

## ナルトグラスチム（遺伝子組換え）

Nartograstim (Genetical Recombination)

MAPTYRASSL PQSFLLKSLE QVRKIQGDGA ALQEKLCATY KLCHPEELVL  
 LGHSLGIPWA PLSSCPSQAL QLAGCLSQLH SGLFLYQGLL QALEGISPEL  
 GPTLDTLQLD VADFATTIWQ QMEELGMAPA LQPTQGAMPA FASAFQRRAG  
 GVLVASHLQS FLEVSYRVLR HLAQP

$C_{850}H_{1344}N_{226}O_{245}S_8$  : 18905.65

[134088-74-7]

本品の本質は、ヒト顆粒球コロニー刺激因子の類縁体で、1, 3, 4, 5及び17番目のトレオニン、ロイシン、グリシン、プロリン及びシステインをそれぞれアラニン、トレオニン、チロシン、アルギニン及びセリンに置換した顆粒球コロニー刺激因子をコードする遺伝子を導入した大腸菌で産生される175個のアミノ酸残基からなるたん白質である。

本品は、水溶液である。

本品は定量するとき、1mL当たり0.9～2.1mgのたん白質を含み、たん白質1mg当たり $4.0 \times 10^8$ 単位以上を含む。

**性状** 本品は無色澄明の液である。

### 確認試験

(1) 本品適量を量り、1mL中にたん白質1 $\mu$ gを含むようにpH8.0のトリス・塩化ナトリウム緩衝液を加え、試料溶液とする。抗原抗体反応試験用マイクロプレートのウェルに試料溶液0.1mLを加え、5℃で10時間以上静置した後、液を除き、洗浄操作を行う。次にウェルにナルトグラスチム試験用ブロッキング試液0.25mLを加え、室温で1時間放置する。ナルトグラスチム試験用ブロッキング試液を除いた後、ウェルにウサギ抗ナルトグラスチム抗体試液0.1mLを加え、室温で3時間穏やかに振り混ぜる。ウサギ抗ナルトグラスチム抗体試液を除いた後、洗浄操作を行う。次にペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体試液0.1mLをウェルに加え、室温で2時間穏やかに振り混ぜた後、液を除き、洗浄操作を行う。次にウェルに2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)二アンモニウム試液0.1mLを加え、室温で10分間放置した後、ウェルに薄めたシュウ酸二水和物溶液(1→50)0.1mLを加えて試料ウェルとする。別にpH8.0のトリス・塩化ナトリウム緩衝液0.1mLにつき、試料溶液と同様に操作し、対照ウェルとする。試料ウェルと対照ウェルを比較するとき、試料ウェルは緑色を呈し、対照ウェルは呈色しない。

洗浄操作：ウェルにナルトグラスチム試験用洗浄液0.25mLを加えて3分間放置した後、ナルトグラスチム試験用洗浄液を除く。更に同じ操作を2回繰り返す。

(2) 本品適量を量り、1mL中にたん白質1mgを含むように水を加える。この液2mLを用い、pH6.5のトリス・塩化カルシウム緩衝液に溶媒置換する。この液0.5mLにpH6.5のトリス・塩化カルシウム緩衝液0.5mLを加え、更にサーモリン溶液(1→1000)5 $\mu$ Lを加えて37℃で21時間静置し、試料溶液とする。別にナルトグラスチム標準品2mLをとり、試料溶液の調製法と同様に操作し、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液20 $\mu$ Lにつき、次の条件で液体クロマトグラフィー(2.01)により試験を行い、両者のクロマトグラムを比較するとき、同様の保持時間のところに同様のピークを認める。

#### 試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：220nm)

カラム：内径6mm、長さ15cmのステンレス管に5 $\mu$ mの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：35℃付近の一定温度

移動相A：水／トリフルオロ酢酸混液(1000：1)

移動相B：アセトニトリル／水／トリフルオロ酢酸混液(900：100：1)

移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のように変えて濃度勾配制御する。

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0～ 5	100	0
5～ 90	100→40	0→ 60

44 流量：毎分 1.0mL

45 システム適合性

46 システムの性能：標準溶液 20 $\mu$ Lにつき、上記の条件で操作するとき、隣り合うピークの分離度が 1.6 以上のピークは 15 個以上である。

49 pH (2.54) 7.0～7.5

50 **分子量** 本品適量を量り、1mL 中にたん白質約 0.5mg を含むようにナルトグラスチム試料用還元緩衝液を加え、試料溶液とする。別にナルトグラスチム試験用分子量マーカー50 $\mu$ L を量り、ナルトグラスチム試料用還元緩衝液を加えて 1.0mL とし、標準溶液とする。40 $^{\circ}$ C で 15 分間加温した試料溶液及び標準溶液 10 $\mu$ L につき、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動用緩衝液及びポリアクリルアミドゲルを用い、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により試験を行う。泳動分離後、ゲルをクーマシーブリリアントブルーR250 の水/エタノール(95)/酢酸(100)混液(5 : 4 : 1) 溶液(1→1000)に浸し、室温で 12 時間以上穏やかに振り混ぜて染色する。次に水/エタノール(95)/酢酸(100)混液(13 : 5 : 2)で脱色し、減圧下で乾燥する。標準溶液のナルトグラスチム試験用分子量マーカーの泳動バンドにつき、横軸を移動距離、縦軸を分子量の対数とする検量線を作成し、試料溶液の分子量を求めるとき、主バンドの分子量は 17000～19000 である。

59 試験条件

60 ポリアクリルアミドゲル：pH8.8 の 1.5mol/L トリス緩衝液中でアクリルアミド濃度 14%及びラウリル硫酸ナトリウム濃度 0.1%となるようペルオキシ二硫酸アンモニウム及び *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミンを用いて調製した分離ゲルと pH6.8 の 0.5mol/L トリス緩衝液中でアクリルアミド濃度 5%及びラウリル硫酸ナトリウム濃度 0.1%となるようペルオキシ二硫酸アンモニウム及び *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミンを用いて調製した濃縮ゲルからなる。

65 **純度試験** 類縁物質 本品適量を量り、1mL 中にたん白質約 0.5mg を含むようにナルトグラスチム試料用緩衝液を加え、試料溶液とする。試料溶液 1mL を正確に量り、ナルトグラスチム試料用緩衝液を加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 $\mu$ L ずつ正確にとり、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動用緩衝液及びポリアクリルアミドゲルを用い、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により試験を行う。泳動分離後、ゲルをクーマシーブリリアントブルーR250 の水/エタノール(95)/酢酸(100)混液(5 : 4 : 1)溶液(1→1000)に浸し、室温で 12 時間以上穏やかに振り混ぜて染色する。次に水/エタノール(95)/酢酸(100)混液(13 : 5 : 2)で脱色し、減圧下で乾燥する。試料溶液及び標準溶液から得た泳動バンドの面積をデンストメーターにより測定波長 560nm、対照波長 400nm で測定するとき、試料溶液の主バンド以外のバンドの合計面積は、標準溶液のバンドの面積より大きくない。

73 試験条件

74 ポリアクリルアミドゲル：pH8.8 の 1.5mol/L トリス緩衝液中でアクリルアミド濃度 14%及びラウリル硫酸ナトリウム濃度 0.1%となるようペルオキシ二硫酸アンモニウム及び *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミンを用いて調製した分離ゲルと pH6.8 の 0.5mol/L トリス緩衝液中でアクリルアミド濃度 5%及びラウリル硫酸ナトリウム濃度 0.1%となるようペルオキシ二硫酸アンモニウム及び *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミンを用いて調製した濃縮ゲルからなる。

79 **エンドキシン** (4.01) 0.62EU/ $\mu$ g 未満。

80 **類縁体の組成比** 別に規定する。

### 81 定量法

82 (1) たん白質含量 本品  $V_1$  mL を正確に量り、1mL 中にたん白質約 0.5mg を含むように水  $V_2$  mL を正確に加え、遠心分離する。上澄液につき、紫外可視吸光度測定法 (2.24) により試験を行い、波長 280nm 付近の吸収極大の波長における吸光度  $A$  を測定する。

85 本品 1mL 中のナルトグラスチム(遺伝子組換え)の量(mg) =  $A/8.71 \times (V_1 + V_2)/V_1 \times 10$

86 8.71 : 比吸光度

87 (2) 比活性 予測された力価に基づき、本品適量を正確に量り、標準溶液の相対力価の 50~150%の範囲となるよ  
 88 うにナルトグラスチム試験用力価測定培地を加え、試料溶液とする。別にナルトグラスチム標準品適量を正確に量り、  
 89 表示単位に従い 1mL 中にナルトグラスチム  $1.2 \times 10^4$  単位を含む液となるようにナルトグラスチム試験用力価測定培  
 90 地を正確に加え、標準溶液とする。NFS60 細胞をナルトグラスチム試験用継代培地で培養する。この液を遠心分離  
 91 し、上澄液を吸引除去した後、ナルトグラスチム試験用力価測定培地を加えて洗浄する。洗浄操作を 3 回繰り返した  
 92 後、1mL 中に細胞  $8 \times 10^5$  個及び  $4 \times 10^5$  個を含むようにナルトグラスチム試験用力価測定培地を加え、それぞれ細胞  
 93 懸濁液(1)及び細胞懸濁液(2)とする。次に 8 行×12 列(96 ウェル)のマイクロプレートの 12 列目の全ウェルに細胞懸  
 94 濁液(1)50 $\mu$ L を分注し、1~11 列の全ウェルには細胞懸濁液(2)50 $\mu$ L を分注する(ただし、1 行目と 8 行目のウェルは  
 95 試験に用いない)。次に 12 列目の 2~4 行のウェルに標準溶液 50 $\mu$ L を加え、5~7 行のウェルに試料溶液 50 $\mu$ L を加  
 96 える。次いで 12 列目から 50 $\mu$ L をとり、1 列目の対応する行のウェルに入れる。次に 1 列目から 50 $\mu$ L をとり、2 列  
 97 目に入れ、順次 10 列目まで同様の操作を行い、2 倍段階希釈ウェルを調製する。11 列目は操作しない。これを 5vol%  
 98 二酸化炭素を含む空气中 37 $^{\circ}$ C で約 40 時間培養する。培養後、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフ  
 99 フェニル-2H-テトラゾリウム臭化物試液 10 $\mu$ L を全ウェルに添加し、5vol% 二酸化炭素を含む空气中 37 $^{\circ}$ C で 4~6 時  
 100 間放置する。ジメチルスルホキシド 0.125mL を加えて 5~10 分間振り混ぜた液につき、マイクロプレート用分光光  
 101 度計により波長 550nm 及び波長 660nm における吸光度  $A_1$  及び  $A_2$  を測定し、その差( $A_1 - A_2$ )を求める。11 列目及  
 102 び 1 列目の標準溶液を添加した行の合計 6 ウェルの吸光度差( $A_1 - A_2$ )の総和を 6 で除し、50%吸光度値  $A_M$  とする。  
 103 別に試料溶液及び標準溶液のそれぞれにつき、この 50%吸光度値  $A_M$  をはさむ前後の希釈列べき指数(列番号) $m_{T1}$ ,  $m_{T2}$   
 104 及び  $m_{S1}$ ,  $m_{S2}$  を求める。ただし  $m_{T1} < m_{T2}$  及び  $m_{S1} < m_{S2}$  である。この各希釈列の吸光度差をそれぞれ  $A_{T1}$ ,  $A_{T2}$  及び  $A_{S1}$ ,  
 105  $A_{S2}$  とする。次式により 3 個の標準溶液の平均値を用い、試料溶液それぞれの相対力価を求め、平均する。同様の操  
 106 作を標準溶液と試料溶液の位置を入れ換えて行う。両者を平均して平均相対力価を求める。

$$107 \text{ 試料溶液の相対力価} = \frac{2^a}{\Sigma 2^b \times \frac{1}{3}}$$

$$108 \quad a : m_{T1} + (A_{T1} - A_M) / (A_{T1} - A_{T2})$$

$$109 \quad b : m_{S1} + (A_{S1} - A_M) / (A_{S1} - A_{S2})$$

110 次式により 1mL 中のナルトグラスチム(遺伝子組換え)の力価を求める。

$$111 \text{ 本品 1mL 中のナルトグラスチム(遺伝子組換え)の力価(単位)} = S \times \text{試料溶液の平均相対力価} \times d$$

112  $S$ : 標準溶液の濃度(単位/mL)

113  $d$ : 試料溶液を調製したときの希釈倍数

114 別途求めたたん白質含量を用い比活性を求める。

$$115 \text{ 本品の比活性} = \frac{\text{本品 1mL 中のナルトグラスチム(遺伝子組換え)の力価(単位)}}{\text{本品 1mL 中のナルトグラスチム(遺伝子組換え)のたん白質含量(mg)}}$$

116 システム適合性

117 標準溶液のマイクロプレート上の希釈系列の中で、3 列目の各ウェルの吸光度差は  $A_M$  以上であり、8 列目の各  
 118 ウェルの吸光度差は  $A_M$  以下でなくてはならない。この基準を満たさないとき、 $1.0 \times 10^3 \sim 1.6 \times 10^4$  単位の範  
 119 囲で標準溶液を調製し、試験を行う。

120 貯法

121 保存条件 遮光して  $-20^{\circ}$ C 以下で保存する。

122 容器 気密容器。

123 -----

124 9.01 標準品の(1)の項に次を追加する。

125 ナルトグラスチム標準品

126 9.41 試薬・試液の項に次を追加する。

127 2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ニアンモニウム  $C_{18}H_{16}N_4O_6S_4 \cdot (NH_4)_2$  帯青緑色の結晶  
 128 性の粉末である。

- 129 融点 (2.60) 約 330°C(分解).
- 130 **2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ニアンモニウム試液** クエン酸一水和物 5.3g を水に溶か  
131 し, 500mLとした液に, 無水リン酸水素二ナトリウム 7.1g を水に溶かし, 500mLとした液を加えて pH4.3 に調  
132 整する. この液 20mLに 2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ニアンモニウム 15mg を  
133 溶かし, 用時, 過酸化水素試液 14 $\mu$ Lを加える.
- 134 **ウサギ抗ナルトグラスチム抗体** 「ナルトグラスチム(遺伝子組換え)」でウサギを免疫して得た抗血清より調製した抗  
135 体を pH8.0のトリス・酢酸緩衝液に溶かし, 1mL中にウサギ抗ナルトグラスチム抗体 1mg を含むように調製する.  
136 -80°Cで保存する.  
137 **性能試験** オクタロニー法により試験を行うとき, 「ナルトグラスチム(遺伝子組換え)」との間に沈降線を生じる.  
138 **たん白質濃度** 紫外可視吸光度測定法 (2.24) により, 波長 280nm における吸光度を測定し, 比吸光度  $E_{1\text{cm}}^{1\%}15$  を  
139 用いてたん白質濃度を算出する.
- 140 **ウサギ抗ナルトグラスチム抗体試液** ウサギ抗ナルトグラスチム抗体に 1mL 中にウサギ抗ナルトグラスチム抗体  
141 0.2 $\mu$ g を含む液となるようにナルトグラスチム試験用ウシ血清アルブミン試液を加える. 用時製する.
- 142 **ウシ血清アルブミン試液, ナルトグラスチム試験用** ウシ血清アルブミン 0.5g 及びポリソルベート 20 0.5mL をリン酸塩  
143 緩衝塩化ナトリウム試液に溶かし, 500mL とする.
- 144 **NFS60 細胞** レトロウイルス(Cas-Br-M)を感染させた白血病マウスより製する. J. N. Ihle らが確立した株(*Proc.*  
145 *Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6687, (1985))をナルトグラスチム試験用継代培地で馴化させたものを小分けして  
146 液体窒素下に凍結保存したもの.
- 147 **還元緩衝液, ナルトグラスチム試料用** ラウリル硫酸ナトリウム溶液(1 $\rightarrow$ 10)0.8mL, pH6.8 の 0.5mol/L トリス緩衝液  
148 0.5mL, グリセリン 0.4mL, 2-メルカプトエタノール 0.3mL, ブロモフェノールブルー溶液(1 $\rightarrow$ 200)0.1mL を混  
149 合する. 用時製する.
- 150 **緩衝液, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動用** グリシン 14.4g, 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパン  
151 ジオール 3.0g 及びラウリル硫酸ナトリウム 1.0g を水に溶かし, 1000mL とする.
- 152 **緩衝液, ナルトグラスチム試料用** ラウリル硫酸ナトリウム溶液(1 $\rightarrow$ 10)0.8mL, pH6.8 の 0.5mol/L トリス緩衝液  
153 0.5mL, グリセリン 0.4mL, ブロモフェノールブルー溶液(1 $\rightarrow$ 200)0.1mL を混合する. 用時製する.
- 154 **継代培地, ナルトグラスチム試験用** 「ナルトグラスチム(遺伝子組換え)」0.20mg に対応する量をリン酸塩緩衝塩化ナ  
155 トリウム試液 20mL に溶かす. この液 0.1mL にナルトグラスチム試験用力価測定培地 100mL を加える.
- 156 **サーモリシン** たん白質 1mg 中に 50~100 単位の活性を有したもの.  
157 由来: *Bacillus thermoproteolyticus rokko*
- 158 **洗浄液, ナルトグラスチム試験用** ポリソルベート 20 1mL をリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液に溶かし, 1000mL と  
159 する.
- 160 **トリス・塩化カルシウム緩衝液, pH6.5** 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 6.1g 及び塩化カル  
161 シウム二水和物 15mg を水 800mL に溶かし, 希塩酸を加えて pH6.5 に調整し, 水を加えて 1000mL とする.
- 162 **トリス・塩化ナトリウム緩衝液, pH8.0** 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 2.42g 及び塩化ナト  
163 リウム 1.64g を水 900mL に溶かし, 希塩酸を加えて pH8.0 に調整し, 水を加えて 1000mL とする.
- 164 **トリス・酢酸緩衝液, pH8.0** 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 1.2g を水 800mL に溶かし,  
165 酢酸(100)を加えて pH8.0 に調整し, 水を加えて 1000mL とする.
- 166 **ブロッキング試液, ナルトグラスチム試験用** ウシ血清アルブミン 1.0g をリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液に溶かし,  
167 100mL とする.
- 168 **分子量マーカー, ナルトグラスチム試験用** 以下に示すたん白質を含む溶液である.  
169 卵白アルブミン, 炭酸脱水酵素, 大豆トリプシンインヒビター, リゾチーム
- 170 **ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体** ウサギ免疫グロブリン G を小動物に免疫し, 抗血清を得る. この液をウサギ免  
171 疫グロブリン G 固定化カラムによるアフィニティークロマトグラフィーで処理し, 特異抗体を得る. 次に過ヨウ素  
172 酸法でペルオキシダーゼを標識することにより製する.

173 **ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体試液** ウシ血清アルブミン 0.10g をリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液に溶か  
174 し、100mL とする。この液 15mL にペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体 5 $\mu$ L を加える。用時製する。

175 **マイクロプレート, 抗原抗体反応試験用** ポリスチレン製で抗原抗体反応試験用に製造したもの。

176 **性能** 免疫グロブリン G の結合能の変動係数は 5%以下であり、各ウェルの結合能は平均値の 10%以内の範囲で  
177 ある。

178 **力価測定培地, ナルトグラスチム試験用** RPMI-1640 培地 10.4g を適量の水に溶かし、炭酸水素ナトリウム溶液(3→  
179 40)16mL を加え、水を加えて 1000mL とした後、二酸化炭素を吹き込み、pH7.0 に調整し、ろ過滅菌する。この  
180 液 90mL に 56°C で 30 分間加温したウシ胎児血清 10mL、ベンジルペニシリンカリウム  $1.0 \times 10^5$  単位及びストレプ  
181 トマイシン硫酸塩 0.1g(力価)を生理食塩液 10mL に溶かした液 1mL 及び 2-メルカプトエタノール溶液(9→  
182 125)5 $\mu$ L を加えた後、ろ過滅菌する。

183

184