

1 ヘパリンカルシウム

2 抗第Xa因子活性・抗第IIa因子活性比及び定量法(1)の項を
3 次のように改める。

4 抗第Xa因子活性・抗第IIa因子活性比 次の方法により測定し
5 た抗第Xa因子活性を、定量法で得た抗第IIa因子活性で除し、
6 抗第Xa因子活性・抗第IIa因子活性比を求めるとき、0.9～
7 1.1である。

8 抗第Xa因子活性測定法

9 (i) 基質液 *N*-ベンゾイル-L-イソロイシル-L-グル
10 タミル(γ -OR)-グリシル-L-アルギニル-p-ニトロア
11 ニリド塩酸塩25 mgを水33.3 mLに溶かす。

12 (ii) アンチトロンビン液 ヒト由来アンチトロンビンを水
13 に溶かし、1 mL中に1国際単位を含む液を調製する。この液
14 150 μ Lに緩衝液2250 μ Lを加える。

15 (iii) 第Xa因子液 第Xa因子試液1200 μ Lに緩衝液1200 μ L
16 を加える。

17 (iv) 緩衝液 定量法(1)を準用する。

18 (v) 反応停止液 定量法(1)を準用する。

19 (vi) ヘパリン標準液 定量法(1)を準用する。ただし、抗第
20 Xa因子活性単位を用いる。

21 (vii) ヘパリン試料液 定量法(1)を準用する。ただし、ヘパ
22 リン試料液は、抗第Xa因子活性単位により調製されたもの
23 を用いる。

24 (viii) 操作法 各濃度のヘパリン標準液をそれぞれ2本、各
25 濃度のヘパリン試料液をそれぞれ2本及び空試験液として緩
26 衝液を5本の1.5 mLチューブに、50 μ Lずつ分注する。各溶
27 液が分注されたチューブ計21本、アンチトロンビン液、第
28 Xa因子液及び基質液を37 °Cで一斉に加温し、加温開始2分
29 後から、空試験液、S₁、S₂、S₃、S₄、空試験液、T₁、T₂、T₃、
30 T₄、空試験液、T₁、T₂、T₃、T₄、空試験液、S₁、S₂、S₃、S₄、空試験液の順に以下のように操作する。各溶液が分注された
31 チューブにアンチトロンビン液50 μ Lを加え、よく混和し、
32 37 °Cで正確に4分間加温する。これに第Xa因子液100 μ Lを
33 加え、よく混和し、37 °Cで正確に12分間加温した後、基質
34 液100 μ Lを加え、よく混和する。37 °Cで正確に4分間加温
35 した後、反応停止液50 μ Lを加え、直ちに混和する。別に反
36 応停止液50 μ Lに基質液100 μ L、第Xa因子液100 μ L、アン
37 チトロンビン液50 μ L及び緩衝液50 μ Lを加えて混和する。
38 この液を対照として、分光光度計により、波長405 nmにおける各溶液の吸光度を測定する。空試験液の測定値の相対標準偏差が10 %以下であることを確認する。

39 (ix) 計算法 吸光度の対数値をy、ヘパリン標準液濃度をx_s、
40 ヘパリン試料液濃度をx_tとして、回帰式y=I_c+Ax_s+Bx_tを
41 導くとき、効力比R=B/Aである。

42 I_c: 共通切片

43 A: 標準液の回帰直線の傾き

44 B: 試料液の回帰直線の傾き

45 次式により本品1 mg中の抗第Xa因子活性を計算する。

46 本品1 mg中の抗第Xa因子活性=100 × R × V/M

47 V: 本品を水に溶かし、1 mL中に約100抗第Xa因子活性

51 単位を含む液を製したときの全容量(mL)

52 M: 本品の秤取量(mg)

53 ただし、回帰式y=I_c+Ax_s+Bx_t+Dを導くとき、
54 空試験液の測定結果と2直線から想定される切片の差を示す
55 定数項Dの90 %信頼区間が-0.2～0.2の範囲内にない場合は、
56 空試験液の測定結果を除外して解析する。

57 試験成立条件は定量法(1)を準用する。条件が満たされな
58 いとき、得られた効率を仮効率として効率比が約1となるよ
59 うに希釈倍数を見直して、再度試験を行う。

60 定量法

(1) ヘパリン

61 (i) 基質液 H-D-フェニルアラニル-L-ピペコリル-
62 L-アルギニル-p-ニトロアニリド二塩酸塩25 mgを水32.0
63 mLに溶かす。

64 (ii) アンチトロンビン液(ヘパリン定量用) ヒト由来アン
65 チトロンビンを水に溶かし、1 mL中に1国際単位を含む液を
66 調製する。この液を緩衝液により16倍以上を目安に適切な
67 希釈倍数で希釈し、アンチトロンビン液(ヘパリン定量用)と
68 する。緩衝液による希釈倍数は、定量法により試験を行った
69 とき、空試験液の吸光度が2.0以下、S₄(ヘパリン標準品濃度
70 0.020単位/mLの反応液)の吸光度が0.2以上1.0以下になる
71 ように設定する。なお、吸光度は光路長1 cmとしたときの
72 値とする。

73 (iii) 第IIa因子液 緩衝液に等量の水を加え、第IIa因子希
74 釈液とする。第IIa因子を、第IIa因子希釈液に溶かし、1
75 mL中に20国際単位を含む液を調製する。この液を第IIa因
76 子希釈液により、4倍以下を目安に適切な希釈倍数で希釈し、
77 第IIa因子液とする。第IIa因子希釈液による希釈倍数は、
78 定量法により試験を行ったとき、空試験液の吸光度が2.0以
79 下、S₄(ヘパリン標準品濃度0.020単位/mLの反応液)の吸光
80 度が0.2以上1.0以下となるように設定する。なお、吸光度は
81 光路長1 cmとしたときの値とする。

82 (iv) 緩衝液 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-ブ
83 ロパンジオール6.1 g、塩化ナトリウム10.2 g、エチレンジア
84 ミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物2.8 g、ポリエチレ
85 ネングリコール6000 1.0 gを水800 mLに溶かし、1 mol/L塩酸
86 試液を加えてpH 8.4に調整した後、水を加えて1000 mLと
87 する。

88 (v) 反応停止液 酢酸(100) 2 mLに水を加え、10 mLとす
89 る。

90 (vi) ヘパリン標準液 ヘパリンナトリウム標準品を水に溶
91 かし、1 mL中に100ヘパリン単位を含む液を調製し、標準
92 原液とする。標準原液を正確に緩衝液で希釈して1 mL中に
93 0.1ヘパリン単位を含む液を調製し、標準溶液とする。次の
94 表に従い、緩衝液に標準溶液を加え、ヘパリン標準液S₁、ヘ
95 パリン標準液S₂、ヘパリン標準液S₃及びヘパリン標準液S₄を
96 調製する。

97

ヘパリン標準液		緩衝液 (μL)	標準溶液 (μL)
No.	ヘパリン濃度 (単位/mL)		
S ₁	0.005	950	50
S ₂	0.010	900	100
S ₃	0.015	850	150
S ₄	0.020	800	200

98 (vii) ヘパリン試料液 本品の適量を精密に量り、水に溶かし、1 mL中に約100ヘパリン単位を含む液を調製し、試料原液とする。試料原液を正確に緩衝液で希釈して1 mL中に0.1ヘパリン単位を含む液を調製し、試料溶液とする。次の表に従い、緩衝液に試料溶液を加え、ヘパリン試料液T₁、ヘパリン試料液T₂、ヘパリン試料液T₃及びヘパリン試料液T₄を調製する。

ヘパリン試料液		緩衝液 (μL)	試料溶液 (μL)
No.	ヘパリン濃度 (単位/mL)		
T ₁	0.005	950	50
T ₂	0.010	900	100
T ₃	0.015	850	150
T ₄	0.020	800	200

105 (viii) 操作法 各濃度のヘパリン標準液をそれぞれ2本、各濃度のヘパリン試料液をそれぞれ2本及び空試験液として緩衝液を5本の1.5 mLチューブに、50 μLずつ分注する。各溶液が分注されたチューブ計21本、アンチトロンビン液(ヘパリン定量用)、第IIa因子液及び基質液を37 °Cで一斉に加温し、加温開始2分後から、空試験液、S₁、S₂、S₃、S₄、空試験液、T₁、T₂、T₃、T₄、空試験液、T₁、T₂、T₃、T₄、空試験液、S₁、S₂、S₃、S₄、空試験液の順に以下のように操作する。各溶液が分注されたチューブにアンチトロンビン液(ヘパリン定量用) 100 μLを加え、よく混和し、37 °Cで正確に4分間加温する。これに第IIa因子液25 μLを加え、よく混和し、37 °Cで正確に4分間加温した後、反応停止液50 μLを加え、直ちに混和する。別に反応停止液50 μLに基質液50 μL、第IIa因子液25 μL、アンチトロンビン液(ヘパリン定量用) 100 μL及び緩衝液50 μLを加え、混和する。この液を対照として、分光光度計により、波長405 nmにおける溶液の吸光度を測定する。空試験液の測定値の相対標準偏差が10 %以下であることを確認する。

124 (ix) 計算法 吸光度の対数値をy、ヘパリン標準液濃度をx_s、ヘパリン試料液濃度をx_tとして、回帰式y = I_c + Ax_s + Bx_tを導くとき、効力比R = B/Aである。

127 I_c : 共通切片

128 A : 標準液の回帰直線の傾き

129 B : 試料液の回帰直線の傾き

130 次式により本品1 mg中のヘパリン単位(抗第IIa因子活性)を計算する。

$$132 \text{ 本品1 mg中のヘパリン単位(抗第IIa因子活性)} \\ 133 = 100 \times R \times V/M$$

134 V: 本品を水に溶かし、1 mL中に約100ヘパリン単位(抗第IIa因子活性)を含む液を製したときの全容量(mL)

136 M: 本品の秤取量(mg)

137 ただし、回帰式y = I_c + Ax_s + Bx_t + Dを導くとき、空試験液の測定結果と2直線から想定される切片の差を示す定数項Dの90 %信頼区間が-0.2~0.2の範囲内にない場合は、空試験液の測定結果を除外して解析する。

141 試験成立条件は、下記1)~3)の3項目とする。
142 1) 2直線から想定される切片の一致に関する判定

143 空試験液を除く標準液及び試料液のデータから、回帰式y = 144 I_s + Ax_s + Bx_t + I_cを導くとき、定数項I_cの90 %信頼区間が-0.2~0.2の範囲内である。

146 I_c : 標準液の回帰直線の切片

147 I_c : 2直線から想定される切片の差

148 2) 直線性に関する判定

149 標準溶液及び試料溶液のデータから、回帰式y = I_c + 150 Ax_s + Bx_t + Q_sx_s² + Q_tx_t²を導くとき、2次係数Q_s及びQ_tの90 %信頼区間が-1000~1000の範囲内である。

152 Q_s : 標準溶液の回帰曲線の2次係数

153 Q_t : 試料溶液の回帰曲線の2次係数

154 3) 相対力値の算出結果が本試験法について事前にバリデーションされた範囲内であることの判定

155 算出された効力比が0.8以上1.2以下である。

156 これらの条件が満たされないとき、得られた力値を仮力値として効力比が約1となるように希釈倍数を見直して、再度試験を行う。