

1 ナルトグラスチム(遺伝子組換え)

2 Nartograstim(Genetical Recombination)

3 次のように改める。

MAPTYRASSL PQSFLKLSLE QVRKIQGDGA ALQEKLCATY KLCHPEELVL
 LGHSLGIPWA PLSSCPSQAL QLAGCLSQLH SGLFLYQGLL QALEGISPEL
 GPTLDTLQLD VADFATTIWQ QMEELGMAPA LQPTQGAMPA FASAFQRRAG

4 GVLVASHLQS FLEVSRYVLR HLAQP

5 C₈₅₀H₁₃₄₄N₂₂₆O₂₄₅S₈ : 18905.65

6 [134088-74-7]

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、
 8 1, 3, 4, 5及び17番目のトレオニン, ロイシン, グリシン,
 9 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,
 10 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
 11 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
 12 175個のアミノ酸残基からなるタンパク質である。本品は水
 13 溶液である。

14 本品は定量するとき、1 mL当たり0.9~2.1 mgのタンパク
 15 質を含み、タンパク質1 mg当たり4.0×10⁸単位以上を含む。

16 性状 本品は無色澄明の液である。

17 確認試験

18 (1) 本品適量を量り、1 mL中にタンパク質1 µgを含む液
 19 となるようにpH8.0のトリス・塩化ナトリウム緩衝液を加え、
 20 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
 21 ェルに試料溶液0.1 mLを加え、5°Cで10時間以上静置した後、
 22 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
 23 試験用ブロッキング試液0.25 mLを加え、室温で1時間放置
 24 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、
 25 ウェルにウサギ抗ナルトグラスチム抗体試液0.1 mLを加え、
 26 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
 27 抗体試液を除いた後、洗浄操作を行う。次にペルオキシダ
 28 ーゼ標識抗ウサギ抗体試液0.1 mLをウェルに加え、室温で2
 29 時間穏やかに振り混ぜた後、液を除き、洗浄操作を行う。次
 30 にウェルに2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-
 31 6-スルホン酸)二アンモニウム試液0.1 mLを加え、室温で
 32 10分間放置した後、ウェルにシュウ酸二水和物溶液(1→
 33 50)0.1 mLを加えて試料ウェルとする。別にpH8.0のトリ
 34 ス・塩化ナトリウム緩衝液0.1 mLにつき、試料溶液と同様
 35 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
 36 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
 37 ない。

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

41 (2) 本品適量を量り、1 mL中にタンパク質1 mgを含む液
 42 となるように水を加える。この液2 mLを用い、pH6.5のト
 43 リス・塩化カルシウム緩衝液に溶媒置換する。この液0.5
 44 mLにpH6.5のトリス・塩化カルシウム緩衝液0.5 mLを加え、
 45 更にサーモリン溶液(1→1000)5 µLを加えて37°Cで21時間
 46 静置し、試料溶液とする。別にナルトグラスチム標準品2
 47 mLを量り、試料溶液と同様に操作し、標準溶液とする。試

48 料溶液及び標準溶液20 µLにつき、次の条件で液体クロマト
 49 グラフィー (2.01) により試験を行い、両者のクロマトグラ
 50 ムを比較するとき、同一の保持時間のところに同様のピーク
 51 を認める。

52 試験条件

53 検出器：紫外吸光度計(測定波長：220 nm)

54 カラム：内径6 mm, 長さ15 cmのステンレス管に5 µm
 55 の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シ
 56 リカゲルを充填する。

57 カラム温度：35°C付近の一定温度

58 移動相A：水/トリフルオロ酢酸混液(1000 : 1)

59 移動相B：アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸混液
 60 (900 : 100 : 1)

61 移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のよ
 62 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

63 流量：毎分1.0 mL

64 システム適合性

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

68 pH (2.54) 7.0~7.5

69 純度試験

70 (1) 類縁物質 本品適量を量り、1 mL中にタンパク質約
 71 0.5 mgを含む液となるようにナルトグラスチム試料用緩衝
 72 液を加え、試料溶液とする。試料溶液1mLを正確に量り、
 73 ナルトグラスチム試料用緩衝液を加えて正確に100 mLとし、
 74 標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液10 µLずつを正確に
 75 とり、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動用緩衝液及び
 76 ナルトグラスチム用ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳
 77 動を行った後、ゲルをクーマシーブリリアントブルーR-
 78 250の水/エタノール(95)/酢酸(100)混液(5 : 4 : 1)溶液(1
 79 →1000)に浸し、室温で12時間以上穏やかに振り混ぜて染色
 80 する。次に水/エタノール(95)/酢酸(100)混液(13 : 5 : 2)
 81 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
 82 た泳動バンドの面積をデンスitomーターにより測定波長560
 83 nm, 対照波長400 nmで測定するとき、試料溶液の主バンド
 84 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
 85 きくない。

86 (2) 宿主由来タンパク質 別に規定する。

87 (3) DNA 別に規定する。

88 エンドトキシン (4.01) 0.62EU/µg未満。

89 分子量 本品適量を量り、1 mL中にタンパク質約0.5 mgを含
 90 む液となるようにナルトグラスチム試料用還元緩衝液を加え、
 91 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
 92 ー50 µLを量り、ナルトグラスチム試料用還元緩衝液を加え
 93 て1.0 mLとし、標準溶液とする。40°Cで15分間加温した試
 94 料溶液及び標準溶液10 µLにつき、SDSポリアクリルアミド
 95 ゲル電気泳動用緩衝液及びナルトグラスチム用ポリアクリル
 96 アミドゲルを用いて電気泳動を行った後、ゲルをクーマシー

2 ナルトグラスチム(遺伝子組換え) (116-1112.pdf)

97 ブリリアントブルーR-250の水/エタノール(95)/酢酸
98 (100)混液(5:4:1)溶液(1→1000)に浸し、室温で12時間穏
99 やかに振り混ぜて染色する。次に水/エタノール(95)/酢酸
100 (100)混液(13:5:2)で脱色し、減圧下で乾燥する。標準溶
101 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
102 つき、横軸を移動距離、縦軸を分子量の対数とする検量線
103 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
104 は17000~19000である。

105 類縁体の組成比 別に規定する。

106 定量法

107 (1) タンパク質含量 本品 V_1 mLを正確に量り、1 mL中
108 にタンパク質約0.5 mgを含む液となるように水 V_2 mLを正確
109 に加え、遠心分離する。上澄液につき、紫外可視吸光度測定
110 法 (2.24) により試験を行い、波長280 nm付近の吸収極大の
111 波長における吸光度 A を測定する。

112 本品1 mL中のタンパク質量(mg)
113 $= A / 8.71 \times (V_1 + V_2) / V_1 \times 10$

114 8.71 : 比吸光度

115 (2) 比活性 予測された力価に基づき、本品適量を正確に
116 量り、標準溶液の相対力価の50~150%の範囲となるように
117 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
118 る。別にナルトグラスチム標準品適量を正確に量り、1 mL
119 中にナルトグラスチム 1.2×10^4 単位を含む液となるようにナル
120 トグラスチム試験用力価測定培地を正確に加え、標準溶液
121 とする。NFS60細胞をナルトグラスチム試験用継代培地で
122 培養する。この液を遠心分離し、上澄液を吸引除去した後、
123 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
124 浄操作を3回繰り返した後、1 mL中に細胞 8×10^5 個及び $4 \times$
125 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
126 加え、それぞれ細胞懸濁液(1)及び細胞懸濁液(2)とする。次
127 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
128 エルに細胞懸濁液(1)50 μ Lを分注し、1~11列の全ウェルに
129 は細胞懸濁液(2)50 μ Lを分注する(ただし、1行目と8行目の
130 ウェルは試験に用いない)。次に12列目の2~4行のウェルに
131 標準溶液50 μ Lを加え、5~7行のウェルに試料溶液50 μ Lを
132 加える。次いで12列目から50 μ Lをとり、1列目の対応する
133 行のウェルに入れる。次に1列目から50 μ Lをとり、2列目に
134 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
135 ルを調製する。11列目は操作しない。これを5 vol%二酸化
136 炭素を含む空气中37°Cで約40時間培養する。培養後、3-
137 (4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニル-
138 2H-テトラゾリウム臭化物試液10 μ Lを全ウェルに添加し、
139 5vol%二酸化炭素を含む空气中37°Cで4~6時間放置する。
140 ジメチルスルホキシド0.125 mLを加えて5~10分間振り混
141 ぜた液につき、マイクロプレート用分光光度計により波長
142 550 nm及び波長660 nmにおける吸光度 A_1 及び A_2 を測定し、
143 その差($A_1 - A_2$)を求める。11列目及び1列目の標準溶液を添
144 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、
145 50%吸光度値 A_M とする。別に試料溶液及び標準溶液のそれ
146 ぞれにつき、この50%吸光度値 A_M をはさむ前後の希釈列ベ
147 き指数(列番号) n_{T1} 、 n_{T2} 及び n_{S1} 、 n_{S2} を求める。ただし $n_{T1} <$
148 n_{T2} 及び $n_{S1} < n_{S2}$ である。この各希釈列の吸光度差をそれぞ

149 れ A_{T1} 、 A_{T2} 及び A_{S1} 、 A_{S2} とする。次式により3個の標準溶液
150 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
151 する。同様の操作を標準溶液と試料溶液の位置を入れ換えて
152 行う。両者を平均して平均相対力価を求める。

$$153 \text{ 試料溶液の相対力価} = \frac{2^a}{\Sigma 2^b \times \frac{1}{3}}$$

$$154 a : n_{T1} + (A_{T1} - A_M) / (A_{T1} - A_{T2})$$

$$155 b : n_{S1} + (A_{S1} - A_M) / (A_{S1} - A_{S2})$$

156 次式により1 mL中のナルトグラスチム(遺伝子組換え)の
157 力価を求め、(1)で求めたタンパク質含量からタンパク質1
158 mg当たりの力価を算出する。

159 本品1 mL中のナルトグラスチム(遺伝子組換え)の量(単位)
160 $= S \times \text{試料溶液の平均相対力価} \times d$

161 S : 標準溶液の濃度(単位/mL)

162 d : 試料溶液を調製したときの希釈倍数

163 システム適合性

164 標準溶液のマイクロプレート上の希釈系列の中で、3列
165 目の各ウェルの吸光度差は A_M 以上であり、8列目の各
166 ウェルの吸光度差は A_M 以下でなくてはならない。こ
167 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
168 範囲で標準溶液を調製し、試験を行う。

169 貯法

170 保存条件 遮光して -20°C 以下で保存する。

171 容器 気密容器。

9. 4.1 試薬・試液の項に次を追加する。

176 ポリアクリルアミドゲル、ナルトグラスチム用 分離ゲルの
177 アクリルアミド濃度を14%としたポリアクリルアミドゲル。