

# 1 ヘパリンナトリウム

## 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( $\gamma$ -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  $\mu$ Lに緩衝液2250  $\mu$ Lを加える。

15 (iii) 第Xa因子液 第Xa因子試液1200  $\mu$ Lに緩衝液1200  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $^{\circ}$ Cで一斉に加温し、加温開始2分  
29 後から、空試験液, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, 空試験液, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>,  
30 T<sub>4</sub>, 空試験液, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, 空試験液, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>,  
31 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  
32 チューブにアンチトロンビン液50  $\mu$ Lを加え、よく混和し、  
33 37  $^{\circ}$ Cで正確に4分間加温する。これに第Xa因子液100  $\mu$ Lを  
34 加え、よく混和し、37  $^{\circ}$ Cで正確に12分間加温した後、基質  
35 液100  $\mu$ Lを加え、よく混和する。37  $^{\circ}$ Cで正確に4分間加温  
36 した後、反応停止液50  $\mu$ Lを加え、直ちに混和する。別に反  
37 応停止液50  $\mu$ Lに基質液100  $\mu$ L、第Xa因子液100  $\mu$ L、アン  
38 チトロンビン液50  $\mu$ L及び緩衝液50  $\mu$ Lを加えて混和する。  
39 この液を対照として、分光光度計により、波長405 nmにお  
40 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  
41 準偏差が10%以下であることを確認する。

42 (ix) 計算法 吸光度の対数値を $y$ 、ヘパリン標準液濃度を $x_s$ 、  
43 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  
44 導くとき、効力比 $R = B/A$ である。

45  $I_c$ : 共通切片

46  $A$ : 標準液の回帰直線の傾き

47  $B$ : 試料液の回帰直線の傾き

48 次式により本品1 mg中の抗第Xa因子活性を計算する。

49 本品1 mg中の抗第Xa因子活性 $= 100 \times R \times V/M$

50  $V$ : 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 $-0.2 \sim 0.2$ の範囲内でない場合は、  
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、得られた力価を仮力価として効力比が約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

61 (1) ヘパリン

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

65 (ii) アンチトロンビン液(ヘパリン定量用) ヒト由来アン  
66 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  
67 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  
68 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  
69 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  
70 とき、空試験液の吸光度が2.0以下、S<sub>4</sub>(ヘパリン標準品濃度  
71 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  
72 ように設定する。なお、吸光度は光路長1 cmとしたときの  
73 値とする。

74 (iii) 第IIa因子液 緩衝液に等量の水を加え、第IIa因子希  
75 釈液とする。第IIa因子を、第IIa因子希釈液に溶かし、1  
76 mL中に20国際単位を含む液を調製する。この液を第IIa因  
77 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、  
78 第IIa因子液とする。第IIa因子希釈液による希釈倍数は、  
79 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  
80 下、S<sub>4</sub>(ヘパリン標準品濃度0.020単位/mLの反応液)の吸光  
81 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  
82 光路長1 cmとしたときの値とする。

83 (iv) 緩衝液 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プ  
84 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  
85 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  
86 ングリコール6000 1.0 gを水800 mLに溶かし、1 mol/L塩酸  
87 試液を加えてpH 8.4に調整した後、水を加えて1000 mLと  
88 する。

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

91 (vi) ヘパリン標準液 ヘパリンナトリウム標準品を水に溶  
92 かし、1 mL中に100ヘパリン単位を含む液を調製し、標準  
93 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  
94 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  
95 表に従い、緩衝液に標準溶液を加え、ヘパリン標準液S<sub>1</sub>、ヘ  
96 パリン標準液S<sub>2</sub>、ヘパリン標準液S<sub>3</sub>及びヘパリン標準液S<sub>4</sub>を  
97 調製する。

ヘパリン標準液		緩衝液 ( $\mu\text{L}$ )	標準溶液 ( $\mu\text{L}$ )
No.	ヘパリン濃度 (単位/mL)		
S <sub>1</sub>	0.005	950	50
S <sub>2</sub>	0.010	900	100
S <sub>3</sub>	0.015	850	150
S <sub>4</sub>	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  
99 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  
100 表に従い、緩衝液に試料溶液を加え、ヘパリン試料液T<sub>1</sub>、  
101 ヘパリン試料液T<sub>2</sub>、ヘパリン試料液T<sub>3</sub>及びヘパリン試料液  
102 T<sub>4</sub>を調製する。

ヘパリン試料液		緩衝液 ( $\mu\text{L}$ )	試料溶液 ( $\mu\text{L}$ )
No.	ヘパリン濃度 (単位/mL)		
T <sub>1</sub>	0.005	950	50
T <sub>2</sub>	0.010	900	100
T <sub>3</sub>	0.015	850	150
T <sub>4</sub>	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  
106 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  
107 衝液を5本の1.5 mLチューブに、50  $\mu\text{L}$ ずつ分注する。各溶  
108 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  
109 リン定量用)、第II a因子液及び基質液を37  $^{\circ}\text{C}$ で一斉に加温  
110 し、加温開始2分後から、空試験液、S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>、S<sub>4</sub>、空試  
111 験液、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、空試験液、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、空試  
112 験液、S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>、S<sub>4</sub>、空試験液の順に以下のように操作す  
113 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  
114 パリン定量用) 100  $\mu\text{L}$ を加え、よく混和し、37  $^{\circ}\text{C}$ で正確に4  
115 分間加温する。これに第II a因子液25  $\mu\text{L}$ を加え、よく混和  
116 し、37  $^{\circ}\text{C}$ で正確に4分間加温した後、基質液50  $\mu\text{L}$ を加え、  
117 よく混和する。37  $^{\circ}\text{C}$ で正確に4分間加温した後、反応停止液  
118 50  $\mu\text{L}$ を加え、直ちに混和する。別に反応停止液50  $\mu\text{L}$ に基  
119 質液50  $\mu\text{L}$ 、第II a因子液25  $\mu\text{L}$ 、アンチトロンビン液(ヘパ  
120 リン定量用) 100  $\mu\text{L}$ 及び緩衝液50  $\mu\text{L}$ を加え、混和する。こ  
121 の液を対照として、分光光度計により、波長405 nmにおけ  
122 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  
123 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  
125  $x_s$ 、ヘパリン試料液濃度を $x_t$ として、回帰式 $y = I_c + Ax_s +$   
126  $Bx_t$ 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II a因子活性)  
131 を計算する。

132 本品1 mg中のヘパリン単位(抗第II a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  
135 第II a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、  
138 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  
139 定数項 $D$ の90 %信頼区間が $-0.2 \sim 0.2$ の範囲内でない場合は、  
140 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 $y = I_s + A'x_s + B'x_t + I_{t-s}$ を導くとき、定数項 $I_{t-s}$ の90 %信  
144 頼区間が $-0.2 \sim 0.2$ の範囲内である。  
145

146  $I_s$ : 標準液の回帰直線の切片

147  $I_{t-s}$ : 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  $A''x_s + B''x_t + Q_sx_s^2 + Q_t x_t^2$ を導くとき、2次係数 $Q_s$ 及び  
151  $Q_t$ の90 %信頼区間が $-1000 \sim 1000$ 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) 相対力価の算出結果が本試験法について事前にバリデ  
155 ーションされた範囲内であることの判定

156 算出された効力比が0.8以上1.2以下である。

157 これらの条件が満たされないとき、得られた力価を仮力価  
158 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  
159 試験を行う。

160