

## 1 セルモロイキン(遺伝子組換え)

### 2 基原の項以降を次のように改める。

3 本品の本質は、遺伝子組換えヒトインターロイキン-2で  
4 あり、133個のアミノ酸残基からなるタンパク質である。本  
5 品は、水溶液である。本品は、T-リンパ球活性化作用を有  
6 する。

7 本品は定量するとき、1 mL当たり0.5 ~ 1.5 mgのタンパ  
8 ク質を含み、タンパク質1 mg当たり $8.0 \times 10^6$ 単位以上を含  
9 む。

10 性状 本品は無色澄明の液である。

### 11 確認試験

12 (1) 本品100  $\mu$ Lにタンパク質消化酵素試液100  $\mu$ Lを加え  
13 て振り混ぜ、37  $^{\circ}$ Cで18 ~ 24時間放置した後、2-メルカプ  
14 トエタノール2  $\mu$ Lを加える。更に、37  $^{\circ}$ Cで30分間放置した  
15 後、トリフルオロ酢酸溶液(1 $\rightarrow$ 10) 5  $\mu$ Lを加え、試料溶液と  
16 する。別に液体クロマトグラフィー用セルモロイキンを試料  
17 溶液と同様に操作し、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶  
18 液50  $\mu$ Lにつき、次の条件で液体クロマトグラフィー (2.01)  
19 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、  
20 同一の保持時間のところに同様のピークを認める。

#### 21 試験条件

22 検出器：紫外吸光度計(測定波長：215 nm)

23 カラム：内径4 mm、長さ30 cmのステンレス管に5  $\mu$ m  
24 の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シ  
25 リカゲルを充填する。

26 カラム温度：25  $^{\circ}$ C付近の一定温度

27 移動相A：トリフルオロ酢酸溶液(1 $\rightarrow$ 1000)

28 移動相B：トリフルオロ酢酸のアセトニトリル/水混液  
29 (17：3)溶液(1 $\rightarrow$ 1000)

30 移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のよ  
31 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 ~ 45	100 $\rightarrow$ 60	0 $\rightarrow$ 40
45 ~ 75	60 $\rightarrow$ 0	40 $\rightarrow$ 100
75 ~ 85	0	100

32 流量：セルモロイキンの保持時間が約70分になるよう  
33 に調整する。

#### 34 システム適合性

35 システムの性能：液体クロマトグラフィー用セルモロイ  
36 キン100  $\mu$ Lに2-メルカプトエタノール2  $\mu$ Lを加え、  
37 37  $^{\circ}$ Cに2時間放置した液につき、上記の条件で操作す  
38 るとき、セルモロイキン及びその還元体の順に溶出し、  
39 その分離度は1.5以上である。

40 (2) 本品適量を精密に量り、1 mL中に800単位を含むよう  
41 にセルモロイキン用培養液を加え、試料溶液とする。組織培  
42 養用平底マイクロテストプレートの2穴(A及びB)に試料溶液  
43 25  $\mu$ Lずつを入れ、穴(A)にはセルモロイキン用参照抗インター  
44 ロイキン-2抗血清試液25  $\mu$ Lを、穴(B)にはセルモロイキン  
45 用培養液25  $\mu$ Lを加える。更に、別の穴(C)にセルモロイキ  
46 ン用培養液50  $\mu$ Lを入れる。平底マイクロテストプレートを

47 振り混ぜた後、5 %二酸化炭素を含む空气中37  $^{\circ}$ Cで30分 ~  
48 2時間保温する。次に、各穴にインターロイキン-2依存性マ  
49 ウスナチュラルキラー細胞NKC3を含むセルモロイキン用培  
50 養液50  $\mu$ Lずつを加え、37  $^{\circ}$ Cで16 ~ 24時間培養する。臭化  
51 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニル  
52 -2H-テトラゾリウム試液を加えて37  $^{\circ}$ Cで4 ~ 6時間培養  
53 し、更に、ラウリル硫酸ナトリウム試液を加えて24 ~ 48時  
54 間放置した後、各穴の液につき、紫外可視吸光度測定法  
55 (2.24)により590 nmにおける吸光度を測定するとき、Aの  
56 穴の液から得られた吸光度とCの穴の液から得られた吸光度  
57 の差はBの穴の液から得られた吸光度とCの穴の液から得ら  
58 れた吸光度の差の3 %以下である。

59 構成アミノ酸 タンパク質のアミノ酸分析法 (2.04) 「1.タン  
60 パク質及びペプチドの加水分解」の方法1及び方法4により加  
61 水分解し、「2.アミノ酸分析方法」の方法1により試験を行  
62 うとき、グルタミン酸(又はグルタミン)は17又は18、トレオ  
63 ニンは11~13、アスパラギン酸(又はアスパラギン)は11又は  
64 12、リシンは11、イソロイシンは7又は8、セリンは6~9、  
65 フェニルアラニンは6、アラニンは5、プロリンは5又は6、  
66 アルギニン及びメチオニンはそれぞれ4、システイン及びバ  
67 リンはそれぞれ3又は4、チロシン及びヒスチジンはそれぞれ  
68 3、グリシンは2及びトリプトファンは1である。

#### 69 操作法

70 (i) 加水分解 定量法(1)で得た結果に従い、総タンパク質  
71 として約50  $\mu$ gに対応する量をそれぞれ2本の加水分解管に  
72 とり、減圧で蒸発乾固する。一方に薄めた塩酸(59 $\rightarrow$ 125)/  
73 メルカプト酢酸/フェノール混液(100：10：1) 100  $\mu$ Lを加  
74 えて振り混ぜる。この加水分解管をバイアルに入れ、バイ  
75 アル内を薄めた塩酸(59 $\rightarrow$ 125)/メルカプト酢酸/フェノール  
76 混液(100：10：1) 200  $\mu$ Lを加えて湿らせる。バイアル内部  
77 を不活性ガスで置換又は減圧し、約115  $^{\circ}$ Cで24時間加熱す  
78 る。減圧乾燥した後、0.02 mol/L塩酸試液0.5 mLに溶かし、  
79 試料溶液(1)とする。もう一方の加水分解管に氷冷した過  
80 酸100  $\mu$ Lを加え、1.5時間氷冷下で酸化した後、臭化水素酸  
81 50  $\mu$ Lを加え、減圧乾固する。水200  $\mu$ Lを加えて減圧乾固す  
82 る操作を2回繰り返した後、この加水分解管をバイアルに入  
83 れ、バイアル内を薄めた塩酸(59 $\rightarrow$ 125) 200  $\mu$ Lを加えて湿ら  
84 せる。バイアル内部を不活性ガスで置換又は減圧し、約  
85 115  $^{\circ}$ Cで24時間加熱する。減圧乾燥した後、0.02 mol/L塩酸  
86 試液0.5 mLに溶かし、試料溶液(2)とする。別にL-アスパ  
87 ラギン酸60 mg、L-グルタミン酸100 mg、L-アラニン17  
88 mg、L-メチオニン23 mg、L-チロシン21 mg、L-ヒスチ  
89 ジン塩酸塩一水和物24 mg、L-トレオニン58 mg、L-プロ  
90 リン22 mg、L-シスチン14 mg、L-イソロイシン45 mg、  
91 L-フェニルアラニン37 mg、L-アルギニン塩酸塩32 mg、  
92 L-セリン32 mg、グリシン6 mg、L-バリン18 mg、L-ロ  
93 イシン109 mg、L-リシン塩酸塩76 mg及びL-トリプトフ  
94 ン8 mgを正確に量り、0.1 mol/L塩酸試液に溶かし、正確  
95 に500 mLとし、標準溶液とする。この液40  $\mu$ Lをそれぞれ2  
96 本の加水分解管にとり、減圧で蒸発乾固した後、試料溶液  
97 (1)及び試料溶液(2)と同様に操作し標準溶液(1)及び標準溶液  
98 (2)とする。

99 (ii) アミノ酸分析 試料溶液(1)、試料溶液(2)、標準溶液  
100 (1)及び標準溶液(2) 250  $\mu$ Lずつを正確にとり、次の条件で液

101 体クロマトグラフィー (2.01) により試験を行い、試料溶液  
102 (1)、試料溶液(2)、標準溶液(1)及び標準溶液(2)から得た各ア  
103 ミノ酸のピーク面積から、それぞれの試料溶液 1 mL中に含  
104 まれる構成アミノ酸のモル数を求め、更にセルモロイキン1  
105 mol中に含まれるロイシンを22としたときの構成アミノ酸の  
106 個数を求める。

#### 107 試験条件

108 検出器：可視吸光度計[測定波長：440 nm(プロリン)  
109 及び570 nm(プロリン以外のアミノ酸)]

110 カラム：内径4 mm、長さ25 cmのステンレス管に5 µm  
111 のジビニルベンゼンで架橋したポリスチレンにスルホ  
112 ン酸基を結合した液体クロマトグラフィー用強酸性イ  
113 オン交換樹脂(Na型)を充填する。

114 カラム温度：試料注入後、48 °C付近の一定温度で28分  
115 間保持した後、62 °C付近の一定温度で121分まで保  
116 持する。

117 反応槽温度：135 °C付近の一定温度

118 発色時間：約1分

119 移動相：移動相A、移動相B、移動相C及び移動相Dを次  
120 の表に従って調製する。

	移動相A	移動相B	移動相C	移動相D
クエン酸一水和物	17.70 g	10.50 g	6.10 g	—
クエン酸三ナトリウム 二水和物	7.74 g	15.70 g	26.67 g	—
塩化ナトリウム	7.07 g	2.92 g	54.35 g	—
水酸化ナトリウム	—	—	2.30 g	8.00 g
エタノール(99.5)	40 mL	—	—	—
ベンジルアルコール	—	10 mL	5 mL	—
チオジグリコール	5 mL	5 mL	5 mL	—
ラウロマクロゴ ール溶液(1→4)	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL
カプリル酸	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
水	適量	適量	適量	適量
全量	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL

121 移動相の送液：移動相A、移動相B、移動相C及び移動  
122 相D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%)	移動相C (vol%)	移動相D (vol%)
0 ~ 35	100	0	0	0
35 ~ 60	0	100	0	0
60 ~ 111	0	0	100	0
111 ~ 121	0	0	0	100

123 反応試薬：酢酸リチウム二水和物407 g、酢酸(100) 245  
124 mL及び1-メトキシ-2-プロパノール801 mLを混  
125 和した後、水を加えて2000 mLとし、窒素を10分間  
126 通じながらかき混ぜ、A液とする。別に1-メトキシ  
127 -2-プロパノール1957 mLに、ニンヒドリン77 g及  
128 び水素化ホウ素ナトリウム0.134 gを加え、窒素を30  
129 分間通じながらかき混ぜ、B液とする。A液及びB液  
130 を用時混和する。

131 移動相流量：セリン及びロイシンの保持時間がそれぞれ  
132 約30分及び約73分になるように調整する(毎分約0.21  
133 mL)。

134 反応試薬流量：毎分約0.25 mL

135 システム適合性

136 システムの性能：標準溶液2 mLを量り、0.02 mol/L塩  
137 酸試液を加えて25 mLとした液250 µLにつき、上記  
138 の条件で操作するとき、トレオニンとセリンの分離度  
139 は1.2以上である。

140 システムの再現性：標準溶液2 mLを量り、0.02 mol/L  
141 塩酸試液を加えて25 mLとした液250 µLにつき、上  
142 記の条件で試験を3回繰り返すとき、アスパラギン酸、  
143 セリン、アルギニン及びプロリンのピーク面積の相対  
144 標準偏差はそれぞれ2.4 %以下である。

145 **分子量** 定量法(1)で得た結果に従い、1 mL中にタンパク質約  
146 0.5 mgとなるようにセルモロイキン用緩衝液を加え、試料溶  
147 液とする。セルモロイキン用分離ゲル及びセルモロイキン用  
148 濃縮ゲルを用いて調製した垂直不連続緩衝液系SDS-ポリア  
149 クリルアミドゲルに、試料溶液20 µL及びセルモロイキン分  
150 子量測定用マーカートンパク質20 µLをそれぞれ試料液添加  
151 溝に注入し、電気泳動を行った後、クーマシー染色液中に  
152 浸してバンドを染色するとき、主バンドの分子量は、12500  
153 ~ 13800である。

154 **pH** (2.54) 4.5 ~ 5.5

#### 155 純度試験

156 (1) 類縁物質 本品及びpH 5.0の0.01 mol/L酢酸塩緩衝液  
157 10 µLにつき、次の条件で液体クロマトグラフィー (2.01) に  
158 より試験を行う。本品の各々のピークの面積を自動積分法に  
159 より測定し、面積百分率法によりセルモロイキン以外の類縁  
160 物質の合計量を求めるとき、5 %以下である。

#### 161 試験条件

162 検出器：紫外吸光度計(測定波長：215 nm)

163 カラム：内径4 mm、長さ30 cmのステンレス管に5 µm  
164 の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シ  
165 リカゲルを充填する。

166 カラム温度：25 °C付近の一定温度

167 移動相A：トリフルオロ酢酸の水/アセトニトリル混液  
168 (3 : 2)溶液(1→1000)

169 移動相B：トリフルオロ酢酸のアセトニトリル/水混液  
170 (13 : 7)溶液(1→1000)

171 移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のよ  
172 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 ~ 60	70 → 10	30 → 90

173 流量：セルモロイキンの保持時間が約50分になるよう  
174 に調整する。

175 面積測定範囲：溶媒のピークの後からセルモロイキンの  
176 保持時間の約1.3倍の範囲

#### 177 システム適合性

178 検出の確認：本品0.5 mLを正確に量り、pH 5.0の0.01  
179 mol/L酢酸塩緩衝液を加えて正確に50 mLとする。こ  
180 の液10 µLから得たセルモロイキンのピーク面積が本  
181 品10 µLから得たセルモロイキンのピーク面積の0.9  
182 ~ 1.1 %になることを確認する。

183 システムの性能：本品100 µLに2-メルカプトエタノ  
184 ル2 µLを加え、37 °Cで2時間放置した液につき、上  
185 記の条件で操作するとき、セルモロイキン及びその選

186 元体の順に溶出し、その分離度は3.0以上である。

187 (2) 多量体 分子量の項の試料溶液をセルモロイキン用緩  
188 衝液でタンパク質含量として1 mL当たり約2 ~ 32 µgの範  
189 囲になるように4段階以上に薄め、各標準溶液とする。試料  
190 溶液及び各標準溶液20 µLずつを試料添加溝に注入し、垂直  
191 不連続緩衝液系SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を  
192 行った後、クーマシー染色試液中に浸してバンドを染色する  
193 とき、各々のバンドは青色を呈する。次に、デンストメー  
194 ターを用いて各標準溶液から得たバンドのピーク面積を求め、  
195 先の検量線からタンパク質含量を算出し、セルモロイキン単  
196 量体以外のセルモロイキンに由来する重合体タンパク質量を  
197 求めるとき、総タンパク質に対して2%以下である。

198 (3) 宿主由来タンパク質 別に規定する。

199 (4) DNA 別に規定する。

200 エンドトキシン (4.01) 100 EU/mL未満。

201 酢酸アンモニウム 本品0.1 mLを正確に量り、水を加えて正  
202 確に10 mLとし試料溶液とする。別に、塩化アンモニウム約  
203 0.1 gを精密に量り、水に溶かし、正確に100 mLとする。こ  
204 の液5 mLを正確に量り、水を加えて正確に100 mLとし、標  
205 準原液とする。標準原液3 mLを正確に量り、水を加えて正  
206 確に50 mLとし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液  
207 25 µLずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィ  
208 ー (2.01) により試験を行い、アンモニウムイオンのピーク  
209 面積 $A_T$ 及び $A_S$ を測定するとき、本品1 mL当たり酢酸アンモ  
210 ニウムを0.28 ~ 0.49 mg含む。

211 本品1 mL当たりの酢酸アンモニウム( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ )の量  
212 (mg)

213 
$$= A_T / A_S \times M_S \times 0.003 \times 1.441$$

214  $M_S$ : 塩化アンモニウムの秤取量(mg)

215 0.003: 希釈補正係数

216 1.441: 塩化アンモニウムの酢酸アンモニウムへの分子量  
217 換算係数

218 試験条件

219 検出器: 電気伝導度検出器

220 カラム: 内径5 mm, 長さ25 cmの樹脂管に5.5 µmの液  
221 体クロマトグラフィ用弱酸性イオン交換樹脂を充填  
222 する。

223 カラム温度: 40 °C付近の一定温度

224 移動相: 薄めた0.1 mol/Lメタンサルホン酸試液(3→10)

225 流量: アンモニウムの保持時間が約8分になるように調  
226 整する。

227 システム適合性

228 システムの性能: ナトリウム標準原液1 mL及びカリウ  
229 ム標準原液0.2 mLを正確に量り水を加えて正確に100  
230 mLとする。この液5 mL及び標準原液3 mLを正確に  
231 量り、水を加えて正確に50 mLとする。この液25 µL  
232 につき、上記の条件で操作するとき、ナトリウム、ア  
233 ンモニウム、カリウムの順に溶出し、ナトリウムとア  
234 ンモニウムの分離度は3以上である。

235 システムの再現性: 標準溶液25 µLにつき、上記の条件  
236 で試験を5回繰り返すとき、アンモニウムのピーク面  
237 積の相対標準偏差は10%以下である。

238 定量法

239 (1) タンパク質含量 本品1 mLを正確に量り、水を加え  
240 て正確に10 mLとし、試料溶液とする。別に定量用ウシ血清  
241 アルブミン約50 mgを精密に量り、1 mL中に正確にアルブ  
242 ミン50 µg, 100 µg, 150 µgを含む液となるように水を加え  
243 て標準溶液(1)、標準溶液(2)及び標準溶液(3)とする。試料溶  
244 液及び標準溶液(1)、標準溶液(2)及び標準溶液(3) 1 mLずつ  
245 を正確に量り、それぞれにタンパク質含量試験用アルカリ性  
246 銅試液2.5 mLを正確に加えて振り混ぜ、15分間放置する。  
247 次に水2.5 mL及び希フオリン試液0.5 mLを正確に加え、  
248 37 °Cで30分間放置する。これらの液につき、水1 mLを用い  
249 て同様に操作した液を対照とし、紫外可視吸光度測定法  
250 (2.24) により試験を行い、波長750 nmにおける吸光度を測  
251 定する。標準溶液(1)、標準溶液(2)及び標準溶液(3)の吸光度  
252 から作成した検量線を用いて、タンパク質量を求める。

253 (2) 比活性 本品0.1 mLを正確に量り、セルモロイキン  
254 用培養液0.9 mLを正確に加え、試料溶液とする。別にイン  
255 ターロイキン-2標準品1個をとり、水1 mLを正確に加えて  
256 溶解し、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液をセルモロ  
257 イキン用培養液で正確に2倍段階希釈し、各希釈液中に1 mL  
258 当たり $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個のインターロイキン-2依存性  
259 マウスナチュラルキラー細胞NK3を試料溶液及び標準溶液  
260 に対し等容量加える。インターロイキン-2依存性マウスナ  
261 チュラルキラー細胞NK3とセルモロイキン用培養液を等量  
262 混合したものを対照液とする。これらの液を37 °Cで16 ~  
263 24時間培養する。その後、臭化3-(4,5-ジメチルチアゾ  
264 ル-2-イル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム試液  
265 をセルモロイキン用培養液量に対し1/5容量加えて37 °Cで  
266 4 ~ 6時間培養し、更に、ラウリル硫酸ナトリウム試液をセル  
267 モロイキン用培養液量に対し等容量加えて24 ~ 48時間放  
268 置し、生成する青色色素を溶出させた後、これらの液につき、  
269 紫外可視吸光度測定法 (2.24) により試験を行い、波長590  
270 nmにおける吸光度を測定する。セルモロイキンとして1 mL  
271 当たり1000 ~ 2000単位を加えた場合の吸光度を100%とし、  
272 対照液の吸光度を0%として、50%の吸光度を示すインタ  
273 ーロイキン-2標準品の希釈倍数(A)と本品の希釈倍数(B)と  
274 を求め、B/A値にインターロイキン-2標準品の単位数を  
275 乗じ、本品1 mL中の生物学的活性を求める。タンパク質含  
276 量試験で求めたタンパク質含量に対する生物学的活性の比を  
277 算出する。

278 貯法

279 保存条件 -20 °C以下で保存する。

280 容器 気密容器。

281