

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 0201)

中川ゆかり[#]・村井敏美・堀内善信^{*}

The Endotoxin 100 Reference Standard of the National Institute of Health Sciences
(the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin 100 Reference Standard) (Control 0201)

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

To establish the third lot (Control 0201) 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 130 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 third lot of the Endotoxin 100 Reference Standard containing 130 EU of endotoxin 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3回標準品, Control 0201)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 µg, 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14.4 ng, ポリエチレングリコール#6000 0.02 mg, グリセロール0.5 µl, トリエタノールアミン0.005 µl, 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(Endospecy 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)。測定は第十四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, Endospecy 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。

^{*}国立感染症研究所

[#]To whom correspondence should be addressed: Yukari Nakagawa; 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533 ext. 22; Fax: 06-6941-5672; E-mail: yukari@nihs.go.jp

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。

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

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¹⁾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あたっては, 偏りとなり得る様々な要因 (変動要因) 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, $wM = -0.0267$ 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0.9404

Table 1 Summary of the collaborative study for determining relative potency of the candidate standard against USP Endotoxin Reference Standard

	LAL reagent/Laboratory ⁶⁾								
	Limulus ES-II			Endospeccy			Kinetic-QCL		
	A	B	E	A	C	E	A	D	E
M ^{a)}	0.0899	-0.0280	0.0637	-0.0595	-0.1192	-0.0561	-0.0502	-0.1213	-0.0026
Ve ^{b)}	0.0000523	0.0000108	0.0000101	0.0036519	0.0015049	0.0026034	0.0000977	0.0003812	0.0001693
Vm ^{c)}	0.000092	0.0000670	0.000128	0.000355	0.000085	0.000189	0.000108	0.000185	0.000209
w ^{d)}	10874.7	14910.5	7828.1	2813.6	11796.6	5295.1	9270.9	5409.4	4779.7
wM ^{e)}	-0.0267								
antilog wM	0.9404								

^{a)} M: mean log R.P. (n=9), R.P.: relative potency.

^{b)} Ve: error variance.

^{c)} Vm: variance of M.

^{d)} w: weight.

^{e)} wM: weighted mean of M.

^{f)} A-E: laboratories participated in the collaborative study.

と算定された。この成績より、標準品候補品の力価は132 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130 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130 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 3, Control 0201）とし、その1バイアル中にエンドトキシン130 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)