<sup>a)</sup> M: mean log R.P. (n=9), R.P.: relative potency.  
<sup>b)</sup> Ve: error variance.  
<sup>c)</sup> Vm: variance of M.  
<sup>d)</sup> w: weight.  
<sup>e)</sup> wM: weighted mean of M.  
<sup>1)</sup> A-E: laboratories participated in the collaborative study.

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

### 結 論

今回新たに製造したエンドトキシン100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100 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100標準品（日本薬局方エンドトキシン100標準品）(Lot 2, Control 0101) とし、その1バイアル中にエンドトキシン100 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生化学工業株式会社、和光純薬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. : *Iyakuhinkenkyu*, **31**, 75-79 (2000)