

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

日局一般試験法「浸透圧測定法」の改正に関する研究

分担研究者 岡田 敏史 国立医薬品食品衛生研究所
大阪支所 薬品試験部長

研究要旨 現行の日局一般試験法「浸透圧測定法」にはいくつかの問題があり、改正の必要性が指摘されてきた。これらの指摘に応え、改正案の具体化を図るため、装置適合性試験など数値に係わる部分につき、実験的検証を行い、以下のような内容の提言を行うこととした。

- (1) 装置適合性試験を規定し、繰り返し精度は全オスモル濃度領域で 2.0% 以内、また、各標準液で規定されたオスモル濃度に対して 3.0% 以内の正確さをもつ必要がある。
- (2) 標準液の種類とその設定濃度範囲の見直しを行い、100～1000 mOsmの間で7種類の標準液を設定する。
- (3) 高濃度試料に対する希釈測定法を新たに規定し、得られた数値の取扱い方を明記する。
- (4) 『浸透圧比測定用標準液』を削除し、生理食塩液のオスモル濃度に対し、一定値（286 mOsm）を与える。

分担研究者 岡田敏史
国立医薬品食品衛生研究所
大阪支所 薬品試験部長
協力研究者 奥田 秀毅
大阪医薬品協会
技術研究委員会委員長
協力研究者 松尾 賢明
大阪医薬品協会
技術研究委員会副委員長
協力研究者 外岡 弘道
東京医薬品工業協会

A. 研究目的

現行の「浸透圧測定法」は、凝固点降下法により試料溶液の凝固点降下度の測定から、希薄溶液の束一的性質を利用してオスモル濃度を求めているにも拘わらず、浸透圧を測定しているかのような名称が付けられており、試験法の名称の妥当性に疑問が

もたれるとともに、浸透圧の単位がオスモルで表されるかのような記述における矛盾も抱えており、改正の必要性が指摘されてきた。

これらの指摘に応え、理論的にも、実用的にも矛盾のない試験法にするとともに、

国際的な整合性も図る必要があることから、装置適合性試験、標準液の設定濃度及びその範囲、希釈測定法の明確化など、実験的検証を必要とする部分につき検討を行った。

B. 研究方法

改正原案の作成にあたり、装置の適合性試験、標準生理食塩液のオスモル濃度の定数化及び 1000 mOsm 以上の高濃度試料に対する希釈測定法を明記することを意図し、これらの部分を確定するために、以下のような内容で計 17 施設による共同実験を行った。

B-1. 装置の繰り返し精度

装置適合性試験の規格値を定めるために 8 種の装置校正用オスモル濃度標準液(100, 200, 300, 400, 500, 700, 750, 1000 mOsm)を用い、各標準液につき 3 回の繰り返し測定を行い、平均値及び標準偏差を求めた。試験に先立って行うべき装置の校正は、各装置に定められた方法により行うこととした。

B-2. 生理食塩液のオスモル濃度

下記の方法により、標準生理食塩液を調製し、試料溶液とする。試料溶液の調製は 1 回ごとに行い、試料溶液 3 本について、それぞれ 3 回の繰り返し測定を行い、平均値及び標準偏差を求めた。

《生理食塩液の調製》

塩化ナトリウム（標準試薬）を 500-650 °C で 40~50 分間乾燥した後、デシケーター（シリカゲル）中で放冷する。この塩化ナトリウム 0.900 g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 100 mL とし、試料溶液とする。

B-3. 高濃度試料の希釈測定と数値の取扱い

日局「ブドウ糖注射液」(20 w/v%) を標準試料として、原液及び 4 倍希釈液につき実測値を求め、希釈測定の妥当性について検討を行った。別に、各施設で入手可能な高濃度注射液製剤 (1000 mOsm 以上) を適宜選択し、同様の実験を行うこととした。

C. 研究結果及び考察

各施設で用いられた浸透圧測定装置のモデル名、測定濃度範囲、装置校正用に用いられる標準液の濃度及び繰り返し精度等に関する規格の概略を Table 1 に示した。

C-1. 装置の繰り返し精度（装置適合性試験）

8 種のオスモル濃度標準液についての全測定結果を Table 2 に示すとともに、それらの散布図を Fig. 1 に示した。また、Table 2 の結果をまとめたものを Table 3 に示した。

Table 3 中、 $SDi(max)(CV)$ は 17 機関、21 測定の中での最大標準偏差を絶対値 (Osm) 及び変動係数 (%) で表したものであり、 $DVmax$ (%) は各機関で測定された平均値 (M_i) の中で、各標準液で規定されるオスモル濃度からのずれが最大のもを絶対値 (Osm) 及び相対値 (%) で表したものである。

以上の結果から、大部分の測定値がカバーされるような繰り返し精度の規格値としては、オスモル濃度の如何を問わず 2.0 % 以内とすることが妥当と考えられた。このことは、Fig. 1 に示した散布図からも明らかである。また、装置の適合性としては、単に繰り返し精度を規定するだけでなく、測定値の正確さも要求されることから、各標準液で規定されたオスモル濃度からのずれは 3.0 % 以内とすることが妥当であることが示唆された。

また、標準液のオスモル濃度設定範囲は、100~1000 mOsm の範囲で 7 種類とし、700 又は 750 mOsm の選択については、局方調査会に一任することとした。

C-2. 生理食塩液のオスモル濃度

各施設それぞれにおいて調製された試料溶液 1~3 についての測定結果につき、平均値及び標準偏差を Table 2 に示している。また、各施設ごとの平均値と標準偏差及びそれらの総平均についても合わせて示している。

この結果、生理食塩液のオスモル濃度は、 286 ± 1.6 mOsm ($n=21$)、最大値：291 mOsm、最小値：283 mOsm となり、各施設の間で

ばらつきの少ない(変動計数 0.6%)良好な実験結果の得られたことがわかる。したがって、生理食塩液(塩化ナトリウム 0.900 g/100 mL)のオスモル濃度を一定値(286 mOsm)として取り扱うことに問題はないと考えられる。なお、USPは生理食塩液のオスモル濃度を一定値として取り扱っているわけではないが、試験法中でそのオスモル濃度は約 286 mOsmであることを記載している。

C-3. 希釈測定の可否と数値の取扱について

現行では、2000 mOsm 及び 3000 mOsm の標準液が規定されており、高濃度試料においても希釈することなく、そのまま測定することが原則とされているが、例えば、高濃度糖液等においては試料が明確な凝固点を与えないため、測定不能となることもしばしばあること、測定値の信頼性に疑問のあることなどから、今回の改正案では、標準液の範囲は 100~1000 mOsm とし、高濃度試料の測定においては希釈測定を原則とすることを明記することの妥当性につき、検討する必要があった。

1000 mOsm 以上の高濃度試料の希釈測定の可否について、日局「ブドウ糖注射液」(20 w/v%)を標準試料として試験を行った結果を Table 2 に示している。この結果、原液：

平均値 1389±55 mOsm($n=17$)

最小値 1313 mOsm~最大値 1477 mOsm

最大偏差 88 mOsm(6.3%)

4倍希釈液：

平均値 293.2±3.4 mOsm($n=18$)

最小値 288 mOsm~最大値 299 mOsm

最大偏差 6 mOsm(2.0%)

となり、4倍希釈液を調製することにより、より高い精度での測定が可能となることが明らかとなった。また、希釈測定によりすべての施設又は装置での測定が可能となった。ブドウ糖注射液では、40 w/v% 又は 50 w/v% などの高濃度注射液も用いられていることから、希釈測定法が日局中に明確に規定されることは、大きな意味をもつことになる。

また、希釈測定を行った場合、測定値に希釈倍数を掛けて、原液のオスモル濃度を推定することになるが、試料濃度とオスモル濃度の間の直線性が保証されないので、ここで得られたオスモル濃度は参考値として取り扱い、適否の判定には用いないことを明確にしておく必要があると思われる。

標準試料として用いた「ブドウ糖注射液」の他に、各機関で保有する高濃度注射液製剤についての同様の実験を試みた結果が、Table 2 に合わせて示されている。試料としては、スルピリン含有製剤、抗生物質製剤、高カロリー輸液、アスコルビン酸注射液、シチコリン注射液など、5種類の注射液製剤が用いられた。この結果、原液のままでは測定ができなかった製剤が2種類あったこと(Labo.No. 9, 10-1)、 n 倍希釈液を調製することにより、より高い精度での測定が可能であることが、ブドウ糖注射液以外の製剤でも確認されたことから、高濃度製剤についてオスモル濃度測定が必要な場合、希釈測定から推定されるオスモル濃度を参考値として利用してゆくことが、品質管理上、有意義なことと思われる。

C-4. 浸透圧測定法改正案への提言

以上の実験結果を参考にし、装置適合性試験で規定すべき数値及び希釈測定に関わる部分に対する改正案の骨子等を以下のよう_に考えてみた。

(1)装置の適合性

測定しようとする試料溶液の繰り返し精度の規格値としては、全オスモル濃度領域で 2.0% 以内、正確さ(真度)としては、各標準液で規定されたオスモル濃度からのずれは 3.0% 以内とする。

(2)浸透圧比(オスモル比)

本測定法では生理食塩液の与えるオスモル濃度に対する試料溶液のオスモル濃度の比を浸透圧比(オスモル比)と定義する。生理食塩液(0.900 g/100 mL)のオスモル濃度 C_s (mOsm) は、一定(286 mOsm)であることから、試料溶液のオスモル濃度 C_T (mOsm) を測定すれば、次式より試料溶液

の浸透圧比（オスモル比）を計算することができる。

$$\text{浸透圧比（オスモル比）} = \frac{C_T}{C_S} \dots \dots$$

$C_S : 286 \text{ mOsm}$

(3)希釈測定法の規定

オスモル濃度が 1000 mOsm を越える場合、蒸留水を用いて試料を n 倍希釈し ($1 \rightarrow n$)、この液につき同様な測定を行う。この場合、 n 倍希釈溶液を用いて測定され、希釈倍数を掛けて得られたみかけのオスモル濃度であることを明示する。ただし、希釈測定を行う場合、生理食塩液のオスモル濃度に近くなるよう、希釈倍数を選択する。

D. 結 論

現行の「浸透圧測定法」は、測定される物理量を反映した名称となっていないため、これを改める必要があるが、その他、装置の校正法が規定されていないこと、不必要に広い範囲での標準液が規定されているこ

と、希釈測定法が明示されていないこと、浸透圧比を求めるために「浸透圧比測定用標準液」を別途規定していることなど、試験法として不備な点があるとともに、国際的整合性を欠いている点もあることから、東西の技術委員会の協力を得て、数値に係わる部分についての実験的検討を行った。

その結果、装置校正用標準液の種類とその濃度範囲、装置適合性試験と要求される繰り返し精度、希釈測定法の妥当性及び生理食塩液のオスモル濃度に一定値を与えることができることなどを実験的に明らかにし、改正案の作成にあたっての具体的提言を行うことができた。

E. 研究発表

- (1) 岡田敏史：日局一般試験法「浸透圧測定法」の改正に向けて。医薬品研究，27，639-643（1996）。
- (2) 奥田秀毅，松尾賢明，外岡弘道，岡田敏史：一般試験法浸透圧測定法の改正に関する検討。医薬品研究，29，904-912（1998）。

Table 1 Summary of Osmometer Characteristics Used in the Collaborative Study: Apparatus and its Supplier, Measurement Range, Calibration Method, and Specifications of Repeatability and/or Accuracy

Labo. No.	Supplier & Apparatus	Measurement Range	Standard Solns. for Calibration	Repeatability and/or Accuracy
1-1	KDK Corporation Model: OM-6030	0~2500 mOsM	0, 300, 1000 mOsM	\leq CV 1%(200~300 mOsM)
1-2	TOA Electronics Ltd. Model: HOSM-1	0~2000 mOsM	100, 900 mOsM	\leq CV 1%(500 mOsM)
2	Fiske Associates Model: OS	0~2000 mOsM	100, 1000, 2000, 3000 mOsM	$\leq \pm 1 \%$ (0~4000 mOsM)
3-1	Advanced Instrum., Inc. Model: 3D	0~2000 mOsM	100, 1000, 2000 mOsM ($n=3$)	$\leq \pm 2$ mOsM(0~400 mOsM) $\leq \pm 0.5 \%$ (400~2000 mOsM)
3-2	TOA Electronics Ltd. Model: HOSM-1	0~2000 mOsM	100, 1000, 2000 mOsM ($n=1$)	$\leq \pm 1 \%$ (500 mOsM)
4	KDK Corporation Model: OM-6020	0~2500 mOsM	0, 300, 1000 mOsM	$\leq \pm 5$ mOsM(285 mOsM, $n=1$)
5	Fiske Associates Model: OS ONE-TEN	0~2500 mOsM	50, 850 mOsM ($n=2\sim6$)	$\leq \pm 2$ mOsM(0~400 mOsM) $\leq \pm 0.5 \%$ (400~2000 mOsM)
6	Fiske Associates Model: OS	0~2500 mOsM	100, 900 mOsM ($n=1$)	$\leq 1.0 \%$ (500mOsM, $n=6$)
7	TOA Electronics Ltd. Model: HOSM-1	0~2000 mOsM	100, 900 mOsM ($n=1$)	$\leq 1.0 \%$ (500mOsM, $n=6$)
8	KDK Corporation Model: OM-6040	0~2500 mOsM	0, 300, 1000 mOsM	$\leq \pm 1 \%$ (0~2000 mOsM)
9	Advanced Instrum., Inc. Model: 3W	0~2000 mOsM	100, 900 mOsM ($n=1$)	$\leq \pm 2$ mOsM(0~400 mOsM) $\leq \pm 0.5 \%$ (400~2000 mOsM)
10-1	KDK Corporation Model: OM-6020	0~2500 mOsM	0, 300, 1000 mOsM ($n=1$)	$\leq \pm 3$ mOsM(300 mOsM) $\leq \pm 10$ mOsM(1000 mOsM)
10-2	KDK Corporation Model: OM-6020	0~2500 mOsM	0, 300, 1000 mOsM ($n=1$)	$\leq \pm 3$ mOsM(300 mOsM) $\leq \pm 10$ mOsM(1000 mOsM)
11	Advanced Instrum., Inc. Model: 3D	0~1000 mOsM	100, 500 mOsM ($n=2\sim3$)	$\leq \pm 3$ mOsM(500 mOsM, $n=3$) $\leq \pm 5$ mOsM(286 mOsM)
12-1	TOA Electronics Ltd. Model: HOSM-1-1	0~2000 mOsM	100, 900 mOsM	$\leq \pm 1 \%$ (300, 400, 500 mOsM, $n=5$)
12-2	Advanced Instrum., Inc. Model: 3D	0~2000 mOsM	100, 500 mOsM ($n=2\sim5$)	$\leq \pm 3$ mOsM(0~400 mOsM) $\leq \pm 0.5 \%$ (400~2000mOsM)
13	KDK Corporation Model: OM-6020	0~2000 mOsM	0, 300, 1000 mOsM ($n=1$)	$\leq \pm 1.0 \%$ (300, 1000 mOsM, $n=6$)
14	Precision Systems, Inc Model: Osmet A	100~2000 mOsM	500, 1000 mOsM ($n=3$)	$\leq \pm 1$ mOsM (100, 500 mOsM, $n=3$)
15	KDK Corporation Model: OM-6020	0~2000 mOsM	0, 300, 1000 mOsM ($n=1$)	$\leq \pm 1.0 \%$ (200~300 mOsM, $n=1$)
16	KDK Corporation Model: OM-6040	0~2000 mOsM	0, 300, 1000 mOsM ($n=1$)	$\leq 1.0 \%$ (0~2000 mOsM)
17	Advanced Instrum., Inc. Model: 3 MO	0~2000 mOsM	500, 850 mOsM	$\leq \pm 2$ mOsM(0~400 mOsM) $\leq \pm 0.5 \%$ (400~2000 mOsM)

Number (n) in parenthesis indicates the repeating number for the calibration or the confirmation of the repeatability and/or the accuracy of the measured values.

Table 2 Results of Osmolarity Measurements for Standard Solutions, Physiological Saline, and High Osmolar Injections above 1000 mOsM

			1-1	1-2	2	3-1	3-2	4	5	6	7	8	9	10-1	10-2	11	12-1	12-2	13	14	15	16	17	Ave SD	MAX MIN		
Osmolal Standard Solutions	100mOsM	Taken (g)	0.3091	0.3094	0.3091	0.3092	0.3092	0.3090	0.3090	0.3099	0.3092	0.3089	0.3106	0.3090	0.3090	0.3088	0.3083	0.3091	0.3090	0.3090	0.3091	0.3092	0.3090	0.3090	99	101	
		Ave.(OsM)	100	99	99	100	101	99	96	99	99	99	100	100	100	96	100	98	99	100	99	100	99	100	97	99	101
		SD	0.00	0.58	0.58	0.58	0.58	1.00	0.58	1.53	1.53	0.58	0.58	0.58	0.58	1.00	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.00	1.29	96	
	200mOsM	Taken (g)	0.6265	0.6265	0.6265	0.6266	0.6266	0.6265	0.6265	0.6265	0.6262	0.6265	0.6269	0.6269	0.6265	0.6265	0.6263	0.6275	0.6266	0.6265	0.6266	0.6264	0.6265	0.6265	0.6265	199	201
		Ave.(OsM)	199	200	199	201	200	196	199	197	199	199	199	199	199	197	200	198	200	200	200	199	199	196	199	199	201
		SD	0.00	0.00	2.52	0.58	0.00	0.00	1.15	2.31	0.00	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.00	0.58	0.00	0.58	0.58	0.58	1.25	196	
	300mOsM	Taken (g)	0.9461	0.9462	0.9458	0.9462	0.9462	0.9460	0.9461	0.9467	0.9459	0.9459	0.9474	0.9460	0.9461	0.9455	0.9458	0.9461	0.9460	0.9460	0.9458	0.9464	0.9458	0.9464	0.9459	298	301
		Ave.(OsM)	299	301	296	300	300	296	298	296	298	296	297	298	298	296	300	299	300	299	300	299	300	295	298	298	301
SD		1.15	0.58	1.15	0.58	0.00	1.15	1.15	2.65	0.58	1.00	0.58	0.00	0.58	0.00	1.00	1.15	0.00	0.58	0.00	0.58	0.58	0.58	1.80	295		
400mOsM	Taken (g)	1.2703	1.2701	1.2700	1.2705	1.2705	1.2700	1.2701	1.2698	1.2698	1.2701	1.2709	1.2700	1.2700	1.2704	1.2856	1.2703	1.2700	1.2700	1.2700	1.2704	1.2700	1.2704	1.2700	399	405	
	Ave.(OsM)	400	402	400	401	400	396	399	396	398	399	399	399	399	405	401	401	402	400	400	401	401	396	399	399	405	
	SD	0.00	1.15	2.52	1.53	1.00	1.00	0.58	4.51	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	1.00	0.58	0.58	0.58	1.00	0.58	1.00	0.58	1.00	0.58	2.20	396	
500mOsM	Taken (g)	1.5934	1.5932	1.5927	1.5932	1.5932	1.5930	1.5927	1.5932	1.5930	1.5927	1.5938	1.5930	1.5931	1.5930	1.5962	1.5935	1.5930	1.5930	1.5932	1.5931	1.5934	1.5931	1.5931	499	503	
	Ave.(OsM)	502	503	498	500	500	497	497	495	497	497	499	500	500	497	502	498	503	503	502	502	502	502	496	499	503	
	SD	1.00	1.00	1.53	1.15	1.00	1.53	0.58	3.61	0.00	0.58	0.58	0.58	1.00	0.58	0.58	0.58	0.58	0.00	0.58	0.58	0.58	0.58	2.43	495		
700mOsM	Taken (g)	2.2382	2.2379	2.2379	2.2383	2.2383	2.2380	2.2376	2.2376	2.2380	2.2376	2.2381	2.2380	2.2380	2.2384	2.2182	2.2383	2.2380	2.2380	2.2380	2.2381	2.2381	2.2382	2.2382	698	704	
	Ave.(OsM)	697	704	697	700	699	692	700	698	694	694	698	698	697	695	701	696	698	700	699	699	699	699	696	698	704	
	SD	0.58	1.15	0.58	0.58	0.58	1.00	1.15	3.06	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	1.53	1.73	1.15	0.00	1.00	1.15	1.15	0.58	0.58	2.78	692		
750mOsM	Taken (g)	2.4101	2.4102	2.4098	2.4103	2.4103	2.4100	2.4087	2.4103	2.4100	2.4103	2.4110	2.4100	2.4100	2.4104	2.4154	2.4100	2.4100	2.4100	2.4101	2.4101	2.4102	2.4101	2.4101	750	760	
	Ave.(OsM)	750	760	752	751	752	742	747	750	744	747	751	748	746	752	754	751	751	750	751	752	752	748	750	750	760	
	SD	0.58	2.08	1.00	1.00	1.15	3.06	0.58	2.52	4.36	0.58	0.00	0.00	0.00	3.06	2.00	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	1.15	3.70	742	
1000mOsM	Taken (g)	3.2233	3.2232	3.2229	3.2229	3.2229	3.2229	3.2231	3.2228	3.2229	3.2228	3.2251	3.2230	3.2230	3.2228	3.2376	3.2233	3.2230	3.2230	3.2230	3.2234	3.2234	3.2227	1000	1028		
	Ave.(OsM)	999	1011	1000	1001	1001	982	1000	996	995	995	1003	993	989	1004	1016	999	998	1028	997	1000	1000	1000	1000	1000	1028	
	SD	1.00	3.06	0.58	0.58	1.15	1.73	0.00	5.86	3.21	0.00	0.58	0.58	0.00	1.15	3.06	1.00	3.06	0.00	2.65	0.00	1.53	9.68	982			
Physiological Saline	Exp.1	Ave.(OsM)	287	290	284	286	287	282	287	286	284	285	285	286	284	286	285	288	287	286	286	286	285	-	-	-	
		SD	0.58	2.65	2.65	0.58	0.00	1.53	1.53	2.65	0.00	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.00	0.58	-	-	
	Exp.2	Ave.(OsM)	287	290	287	285	287	283	287	285	284	287	285	285	286	285	286	288	286	288	286	287	286	284	-	-	
		SD	0.00	0.00	0.58	0.58	0.00	0.58	1.15	1.15	0.58	0.58	0.58	0.58	1.00	0.58	1.00	0.00	0.58	0.58	0.58	0.58	0.00	0.58	-	-	
Exp.3	Ave.(OsM)	288	292	284	285	287	284	288	285	284	288	285	286	286	285	290	285	288	288	288	288	286	284	-	-		
	SD	0.58	0.58	1.15	0.58	0.58	1.00	1.53	2.52	1.00	1.15	0.58	0.00	0.58	0.58	0.00	0.58	0.58	1.00	0.58	1.00	0.00	0.58	-	-		
	Ave.	287	291	285	285	287	283	287	285	284	287	285	286	286	285	287	285	288	287	286	287	286	284	286	291		
	SD	0.33	0.96	1.45	0.51	0.19	1.20	0.58	0.77	0.19	0.84	0.38	0.33	0.38	0.51	2.65	0.51	0.19	0.69	0.84	0.00	0.51	1.64	283			
JP *Glucose Injection ¹⁾	Diluted Soln.	Ave.(OsM)	293	-	290	289	289	290	299	288	290	291	292	295	-	289	298	-	293	294	292	297	296	293	299		
		SD	0.58	-	4.04	0.58	0.58	1.00	1.00	0.58	1.15	1.53	1.15	0.58	-	0.58	0.58	-	1.53	0.58	0.58	0.00	0.58	3.38	288		
	Intact Soln.	Ave.(OsM)	1407	-	1334	1333	1402	1426	1344	1338	1463	1422	1336	1418	-	1313	1477	-	-	1332	1452	1456	1364	1389	1477		
	SD	22.03	-	2.65	0.58	1.00	4.51	3.21	5.03	5.29	24.66	0.00	4.93	-	4.00	12.66	-	-	0.58	30.24	3.06	4.16	55.17	1313			
	Ave.(OsM)	0.83	-	0.87	0.87	0.83	0.81	0.89	0.86	0.79	0.82	0.88	0.83	-	0.88	0.81	-	-	0.88	0.81	0.82	0.87	0.84	0.89			
	SD	0.01	-	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	-	0.00	0.01	-	-	0.00	0.02	0.00	0.00	0.03	0.79			
High Osmolar Injections	Diluted Soln.	Ave.(OsM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	307 ²⁾	860 ³⁾	-	-	-	-	291 ⁴⁾	-	-	-	294 ⁵⁾	241 ⁶⁾	-	-		
		SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.58	7.09	-	-	-	-	0.00	-	-	-	0.58	0.58	-	-		
	Intact Soln.	Ave.(OsM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1768	-	-	-	1195	1163	-	-		
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.65	-	-	-	3.06	6.08	-	-			
	Ave.(OsM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.82	-	-	-	0.99	0.83	-	-			
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	-	-	-	0.00	0.00	-	-			

The collaborative study was performed by 17 laboratories, and in some laboratories measurements were done by different apparatus and/or in different days, which are indicated by the branched number.

1) JP *Glucose Injection* (20 w/v%, 20 mL), 2) Sulpyrine containing injection, 3) Antibiotics injection,

4) High calorie infusion, 5) Ascorbic acid injection, 6) Citicoline injection(40 w/v%)

Table 3 Summary of Osmolality Measurements for Osmolal Standard Solutions

Standard Sol.	$M \pm SD(\text{mOsM})$	$3\sigma(3\sigma/M, \%)$	$SD_i(\text{max})(CV)$	$M_{\min} \sim M_{\max}$	$DV_{\max} (\%)$
100 mOsM	99 ± 1.29	3.87(3.87%)	1.53(1.53%)	96~ 101	4(4.0%)
200 mOsM	199 ± 1.25	3.75(1.88%)	2.52(1.26%)	196~ 201	4(2.0%)
300 mOsM	298 ± 1.80	5.40(1.80%)	2.65(0.88%)	295~ 301	5(1.7%)
400 mOsM	399 ± 2.20	6.60(1.65%)	4.51(1.13%)	396~ 405	5(1.3%)
500 mOsM	499 ± 2.43	7.29(1.46%)	3.61(0.72%)	495~ 503	5(1.0%)
700 mOsM	698 ± 2.78	8.34(1.19%)	3.06(0.43%)	696~ 704	8(1.1%)
750 mOsM	750 ± 3.70	11.10(1.48%)	4.36(0.58%)	742~ 760	10(1.3%)
1000 mOsM	1000 ± 9.68	29.04(2.90%)	5.86(0.59%)	982~ 1028	28(2.8%)

$SD_i(\text{max})(CV)$: Maximum standard deviation (OsM) and its coefficient of variation(%) among 17 measurements for the respective osmolal standard solution.

$DV_{\max} (\%)$: Maximum deviation in OsM and percent(%) from the specified value for the respective osmolal standard solution among 17 measurements.

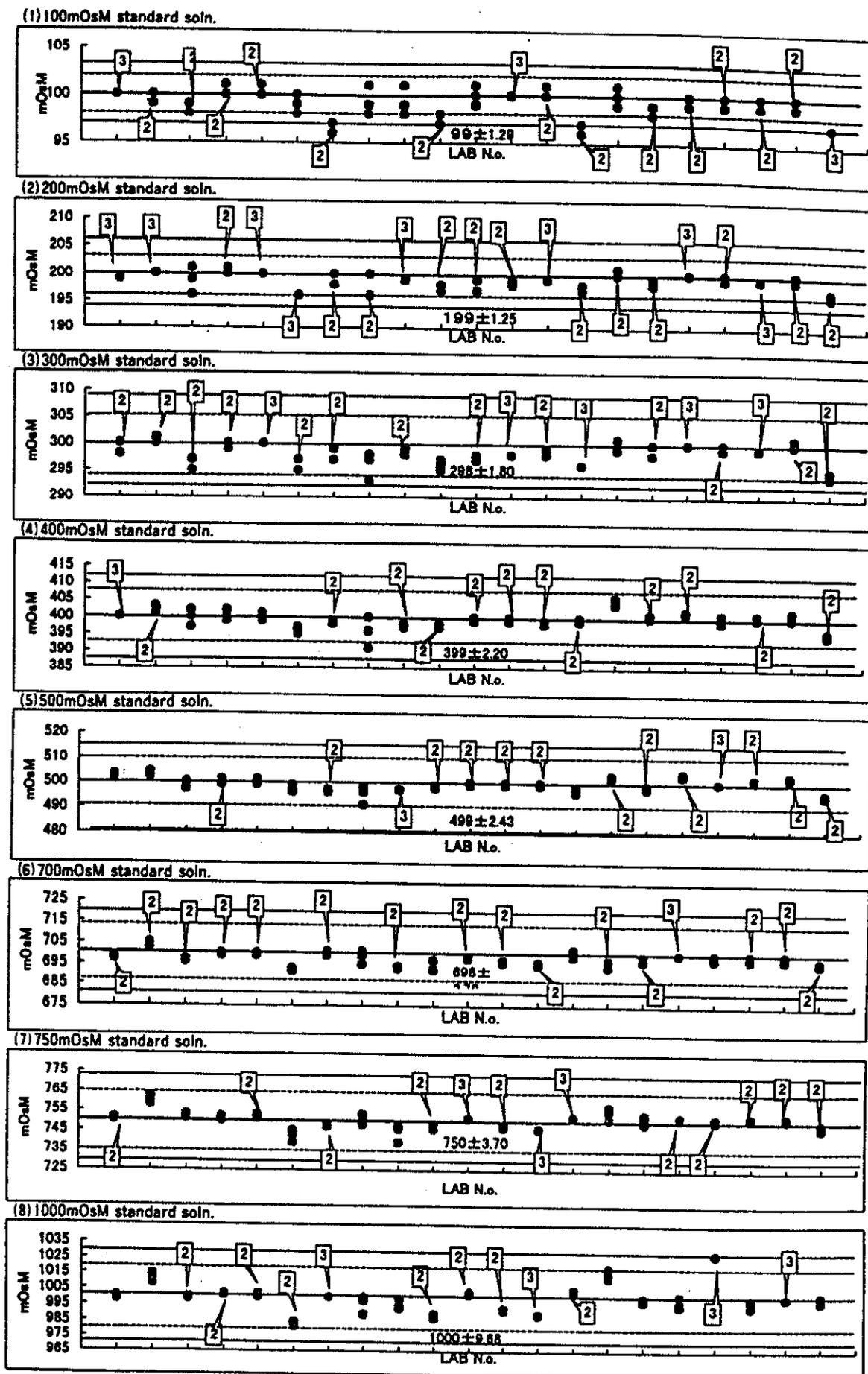


Fig. 1 Distribution Plots of Measured Osmolarities for the Respective Standard Solution

Number attached to each data point indicates the overlapping of measurement values in the respective laboratory.

Dotted lines drawn above and below the base line indicate 2.0% (—) and 3.0% (—) deviations from the required value. Mean value \pm the standard deviation is also shown.

分担研究報告書

生物薬品に関する試験方法ならびに各条の改正と国際調和に関する研究

1. エリスロポエチン製剤の品質評価試験法における等電点電気泳動法からキャピラリー電気泳動法への置き換えに関する国際共同研究
2. 第5次ヘパリン国際標準品設定のための国際共同研究

分担研究者 早川堯夫 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

研究要旨 1) エリスロポエチン (EPO) 製剤の品質評価試験法における等電点電気泳動法(IEF)からキャピラリー電気泳動法(CZE)への置き換えに関し、ヨーロッパ薬局方から呼びかけのあった国際共同研究に参加した。IEF と CZE は EPO のグリコフォームの分析において同様な結果を与えることが明らかとなった。CZE は再現性に優れ、感度もよいことから、分析法の改良を加えていくことによって、EPO の評価法としての有用性は高まるものと期待される。このような国際共同研究の成果は、将来 EPO を日局に収載する際の基礎的データとなるのみならず、局方各条の国際ハーモナイゼーションを促進するための基礎として極めて重要であると考えられる。

2) WHO の要請を受け 第5次未分画ヘパリン国際標準品策定の国際共同検定に参画した。第4次未分画ヘパリン国際標準品 82/502 を基準として、2種類のブタ粘膜由来未分画ヘパリン標準品候補A及びBの力価をアンチトロンピンを介したファクター Xa の阻害活性で測定した。また、参考として USP と EP の参照品の力価を同様の測定法で解析した。4回の繰り返し実験を行い、Aの力価を 2250 IU/ml、Bの力価を 2300 IU/ml と算出した。また、USP 及び EP の参照品の力価については、それぞれ 294 IU/ml 及び 891 IU/ml と算出された。以上の結果を、WHO へ報告した。

A. 研究目的

1. エリスロポエチン製剤の品質評価試験法における等電点電気泳動法からキャピラリー電気泳動法への置き換えに関する国際共同研究

バイオテクノロジーを応用した医薬品開発の進展はめざましく、生理活性を有する様々な糖タンパク質が新薬あるいは関連医薬品として開発・製造されている。遺伝子組換え糖タンパク質において、タンパク質部分の一次構造は挿入遺伝子によって決定されるが、糖鎖部分の構造は、生産細胞が有する糖転移酵素群の発現状

況に依存するため、細胞の種類、発現方法、培養条件などの要因によって左右される。また、糖タンパク質の各糖鎖結合部位に結合している糖鎖の構造には、常に多かれ少なかれ不均一性が存在する。さらに、糖鎖部分の構造は、生物活性、体内動態および安定性等に大きく寄与していることが明らかにされており、糖鎖含有タンパク質製剤を評価するにあたって、糖鎖部分の恒常性を正しく解析することが必要である。

エリスロポエチン(EPO)は、赤芽球細胞の分化増殖に不可欠な糖鎖含有ホルモ

ンで、組換え型ヒト EPO は、多くの透析患者によって貧血治療薬として用いられている。EPO には、3本のN-結合糖鎖と1本のO-結合糖鎖が結合しており、特に、N-結合糖鎖は EPO の生物活性並びに体内動態に大きく関与していることが報告されている。EPO 糖鎖部分の解析法としては、糖鎖部分を酵素的あるいは化学的に切り出し、蛍光標識後、HPLC によって分析する方法や、HPAEC-PAD 及び FACE などを用いる方法が検討されている。一方、糖鎖を切り出さずに、糖タンパク質のままグリコフォームを解析する方法として、現在、等電点電気泳動法(IEF)が用いられている。しかし、この方法は、操作が難しく、さらに定量性に欠けるといえる点が指摘されている。最近、キャピラリー電気泳動法(CZE)によって、EPO のグリコフォームが分離定量できることが報告された。そこで、European Pharmacopoeia Commission では、EPO の評価法として IEF に代わって CZE を導入することの可能性を探るため、日、欧、米の複数の研究機関に対して EPO の IEF 及び CZE の国際共同研究を呼びかけた。報告者も日本の1代表機関としてこの共同作業に参加したので、報告者自身の研究結果および国際共同研究の結果を報告する。

2. 第5次ヘパリン国際標準品設定のための国際共同研究

第4次未分画ヘパリン国際標準品である 82/502 は、Thomas らによって第3次国際標準品を基に 1983 年に設定された。この 82/502 は、世界各国の臨床薬や診断薬の力価測定のための基準として広く使用されてきた。しかしながら、この 82/502 の残量が少なくなってきたために、更新が必要となってきた。そこで、WHO 委託研究機関である英国の National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) が中心となって、第5次ヘパリン国際標準品設定のための国際共同研究が行われることになった。当研究者にも、NIBSC の Gray 及び Barrowcliffe 両博士より本国際共同研究に参加するように要請があり、未分画ヘパリン測定のための第5次国際標準品策定の共同研究に参加することにした。送付された

新たな標準品候補 A 及び B の力価をファクター Xa の活性阻害活性から求めることとした。

B. 研究方法

1. エリスロポエチン製剤の品質評価試験法における等電点電気泳動法からキャピラリー電気泳動法への置き換えに関する国際共同研究

(1)試薬および試料

1)試料

EPO 標準品 (BRP; 2 vial, 250 \square g/vial)及びテストサンプル (1 vial, 250 \square g/vial)は、European Pharmacopoeia Commission より供与された。バイアルの中の EPO の凍結乾燥品を 250 \square l の超純水で溶解し、Amicon Micro-10 tube を用いて脱塩した。さらに、その操作をもう一度繰り返し、超純水を加えて 276-280 nm の紫外吸収で 0.743 の値になるように試料を調製した。これは 1mg/ml の濃度に相当する。

2)試薬

等電点電気泳動用 pI マーカー (pH 2.5-6.5)及びアンフォライト (ファルマシア)、ウレア (ICN)、Coomassie Brilliant Blue R250 (フルカ)、アクリルアミド (ファルマシア)、ビスアクリルアミド (ファルマシア)、テトラメチレンジアミン (和光純薬)、過硫酸アンモニウム (Bio Rad) は市販の特級品を用いた。

(2)等電点電気泳動法 (IEF)

1)陽電解液

グルタミン酸 (14.71g) およびリン酸 (33 ml)を蒸留水に加えて 1000 ml に調製した。

2)陰電解液

アラニン (8.9 g) を蒸留水に加えて 1000 ml に調製した。

3)クマーシー染色液

Coomassie Brilliant Blue R250 を氷酢酸：メタノール：蒸留水=1：4：5 の溶液に溶かして 1.25 g/l の濃度とした。

4)脱色液

氷酢酸：メタノール：蒸留水=1：4：5 の混合溶液

5)固定化液

スルホサリチル酸 (35 g), トリクロ

ロ酢酸(100 g)を脱色液に加えて 1000 ml に調製した。

6)ポリアクリルアミドスラブゲルの調製
ウレア (9 g), 6.0 ml の 30 %アクリルアミド/ビスアクリルアミド (36.5:1), キャリアーアンフオライト(pH 3-10, 0.45 ml), 蒸留水 (13.5 ml) を混合させた後, 脱気した。その後, テトラメチルエチレンジアミン(15□), 過硫酸アンモニウム (100 g/l, 0.3 ml) を加えてゲルを調製した。

7)実験方法

等電点電気泳動用装置は ATTO 製 AE3235 型を用い, 電源装置は TOYO 製 SOLID STATE POWER SUPPLY PS-2515 型を用いた。ゲルに pH 勾配をつけるために陽電解液と陰電解液を電気泳動装置に満たし一定電力 (10W) で 1 時間予備泳動した後, PI マーカーと試料をそれぞれ 15□ ずつ載せ, 一定電力(10W)で 1 時間本泳動させた。その後, ゲルを取り出し, 固定化液 (200 ml) 中に浸し, 30 分間室温でインキュベートし, 同じ操作をもう一度繰り返し固定化させた。染色は, クマーシー染色液 200 ml に浸し, 30 分間, 室温でインキュベートした。脱色は, 上記の脱色液を用いて行った。その後, 島津製 CS-910 型デンシドメータを用いて各バンドのエリアを測定した。

(3)キャピラリー電気泳動法 (CZE)

装置は BeckmanP/ACE5010 型を使用し, キャピラリーは, 内径 50□m, 全長 107cm, 有効長 100 cm を使用した。緩衝液は 0.01 M 塩化ナトリウム, 0.01 M 酢酸ナトリウム, 7 M ウレア, 0.025 mM を含む 0.01 M トリシン緩衝液 (pH 5.5) を 30□で 2M 酢酸を用いて pH を調製した。検出は 214 nm の紫外吸収を用いた。印加電圧は 15.4 kv, 試料注入は圧力法で 15 秒間注入した。

(4) 国際共同研究

参加した研究機関は以下の通りである。

1. Dr. A. Bristow, Mr. N. Sutcliffe, NIBSC, UK

2. Dr. G. Zimmermann, and Dr. L.

Wieczorek, Boehringer Mannheim, Germany

3. Dr. S. Matsuki, Kirin Brewery co. Ltd., Japan

4. Dr. K. Grant, Dr. J. Nurzynski, and Dr. J. Cable, Therapeutic Goods Administration, Australia

5. Dr. M. Girard, Bureau of Drug Research, Canada

6. Dr. J. Dayan-Kenigsberg, Unite biologie/allergenes, France

7. Dr. N. Guzman, The RWJ Johnson Pharmaceutical Institute, USA

8. Dr. C. Serafini, Instituto di Ricerca Cesare Serono, Italy

9. Dr. A. Bayol, Sanofi Elf Bio Recherches, France

10. Dr. W. Skare, Statens Legemiddelkontroll, Norway

11. Dr. L. SJODIN, Lakemedelsverket Husargatan, Sweden

12. Dr. H. Windemann, Office Intercantonal de Controle des Medicaments OICM/IKS, Switzerland

13. Dr. C. Diez Masa, Consejo. Sup. Investig. Cientif. Spain

14. Dr. T. Hayakawa, National Institute of Health Sciences, Japan

15. Dr. F. Briancon, Dr. Charton, and Ms B. Wild, EDQM laboratory, France

2. 第5次ヘパリン国際標準品設定のための国際共同研究

(1)材料

NIBSC より送付されたヘパリンは以下のようなものであった。S: 第4次国際標準品 82/502、力価 1780IU/アンプル。A: 1つ目の第5次候補、ブタ粘膜由来未分画ヘパリン、推定力価 2000-2600 IU/アンプル。B: 2つ目の第5次候補ブタ粘膜由来未分画ヘパリン、推定力価 2000-2600 IU/アンプル。C: USP 参照品 Lot.K4、表示力価 359USP U/ml、推定力価 300-400 IU/アンプル。D: EP 参照品、ヘパリンナトリウムBRP バッチ2、表示力価 1044 IU/アンプル、推定力価 800-1200 IU/アンプル。

アンチトロンビンを含む血漿は、文書にて

インフォームドコンセントを得た健常人より 10mMクエン酸ナトリウム液(終濃度)を用いて末梢血を採血して分離した。ファクター Xa 及び発色合成基質 S2222 は、第一化学薬品より入手した。

(2) 抗ファクター Xa 活性によるヘパリンの力価測定

ヘパリンの力価測定は、アンチトロンビンがヘパリンと結合するとファクター Xa 活性を阻害することを利用した。ファクター Xa の活性は合成発色基質である S2222 を用いて測定した。第4次国際標準品は、300 倍に、候補A及び候補Bは 400 倍に、USP 参照品は 150 倍に、EP 参照品は 50 倍にそれぞれ希釈した。これらの測定に当たって、サンプリングの順序は以下のような NIBSC の指定の通りに行った。

1回目 2回目 3回目、4回目

S	S	S	S
A	B	C	D
B	A	B	A
C	D	A	B
D	C	A	B
B	A	B	A
A	B	C	D
S	S	S	S

以上のようにサンプリングした後、各ヘパリン液と、さらに2倍及び3倍希釈した液 10 μ l と、ヒト血漿 90 μ l とを混合する。さらに、酵素測定液 800 μ l をこれに添加し、37°C で5分間インキュベートする。これに、25 μ l のファクター Xa 液を加えて30秒後、温置した。さらに、この反応液に 50 μ l の基質 S2222 溶液を添加し、反応を開始する。60秒後に 333 μ l の酢酸液を添加して反応を停止し、反応液の 405nm における吸光度を測定する。希釈系列の直線部分の2点を用いてSに対するそれぞれの力価を計算した。

C. 研究結果

1. エリスロポエチン製剤の品質評価試験法における等電点電気泳動法からキャピラリー電気泳動法への置き換えに

関する国際共同研究

(1) 国際共同研究プロトコールに基づく EPO の IEF 及び CZE 結果

1) IEF

実験の部に記載した国際共同研究のプロトコールに従って、2種の EPO、すなわち BRP とテストサンプルについて IEF を行なった。各バンドは良好な分離を示すことが確認された (Fig. 1)。しかし、脱色段階のコントロールが難しく、含量が低いグリコフォームのバンドを検出することはできなかった。

各バンドのタンパク量をデンシドメーターで測定して、バンドごとの相対比を求めた結果を Table 1 にまとめる。再現性は比較的良好であることが確認された。

2) CZE

同様に国際共同研究プロトコールに準じて、EPO の BRP およびテストサンプルについて、CZE による分析を 12 回連続して行なった。Fig. 2a, 2b および 2c は、それぞれ1回目、5回目および12回目に行なった CZE の electrophoretogram を示している。各ピークの面積比と SD を Table 2 にまとめる。EPO の CZE では、Fig. 2a に示すように、分析開始当初は極めて高い分離能を示し、EPO のグリコフォームに基づく7本のピークがベースライン分離された。しかし、分析を繰り返すと、Fig. 2b に示すように泳動時間が次第に遅くなり、同時に、ピーク間の分離が顕著に低下することが明らかになった。さらに、Fig. 2c に示すように、12回目には EPO のグリコフォームは全く分離されず、1本のブロードなピークを与えるのみとなった。尚、本分析において使用したキャピラリーを 0.1N 水酸化ナトリウムや 0.1N 塩酸、メタノール等の溶液で洗浄し分離の回復を試みたが、いずれの場合にも改善は認められなかった。

(2) 国際共同研究結果

1) IEF の定性的分離および定量性

12 カ国 15 研究機関で実施した BRP およびテストサンプルの IEF の結果は、研究機関間において各種パラメーターの

ばらつき、すなわち、泳動距離、バンド幅、形、ゆがみ、バンド間の分離およびバックグラウンドの染色などの違いが認められるが、分離パターンは概ね一致していることが確認された。また、BRPからは、3～4本の主なバンドと2～3本のマイナーバンドが検出されることがわかった。これに対して、テストサンプルの electrophoretogram 上に検出されるバンドの数は BRP よりも少なく、両者を区別することが可能であった。

今回の国際共同研究に参加した各機関が、IEF によって分離検出された BPR 及びテストサンプルの各グリコフォームの相対強度をデンストメトリーによりそれぞれ算出した値を、Table 3 および Table 4 にまとめる。室内及び室間再現性は比較的良好であることがわかる。幾分、室内再現性の値に高くなる傾向が認められたが、これは、通常 IEF の SD は、少ない例数で算出されるためと考えられる。

2) CZE による定性的分離及び定量性

各機関によって得られた CZE の electrophoretogram のパターンは、IEF のパターンに比較的類似していることが確認された。研究機関間で、ピーク形、幅および retention time にばらつきが認められたが、検出されたピークの数ほぼ一致していた。また、CZE は、IEF では検出できないような2、3のマイナーピークも検出できることがわかった。

各機関による CZE の結果から得られた BPR およびテストサンプルの各グリコフォームの相対強度をそれぞれ Table 5 および Table 6 にまとめる。ピークの相対強度は各研究機関でほぼ一致していることがわかる。また、CZE の室内および室間再現性は良好であった。特に、研究室間におけるマイナーピークのばらつきは IEF の場合より小さいことが確認できる。主ピークの相対強度は IEF に比べて小さくなる傾向が認められるが、これは、CZE ではマイナーグリコフォームまで検出・定量できるのに対し、IEF およびその後のデンストメトリーではこれらが検出・定量できないことに起因す

るものと考えられる。

2. 第5次ヘパリン国際標準品設定のための国際共同研究

我々は、抗ファクター Xa 活性発色反応 (S2222 法) の系を用いて、様々な用量のヘパリン存在下に測定した。その結果、Fig.3 に示すように推定単位で 0.5 から 1.5 u/ml のヘパリンの範囲で直線的にファクター Xa の阻害が認められた。そこで、それぞれのヘパリン試料を推定単位で 0.5、1.0、1.5 IU/ml に希釈系列を作り、2/2用量反応より新標準品候補 A 及びBの力価を 82/502 の力価を基準として測定した。すなわち、0.5、1.0、1.5 IU/ml に希釈した 82/502 と平行性が得られた値を用いて、試料中のヘパリンの力価を計算した。その結果、4回の繰り返し実験より、Table7 に示すような各試料中のヘパリンの力価が得られた。候補 A は 2250 ± 94 IU/ml、候補Bは 2300 ± 560 IU/ml と計算された。候補Bのばらつきは非常に大きかったが、候補 A のばらつきは比較的少なかった。一方、同時に USP 標準品及び EP 標準品の力価についても同様に測定したところ、それぞれ 293 ± 34 IU/ml 及び 891 ± 130 IU/ml と計算された。

D. 考察

1) 報告者自身の研究結果および各機関の結果から、IEF と CZE は EPO のグリコフォームの分析において同様な結果を与えることが明らかとなった。IEF は一般に頑健性に欠け、デンストメトリーで定量した場合は再現性にも乏しいと見なされてきた。この意見に対しては、European Pharmacopoeia がこれまでに実施した IEF に関する共同研究結果、すなわち、IEF が somatropin CRS batch 1, EPO BRP batch 1 及び今回の研究において優れた頑健性を示したという結果が証明するように、IEF が非頑健的なのではなく、個人的な偏見であるという意見もあるようである。しかし、今回実際に行なってみると、IEF は分析に長時間を要すること、また、操作が煩雑で習熟を要することがわかった。従って、IEF はルーチン的な品質評価試験法としては適当ではないと考えられる。

一方、今回の研究により、CZE は再現性に優れ、感度もよいことが示された。一部の研究機関から、CZE は EPO の評価法として適さないとの意見も出されているが、CZE はまだ開発途上の技術であり、今後ますます改良が期待できる分析法である。今回のプロトコールの見直し、例えば、キャピラリーのコーティングあるいは緩衝液の変更等を行なうことによって、EPO の評価法としての有用性は高められるものと期待される。

2) 昨年 6 月、NIBSC より、各国の協同研究成果をまとめたレポートが報告された。それによると、今回共同研究に参加した各研究機関では 7 種類の異なるヘパリンの測定法が採用されていた。すなわち、Anti-Xa chromogenic assay (ANTI-XA)、Anti-IIa chromogenic assay (ANTI-IIA)、Activated partial thromboplastin Time (APTT)、Heptest、European Pharmacopoeia (EP)、United State Pharmacopoeia (USP)、Japanese Pharmacopoeia (JP) である。これらの方法を用いて、各参加研究機関では 4 回の独立した試験を行ったが、サンプルの希釈等はそれぞれの独立した試験ごとに行なった。3 つの機関が ANTI-IIA 法、10 機関が ANTI-XA、5 機関が APTT 法、7 機関が EP 法、3 機関が Heptest 法、9 機関が USP 法、1 機関が JP 法をそれぞれ採用していた。この中には、1 つの機関で複数の試験法を行った結果も含まれている。その結果を、まとめたのが Table 8 である。Table 8 より、候補 A 及び候補 B の平均値を求めると、 2032 ± 63 IU/ml 及び 2285 ± 113 IU/ml となる。このことは、候補 A 及び候補 B とも第 4 次国際標準品に対して相対力価を求めるとき、異なるアッセイ法の間でのばらつきが非常に少ないことを示している。また、各研究機関のアッセイ間のばらつきは、第 4 次国際標準品、USP 標準品、EP 標準品のいずれを用いた場合でも、10% 以下で非常に安定した結果であった。さらに、第 4 次国際標準品に対しての相対力価を求める際、それぞれのアッセイの傾きを比較し、各測

定法ごとにまとめたのが、Table 9 である。Table 9 より、候補 A 及び B ともいずれの測定法を用いても、第 4 次国際標準品に対する傾きは 1 近くに収斂していた。以上の結果は、候補 A 及び候補 B とも新規標準品として適切であるものと判断された。以上の結果に基づいて、各アンプル中の力価を求めたのが Table 10 である。一部のアッセイ法において直線性のばらつきが多かったりしたがその差は統計的に有意という程ではなく、両候補とも、第 5 次国際標準品として充分用いることが可能であり、その選択は WHO の国際会議の結果を受けて行われることになっている。

さらに、本国際共同研究において、USP 及び EP の第 4 次国際標準品に対する相対力価が求められた。全てを単純平均すると、その力価は 359 IU/ml 及び 1044 IU/ml と計算された。

E. 結論

1) EPO のグリコフォームの分析において CZE は、IEF と同様な結果を与えることが明らかとなった。また、CZE による EPO グリコフォームの解析法は再現性に優れ、感度もよいことから、今後分析法に改良を加えていくことによって、EPO の評価法としての有用性はさらに高まるものと期待される。

2) 2 種類のブタ粘膜由来未分画ヘパリン標準品候補 A 及び B の力価を測定したデータ及び寄せられた各参加研究機関の意見を基つき WHO Expert Committee on Biological Standardisation の会議は候補 A を未分画ヘパリンの第 5 次国際標準品とすることを決定した。その力価は 2031 IU/ml とし、候補 A にコード No として 97/578 を賦した。

研究発表

1. 論文発表 (国際共同研究報告)

1) Council of Europe, European pharmacopoeia commission, Group of experts No.6 (Biological substances):

Erythropoietin: Replacement of IEF by CZE: Report of Collaborative Study, PA/PH/Exp. 6/T (98) 56, October 1998

2) Gary, E., Walker, A.D., Barrowcliffe, T.W.: A collaborative study to establish the 5th international standard for unfractionated heparin. Report to Participants, June 1998

2. 学会発表

船窪 整, 田中日出美, 小田泰雄, 掛樋一晃, 森本和滋, 早川堯夫: キャピラリー電気泳動法による糖タンパク質性医薬品のバリデーションに関する基礎的検討. 第20回糖質シンポジウム, 1998年7月(札幌)

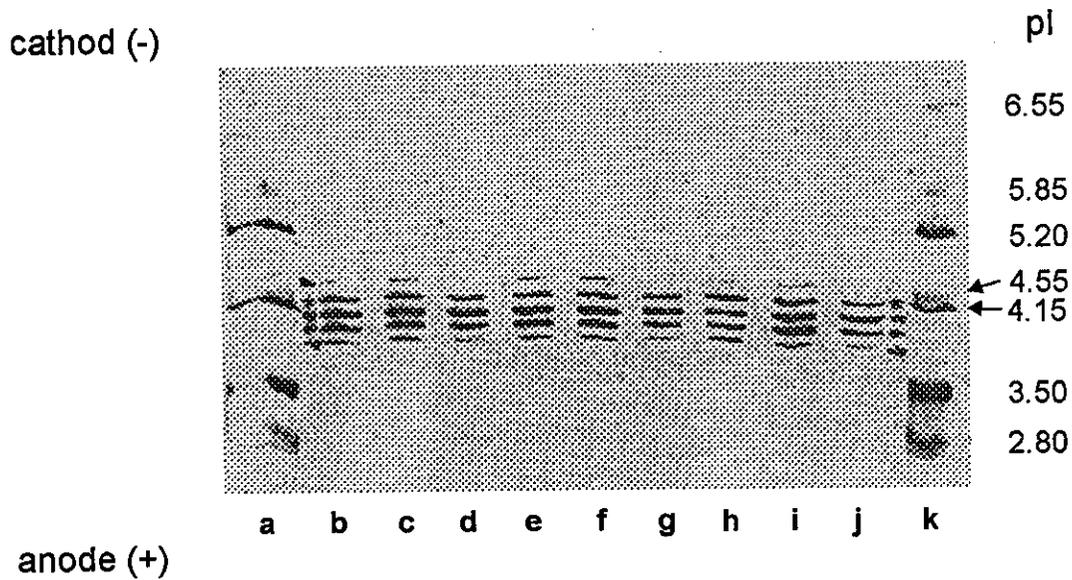


Fig. 1 Analysis of erythropoietin preparations by isoelectric focusing method using a slab gel. a), k) pI marker, b), e), h) std. solution 1, c), f), i) std. solution 2, d), g), j) test solution.

Table 1 Determination of glycoforms of standard erythropoietin preparations by isoelectric focusing method.

Glycoform number	1		2		3		4	
	%	S.D	%	S.D	%	S.D	%	S.D
Std. Solution	n.d.		2.00	0.44	5.01	0.87	21.20	1.11
Test Solution	n.d.		n.d.		n.d.		20.03	1.05

Glycoform number	5		6		7		8	
	%	S.D	%	S.D	%	S.D	%	S.D
Std. Solution	34.20	1.65	29.10	0.99	8.96	1.17	n.d.	
Test Solution	43.23	1.70	30.30	0.52	6.48	1.12	n.d.	

n.d.; not determined

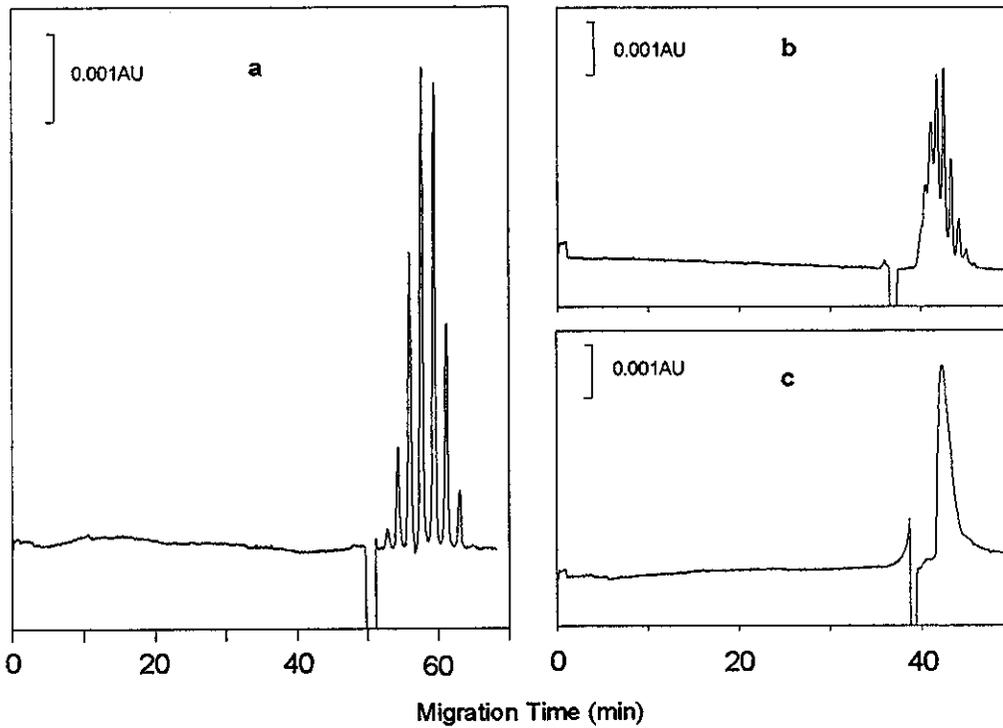


Fig. 2 Analysis of erythropoietin preparations by capillary electrophoresis. a) first analysis, b) the fifth analysis, c) the twelfth analysis. Analytical conditions: 0.01 M Tricine, 0.01 M NaCl, 0.01 M sodium acetate, 7 M urea, 0.025 mM putrescine (pH 5.5); fused silica capillary (50 μ m i.d., 107 cm, effective length 100 cm), Applied potential, 15.4 kV, Detection: UV absorption at 214 nm.

Table 2 Determination of glycoforms of standard erythropoietin preparations by capillary electrophoresis method.

Glycoform number	1		2		3		4	
	%	S.D	%	S.D	%	S.D	%	S.D
Std. Solution	n.d.		0.93	0.67	4.79	0.43	17.30	2.02
Test Solution	n.d.		n.d.		n.d.		14.83	3.47

Glycoform number	5		6		7		8	
	%	S.D	%	S.D	%	S.D	%	S.D
Std. Solution	30.93	1.26	31.80	3.07	16.60	1.77	0.72	0.20
Test Solution	32.30	0.36	34.77	3.00	18.10	0.81	n.d.	

n.d.; not determined

Table 3 Iso-electric focusing: summary of quantitative data
EP biological reference preparation.

	1		2		3		4		5		6		7		8	
	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
1	Quantitative data not obtained															
2			2.00	0.44	5.01	0.87	21.2	1.11	34.2	1.65	29.1	0.99	8.96	1.17		
3			1.48	0.65	4.35	0.71	20.23	1.55	32.02	1.65	30.23	1.4	11.72	1.91		
4					5.4	4.81	18.7	4.21	32.02	3.26	30.63	4.74	13.15	3.21		
5			0.96	0.23	5.06	1.01	24.98	1.60	36.63	0.87	27.03	1.03	5.84	0.78		
6			3.35	0.49	8.04	1.69	21.44	1.2	31.66	1.85	25.9	2.47	11.6	3		
7	0.74	0.15	2.45	0.25	6.69	0.79	20.67	0.31	29.34	1.09	27.39	0.62	02.61	0.61		
8	Quantitative data not obtained															
9	0.69	nd	1.51	nd	5.67	nd	23.89	1.46	32.96	1.39	27.05	1.70	9.06	0.86		
10			6.98	1.32	11.08	1.20	20.8	1.87	25.57	0.68	24.05	1.56	11.6	0.54		
11	Quantitative data not obtained															
12	1.25	0.95	3.22	1.02	7.7	0.89	20.3	0.66	27.98	1.79	25.53	1.52	12.95	0.37		
13			2.18	0.65	6.24	0.57	19.91	0.77	29.42	0.39	29.00	0.62	13.66	1.24		

Table 4 Iso-electric focusing: summary of quantitative data
Test sample.

	1		2		3		4		5		6		7		8	
	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
1	Quantitative data not obtained															
2							20.03	1.05	43.23	1.7	30.3	0.52	6.48	1.12		
3							18.72	2.3	37.0	4.15	33.22	2.15	11.16	1.69		
4							26.8	4.21	38.38	3.17	24.4	4.12	10.3	1.94		
5							25.55	5.89	40.48	1.27	28.72	4.13	5.25	2.03		
6							16.0	0.0	34.2	1.79	36.8	3.56	21	4.06		
7					2.0	0.05	21.14	0.20	32.67	0.41	30.30	0.39	13.90	0.52		
8	Quantitative data not reported															
9							22.83	1.42	38.15	0.50	29.86	1.12	9.02	0.53		
10							23.12	2.04	33.47	0.76	28.07	0.90	15.35	1.39		
11	Quantitative data not obtained															
12					2.63	0.67	21.33	1.25	31.45	2.19	29.22	2.56	13.38	0.83		
13					4.22	0.97	20.36	1.11	32.37	2.62	29.0	2.23	12.72	1.86		

Table 5 Capillary zone electrophoresis: summary of quantitative data
EP biological reference preparation.

	1		2		3		4		5		6		7		8	
	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
1	1.6	0.22	2.5	0.15	6.24	0.31	18.5	0.35	28.76	0.33	27.3	0.35	13.96	0.23	1.14	0.034
2			0.93	0.67	4.79	0.43	17.3	2.02	30.93	1.26	31.8	3.07	16.6	1.77	0.72	0.20
3	0.85	0.055	2.63	0.16	6.3	0.3	18.28	0.57	27.5	0.82	28.27	1.08	15.11	0.77	1.13	0.20
4	0.33	0.08	2.28	0.31	6.25	0.27	19.22	0.07	29.37	0.23	28.23	0.23	14.5	0.54		
5	0.08	0.14	2.83	0.10	6.33	0.28	18.95	0.23	28.82	0.48	28.13	0.62	14.3	0.35		
6	0.91	0.06	2.82	0.17	6.58	0.19	19.13	0.23	28.63	0.33	27.17	0.47	13.87	0.59	0.85	0.14
7	0.77	0.14	2.51	0.13	6.07	0.41	19.05	0.31	28.83	0.20	28.13	0.34	14.6	0.56		
8	Quantitative data not reported															
9	1.36	1.51	3.49	1.95	5.67	1.46	16.68	1.63	26.83	4.29	30.16	1.23	16.85	4.7	1.37	1.18
10	1.37	0.39	3.25	0.38	10.42	0.32	21.23	0.18	27.63	0.27	23.78	0.44	12.32	0.34		
11	1.65	1.07	3.9	0.57	6.62	0.34	09.02	0.60	28.02	0.83	27.03	0.55	14.42	0.95		
12	0.40	0.17	2.48	0.12	7.07	0.49	18.65	0.29	28.22	0.28	27.28	0.32	14.57	0.15	1.35	0.27
13	0.28	0.61	03.00	0.81	6.48	0.69	17.98	0.58	28.00	0.98	27.28	0.82	14.36	0.56		