

1 フィルグラスチム(遺伝子組換え)

2 **確認試験の項を確認試験(1)とし、ペプチドマップの項を確認試**
 3 **験(2)とし、次のように改める。純度試験(1)及び定量法(2)の項を次**
 4 **のように改める。**

5 確認試験

6 (1) フィルグラスチム用ポリアクリルアミドゲルの大きさに
 7 応じて、本品のタンパク質5~10 µgに対応する容量をとり、
 8 水10 µLを加える。この液3容量にフィルグラスチム試
 9 料用緩衝液1容量を加えて試料溶液とする。別にタンパク質
 10 量として本品と等量のフィルグラスチム標準品をとり、試料
 11 溶液の調製と同様に操作して得た液を標準溶液とする。電気
 12 泳動装置にフィルグラスチム用ポリアクリルアミドゲルを取
 13 り付け、電極槽に必要な量のSDSポリアクリルアミドゲル電
 14 気泳動用緩衝液を入れる。試料溶液及び標準溶液の全量をそ
 15 れぞれゲルの溝に注入し、下側を陽極として電気泳動を行う。
 16 プロモフェノールブルーの帯がゲル下端付近に達したとき、
 17 電気泳動を終了させる。クーマシーブリリアントブルーR-
 18 250 1.25 gをメタノール450 mL及び酢酸(100) 100 mLに溶
 19 かし、水を加えて1000 mLとした液に浸して泳動帯を染色
 20 するとき、試料溶液から得た泳動帯は、標準溶液から得た泳
 21 動帯と同様の位置に同様の泳動像を示す。

22 (2) 本品及びフィルグラスチム標準品のタンパク質約80
 23 µgに対応する容量をとり、それぞれに酵素消化用緩衝液200
 24 µL及び水を加えて390 µLとする。それぞれの液にV8プロテ
 25 アーゼ50 µgを水250 µLに溶かした液10 µLを加え、25 °Cで
 26 17~19時間反応した後、水/トリフルオロ酢酸混液(19 : 1)
 27 18 µLを加えて反応を停止し、試料溶液及び標準溶液とする。
 28 試料溶液及び標準溶液70 µLずつにつき、次の条件で液体ク
 29 ロマトグラフィー〈2.01〉により試験を行い、両者のクロマ
 30 トグラムを比較するとき、同一の保持時間のところに同様の
 31 ピークを認める。

32 試験条件

33 検出器：紫外吸光度計(測定波長：214 nm)

34 カラム：内径2.1 mm、長さ25 cmのステンレス管に5
 35 µmの液体クロマトグラフィー用ブチルシリル化シリ
 36 カゲルを充填する。

37 カラム温度：40 °C付近の一定温度

38 移動相A：水/トリフルオロ酢酸混液(1000 : 1)

39 移動相B：アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸混液
 40 (9000 : 1000 : 9)

41 移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のよ
 42 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 ~ 2	98	2
2 ~ 30	98 → 70	2 → 30
30 ~ 85	70 → 50	30 → 50
85 ~ 90	50 → 2	50 → 98
90 ~ 100	2	98

43 流量：毎分0.20 mL

44 システム適合性

45 システムの性能：標準溶液70 µLにつき、上記の条件で

46 操作するとき、約10分以内に溶出する溶媒のピーク
 47 の後に溶出するフィルグラスチムを構成する主要な8
 48 本のピークの隣接するピークの分離度はそれぞれ1.5
 49 以上である。

50 純度試験

51 (1) 多量体 本品250 µLにつき、次の条件で液体クロマ
 52 トグラフィー〈2.01〉により試験を行う。本品の各々のピー
 53 ク面積を自動積分法により測定し、面積百分率法によりそれ
 54 らの量を求めるとき、フィルグラスチム以外のピークの合計
 55 面積は2 %以下である。

56 試験条件

57 検出器：紫外吸光度計(測定波長：280 nm)

58 カラム：内径7.5 mm、長さ60 cmのステンレス管に液
 59 体クロマトグラフィー用親水性シリカゲルを充填する。
 60 カラム温度：25 °C付近の一定温度

61 移動相：塩化ナトリウム5.8 gを希酢酸10 mL及び水900
 62 mLに溶かし、水酸化ナトリウム試液を加えてpH 5.5
 63 に調整した後、ラウリル硫酸ナトリウム250 mgを加
 64 えて溶かし、更に水を加えて1000 mLとする。

65 流量：フィルグラスチムの保持時間が約17分になるよ
 66 うに調整する。

67 面積測定範囲：サイズ排除カラムの排除容積に相当する
 68 保持時間からフィルグラスチムの溶出終了までの範囲
 69 システム適合性

70 検出の確認：本品10 µLを正確に量り、移動相を加えて
 71 正確に1000 µLとする。この液250 µLから得たフィル
 72 グラスチムのピーク面積が、本品のフィルグラスチ
 73 ムのピーク面積の0.7~1.3 %となることを確認する。
 74 システムの性能：卵白アルブミン12.5 mg及びミオグロ
 75 ビン12.5 mgを水5 mLに溶かした液10 µLにつき、上
 76 記の条件で操作するとき、卵白アルブミン、ミオグロ
 77 ビンの順に溶出し、その分離度は1.7以上である。

78 システムの再現性：本品250 µLにつき、上記の条件で
 79 試験を6回繰り返すとき、フィルグラスチムのピーク
 80 面積の相対標準偏差は2.5 %以下である。

81 定量法

82 (2) 比活性

83 (i) 試験細胞 32D clone3細胞を用いる。

84 (ii) 定量用試料希釈液 フィルグラスチム用イソコブ改変
 85 ダルベッコ液体培地に200 mmol/L L-グルタミン溶液を1
 86 vol%, ウシ胎児血清を5 vol%となるように加え、フィルタ
 87 ーでろ過滅菌する。

88 (iii) 標準溶液 フィルグラスチム標準品に1 mLにタンパ
 89 ク質0.5~6 ngを含む液となるように定量用試料希釈液を加
 90 えて任意の濃度S_Hから5段階以上の等比希釈を行い、標準溶
 91 液とする。

92 (iv) 試料溶液 本品の1 mL中にタンパク質0.5~6 ngを含
 93 む液となるように定量用試料希釈液を加えて任意の濃度U_H
 94 から5段階以上の等比希釈を行い、試料溶液とする。

95 (v) 操作法 培養までの操作は、厳密な無菌的注意のもと
 96 で行う。

97 各濃度の試料溶液及び標準溶液を、それぞれについて細胞
 98 培養用96穴平底マイクロプレート3枚以上を用い、1枚ごと
 99 に1穴当たり100 µLずつ正確に分注する。続いて定量用試料

100 希釈液1 mL中に細胞数が 1×10^5 個となるように調製した試
 101 験細胞懸濁液を100 μ Lずつ正確に加え、炭酸ガス濃度5 %
 102 の培養器内で 37 ± 2 °Cで、21~27時間培養する。培養後、
 103 蛍光基質溶液を40 μ Lずつ加え、同じ条件で更に21~51時間
 104 培養する。次に蛍光マイクロプレートリーダーを用い、励起
 105 波長530~560 nm、測定波長590 nmにおける蛍光強度を測
 106 定する。試料溶液及び標準溶液共に、少なくとも3枚以上の
 107 マイクロプレートで各3濃度以上の測定値を計算に用いる。
 108 (vi) 計算法 (v)操作法における試料溶液及び標準溶液の
 109 各濃度を常用対数に変換した値をそれぞれ x_U 及び x_S とし、
 110 更にその合計した値をそれぞれ X_U 及び X_S とする。また、試
 111 料溶液及び標準溶液から得られた蛍光強度をそれぞれ y_U 及
 112 び y_S 、更に各濃度で合計した値をそれぞれ Y_U 及び Y_S とする。
 113 試料溶液及び標準溶液の濃度をそれぞれ n_U 及び n_S 、プレ
 114 ート数を r とし、定量法(1)で算出したタンパク質含量
 115 (mg/mL)を用いて、次の式より本品の比活性を求める。

116 本品の比活性(単位/mg)

$$117 = \text{antilog } M \times \text{フィルグラスチム標準品の生物学的活性}$$

$$118 \quad (\text{単位/mL}) \times \frac{U_H \text{を調製したときの希釈倍数}}{S_H \text{を調製したときの希釈倍数}} \times \frac{U_H}{S_H} \times$$

$$119 \quad \frac{1}{\text{本品の定量法(1)の測定値(mg/mL)}}$$

$$120 \quad M = X_S / n_S - X_U / n_U - (\Sigma Y_S / n_S r - \Sigma Y_U / n_U r) / b$$

$$121 \quad b = (S_{xys} + S_{xyu}) / (S_{xxs} + S_{xxu})$$

$$122 \quad S_{xys} = \Sigma x_S Y_S - X_S \Sigma Y_S / n_S$$

$$123 \quad S_{xyu} = \Sigma x_U Y_U - X_U \Sigma Y_U / n_U$$

$$124 \quad S_{xxs} = r \Sigma x_S^2 - r X_S^2 / n_S$$

$$125 \quad S_{xxu} = r \Sigma x_U^2 - r X_U^2 / n_U$$

126 ただし、試験成立条件は下記の3項目とする。

127 1) F'_S は次表の $m = n_S(r-1)$ に対する F_1 以上であり、 F'_U
 128 は次表の $m = n_U(r-1)$ に対する F_1 以上である。

$$129 \quad F'_S = V_{RS} / V_{ES}$$

$$130 \quad V_{RS} = S_{xys}^2 / S_{xxs}$$

$$131 \quad V_{ES} = \{ \Sigma y_S^2 - \Sigma (Y_S^2 / r) \} / \{ n_S(r-1) \}$$

$$132 \quad F'_U = V_{RU} / V_{EU}$$

$$133 \quad V_{RU} = S_{xyu}^2 / S_{xxu}$$

$$134 \quad V_{EU} = \{ \Sigma y_U^2 - \Sigma (Y_U^2 / r) \} / \{ n_U(r-1) \}$$

135 2) F' は次表の $m = (n_S + n_U)(r-1)$ に対する F_1 より小さい。

$$136 \quad F' = V_P / V_E$$

$$137 \quad V_P = S_{xys}^2 / S_{xxs} + S_{xyu}^2 / S_{xxu} - (S_{xys} + S_{xyu})^2 /$$

$$138 \quad (S_{xxs} + S_{xxu})$$

$$139 \quad V_E = \{ \Sigma y_S^2 + \Sigma y_U^2 - \Sigma (Y_S^2 / r) - \Sigma (Y_U^2 / r) \} / \{ (n_S +$$

$$140 \quad n_U)(r-1) \}$$

141 3) $L \leq 0.3$ である。

$$142 \quad L = 2 / b(1-g) \sqrt{V_E F_1 \{ (1-g)(1/n_S r + 1/n_U r)$$

$$143 \quad + (\Sigma Y_S / n_S r - \Sigma Y_U / n_U r)^2 / b^2 (S_{xxs} + S_{xxu}) \}$$

144 F_1 : $m = (n_S + n_U)(r-1)$ に対する次表の値

$$145 \quad g = V_E F_1 / b^2 (S_{xxs} + S_{xxu})$$

m に対する F_1 の値

m	F_1	m	F_1	m	F_1
1	161.45	13	4.667	25	4.242
2	18.51	14	4.600	26	4.225
3	10.129	15	4.543	27	4.210
4	7.709	16	4.494	28	4.196
5	6.608	17	4.451	29	4.183
6	5.987	18	4.414	30	4.171
7	5.591	19	4.381	40	4.085
8	5.318	20	4.351	60	4.001
9	5.117	21	4.325	120	3.920
10	4.965	22	4.301	∞	3.841
11	4.844	23	4.279		
12	4.747	24	4.260		

147