

日薬連発第 720 号  
2019 年 9 月 13 日

加盟団体 殿

日本製薬団体連合会

バイオ医薬品の規格及び試験方法欄の記載の合理化について

標題の通知が、厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課より当連合会宛てにありましたので送付いたします。

つきましては、貴会会員への周知方宜しくお願いいたします。

記

令和元年 9 月 12 日付け

○バイオ医薬品の規格及び試験方法欄の記載の合理化について

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課  
事務連絡

事務連絡  
令和元年9月12日

日本製薬団体連合会 御中

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課

バイオ医薬品の規格及び試験方法欄の記載の合理化について

標記について、別添写しのとおり、各都道府県衛生主管部（局）長宛て通知しましたので、御了知の上、貴会会員に対し御周知方願います。





事務連絡  
令和元年9月12日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課

バイオ医薬品の規格及び試験方法欄の記載の合理化について

医薬品の承認申請書等の「規格及び試験方法」の欄（「成分及び分量又は本質」の欄において、成分の規格として「別紙規格」がある場合は、当該「別紙規格」中の「規格及び試験方法」の欄を含む。以下同じ。）の記載については、「医薬品の品質に係る承認事項の変更に係る取扱い等について」（平成30年3月9日薬生薬審発0309第1号、薬生監麻発0309第1号、以下、「3月9日通知」という。）の第2規格及び試験方法の欄の記載の合理化について、により合理化を行って差し支えないこととされています。

今般、国立研究開発法人日本医療研究開発機構医療研究開発推進事業費補助金「医薬品等規制調和・評価研究事業医薬品の新規開発と製造変更における品質管理手法に関する研究」による報告書を踏まえ、別添の「製造販売承認申請書における規格及び試験方法欄の記載の合理化に関する報告書「バイオ医薬品の規格及び試験方法欄の記載の合理化に関する検討」（以下、「本研究成果」という。）が作成されました。

今般、本研究成果に基づき、バイオ医薬品についても、3月9日通知により、「規格及び試験方法」の欄の記載の合理化を行って差し支えありません。

なお、生物活性試験法については、試験方法ごとに品質管理上重要な因子が変わり得ることから、試験方法の簡略記載を希望する場合は、医薬品手続相談により確認を受けることを勧めます。

## 別添

### 製造販売承認申請書における規格及び試験方法欄の記載の合理化に関する報告書 「バイオ医薬品の規格及び試験方法欄の記載の合理化に関する検討」

平成 28 年度分担報告書別添「製造販売承認申請書における規格及び試験方法欄の記載の合理化に関する報告書」において、液体クロマトグラフィーによる分析を用いた規格及び試験方法の承認申請書における記載の合理化案が示された。この合理化案は、平成 30 年 3 月 9 日 薬生薬審発 0309 第 1 号、薬生監麻発 0309 第 1 号 厚生労働省通知「医薬品の品質に係る承認事項の変更に係る取扱い等について」の別添として採用され、同通知における「申請書の規格及び試験方法欄の記載の合理化」の記載例として活用されている。しかし、同通知において、「記載例が示されていない試験方法に関する記載を合理化しようとする場合は、当面の間、事前に PMDA が実施する医薬品手続相談により合理化に係る考え方の妥当性について確認を受ける必要がある。」とされ、通知に記載された合理化の円滑な運用には、事例の蓄積が必要である。

バイオ医薬品の規格及び試験方法には、通知別添と同様に液体クロマトグラフィーを用いた試験法があるが、試料調製方法においてバイオ医薬品に特有の調製方法が用いられる場合や、力価試験のようなバイオ医薬品に特有の試験法が用いられることがある。そこで、オリゴ糖プロファイル、及び、細胞増殖アッセイを用いた力価試験を例に、バイオ医薬品の規格及び試験方法の記載についても、同様に合理化が可能であるか検討した。

## 1. オリゴ糖プロファイル

### 1) 前提

- ▶ バイオ医薬品特有の試料調製方法を有する試験法の記載例として、オリゴ糖プロファイルを選択した。
- ▶ N-結合型糖鎖を 2-アミノベンズアミドで誘導体化し、蛍光検出する方法を選択した。
- ▶ 記載案は、日局参考情報“単糖分析及びオリゴ糖分析／糖鎖プロファイル”、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス“抗体医薬品の標準的糖鎖試験方法：2-アミノベンザミド誘導体化及び親水性相互作用クロマトグラフィー／蛍光検出”（原園ら、Vol.44, No.4, 357-361(2013)）、第十八改正日本薬局方原案作成要領及び USP-NF <212> Oligosaccharide analysis を参考にした。

### 2) 合理化記載案

#### 糖鎖プロファイル

試験方法：酵素的切断法による N-結合型糖鎖の遊離、誘導体化、液体クロマトグラフィー、面積百分率、糖鎖試験法<2.64>の糖鎖プロファイル法参照

規格値／判定基準：フコシル化糖鎖 X1-X2%、アフコシル化糖鎖 Y1-Y2%、ハイマンノース型糖鎖 Z1%以下

フコシル化糖鎖 (%)

=フコシル化された糖鎖 (G0F、G0F-GlcNAc、G1F、G1'F、G1F-GlcNAc 及び G2F) のピーク面積の和/糖鎖の総ピーク面積の総和×100

アフコシル化糖鎖 (%)

=フコシル化されていない糖鎖 (G0 及び G0-GlcNAc) のピーク面積の和/糖鎖の総ピーク面積の総和×100

ハイマンノース型糖鎖 (%)

=ハイマンノース型糖鎖 (Man5) のピーク面積の和/糖鎖の総ピーク面積の総和×100

#### 分析方法

試験試料の調製:

脱塩方法 (透析)

透析液: pH 7.2 のリン酸塩緩衝液

PNGase F による N-結合型糖鎖の遊離

遊離反応溶液: pH 7.2 のリン酸塩緩衝液にてタンパク質濃度約 1 mg/mL に調製

PNGase F 添加量: 本品タンパク質量 1 mg あたり 10 ユニット

反応条件: 37°C で 12~24 時間

遊離糖鎖の精製

限外ろ過ユニット: 分画分子量 30 kDa

操作: 遊離反応後の液を限外ろ過した後、減圧乾固

2-アミノベンズアミド誘導体化

反応液: 精製した遊離糖鎖に 2-アミノベンズアミド誘導体化試液を、糖鎖遊離反応に用いた本品タンパク質量 1 mg あたり 100 µL 添加

反応条件: 65°C で 2.5~3 時間

誘導体化糖鎖の精製

2-アミノベンズアミド誘導体化反応液にアセトンを 100 倍量添加し、遠心。沈殿物をアセトンで 2 回洗浄後、乾燥し、誘導体化糖鎖試料とする。

システム適合性試験用溶液: 標準物質から上記の操作で調製した誘導体化糖鎖又は市販の誘導体化標準糖鎖を調製溶液 (移動相 B/移動相 A 混液 (7:3)) で再調製した溶液。

試料溶液: 誘導体化糖鎖試料を糖鎖遊離反応に用いた本品タンパク質量 1 mg あたり 500 µL の調製溶液で溶解した液。

陰性対照: 試料を含まない酵素消化用溶液から上記の操作で調製し、調製溶液で再調製した溶液。

注入量: 10 µL

試験条件:

検出器: 蛍光光度計 (励起波長: 330 nm、蛍光波長: 420 nm)

カラム: カルバモイル基結合型シリカゲル (3 µm)、内径 4.6 mm、長さ 15 cm

カラム温度: 40°C 付近

移動相 A: ギ酸で pH 4.5 に調整したギ酸アンモニウム溶液 (6.3 g/L)

移動相 B : アセトニトリル

移動相の送液 : 移動相 A 及び移動相 B の混合比及び流量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%)
0-2	30	70
2-65	30→44	70→56

流量 : 毎分 1.0 mL

面積測定範囲 : 試料注入後 10 分から 65 分の範囲

システム適合性

システムの性能 :

陰性対照で、面積測定範囲にピークを認めない。

システム適合性試験用溶液で、G0F、Man5、G1F、G1'F、G2F (それぞれ図 1 のピーク 4、5、7、8 及び 9) の順に溶出し、それぞれの分離度が 1.0 以上

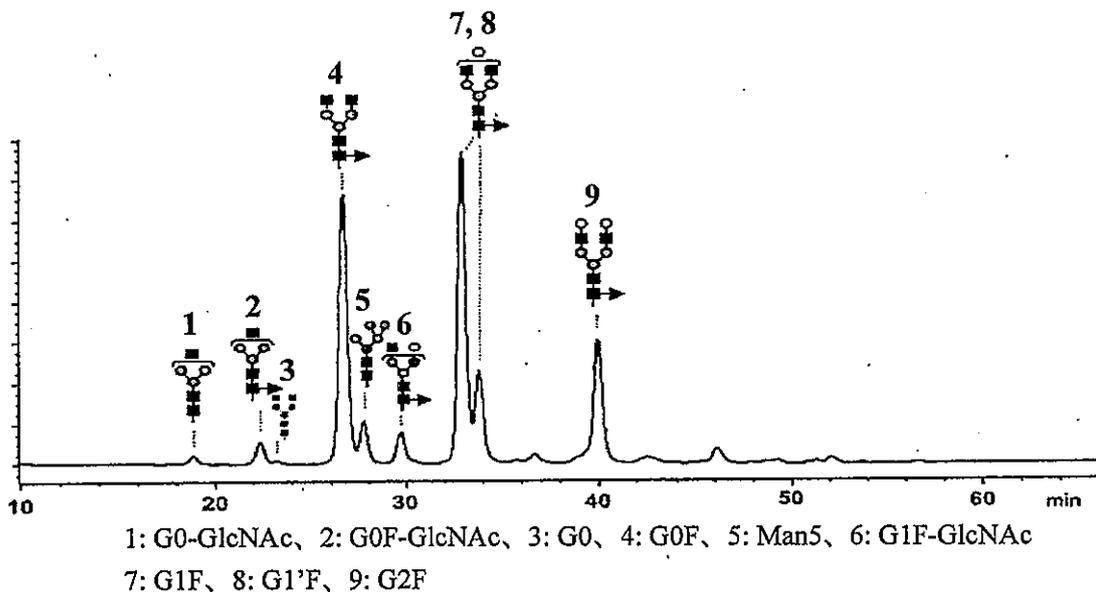


図 1 オリゴ糖プロファイルのクロマトグラムの場合

#### 試薬・試液

**PNGase F** : PNGase F (●●社製、製品番号 XXXXX、又は同等品)。1 ユニットは、国際単位である 1 IUB milliunit に等しい。

**2-アミノベンズアミド誘導体化試液** : 2-アミノベンズアミドをジメチルスルホキシド/氷酢酸混液 (7 : 3) に溶解 (50 mg/mL)。この液にシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加 (63 mg/mL)。

## 注釈

- 各規格やシステム適合性で記載している詳細な糖鎖構成（例：「フコシル化された糖鎖（G0F、G0F-GlcNAc、G1F、G1'F、G1F-GlcNAc 及び G2F）」）は、本記載例作成の際に参考とした図 1（原圖ら、Vol.44, No.4, 357-361(2013)より転用）の例を基とした一例である。実際には、検出される糖鎖の種類、その溶出順序や分離は、抗体分子やその分析条件により異なり、各製品固有で最適な構成を決定する必要がある。
- 本試料調製のように比較的複雑な手順の場合、合理化した箇条書きでの記載では手順の理解が難しいこともある。そのような時は現状の承認書と同様の叙述形式による記載を否定するものではない。そのような形式においても、濃度表記等の記載の合理化のコンセプトは適用可能であり、有効である。以下、叙述形式の合理化記載例：

### 試験試料の調製：

本品を、pH 7.2 のリン酸塩緩衝液に対する透析により脱塩を行い、pH 7.2 のリン酸塩緩衝液で希釈し、タンパク質濃度が約 1 mg/mL となるように調製する。この液 100  $\mu$ L あたり 1 ユニットの PNGase F を加え、37°C で 12~24 時間反応させる。限外ろ過ユニット（分画分子量 30 kDa）により遊離糖鎖を精製し、減圧下で蒸発乾固する。残留物に、酵素消化反応に用いた本品タンパク質量 1 mg あたり 100  $\mu$ L の 2-アミノベンズアミド誘導体化試液を加え、65°C で 2.5~3 時間加温する。反応終了後、放冷し、100 倍量のアセトンを加える。遠心分離・上澄液除去の操作を 2 回繰り返し、乾燥し、誘導体化糖鎖試料とする。

- 脱塩処理はゲルろ過スピンカラム、カーボン固相抽出カラム及び限外ろ過等も使用できるが、代表的な記載として透析処理の例を示す。
- 遊離糖鎖の精製には、カーボン固相抽出カラム等も使用できるが、代表的な記載として限外ろ過の例を示す。
- 2-アミノベンズアミドによる誘導体化の反応時間は、使用する還元剤の種類（例えばシアノ水素化ナトリウムやピコリンボラン）によって調整する。
- 誘導体化糖鎖の精製には、ゲルろ過スピンカラム及び親水性相互作用固相抽出カラム等も使用できるが、代表的な記載としてアセトン沈殿の例を示す。
- 試料の乾燥固化には、凍結乾燥等も使用できるが、代表的な記載として減圧乾固の例を示す。
- 承認書において、試薬試液の欄に、（●●社製、製品番号 XXXXX、又は同等品）との記載がある場合は、合理化した記載においても削除せずに記載する。
- PNGase はメーカーによりユニットの定義が異なるため、同等品の検証を容易にするため、単位の定義を国際単位に合わせて記載する。
- 試料調製以降の試験条件自体も一例であり、使用するカラムや分析器によって条件が異なる。

### 3) 日本薬局方や承認書相当の記載例

糖鎖プロファイル 糖鎖試験法 (2.64) の糖鎖プロファイル法により試験を行うとき、フコシル化糖鎖は X1-X2%、アフコシル化糖鎖は Y1-Y2% 及びハイマンノース型糖鎖は Z1% 以下である。本品の総タンパク質 200 µg に対応する量を、pH 7.2 のリン酸塩緩衝液に対する透析により脱塩を行う。この液に pH 7.2 のリン酸塩緩衝液を加え、1 µL 中に本品タンパク質 1 µg を含む液となるように調製する。この液 100 µL をとり、1 ユニットの PNGase F を加え、37°C で 12 ~ 24 時間保温する。限外ろ過ユニット (分画分子量 30 kDa) により遊離糖鎖を精製し、減圧下で蒸発乾固する。残留物に、10 µL の 2-アミノベンズアミド誘導体化試液を加え、65°C で 2 ~ 3 時間保温する。反応終了後、放冷し、アセトン 1 mL を加え、よく混和する。毎分 15000 回転で 10 分間遠心分離した後、上澄液を除く。この操作を 2 回繰り返す。アセトニトリル/移動相 A 混液 (7:3) 50 µL に溶かし、試料溶液とする。別に標準物質及び本品を含まない酵素消化用溶液を同様の方法で操作し、それぞれシステム適合性試験用溶液及び陰性対照とする。試料溶液、システム適合性試験用溶液及び陰性対照 10 µL を正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィー (2.01) により試験を行い、それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し、次式によりフコシル化糖鎖 (%)、アフコシル化糖鎖 (%) 及びハイマンノース型糖鎖 (%) を求める。

フコシル化糖鎖 (%)

= フコシル化された糖鎖 (G0F、G0F-GlcNAc、G1F、G1'F、G1F-GlcNAc 及び G2F) のピーク面積の和 / 糖鎖の総ピーク面積の総和 × 100

アフコシル化糖鎖 (%)

= フコシル化されていない糖鎖 (G0 及び G0-GlcNAc) のピーク面積の和 / 糖鎖の総ピーク面積の総和 × 100

ハイマンノース型糖鎖 (%)

= ハイマンノース型糖鎖 (Man5) のピーク面積の和 / 糖鎖の総ピーク面積の総和 × 100

試験条件:

検出器: 蛍光光度計 (励起波長: 330 nm、蛍光波長: 420 nm)

カラム: 内径 4.6 mm、長さ 15 cm のステンレス管に粒径 3 µm のカルバモイル基結合型シリカゲルを充填する。

カラム温度: 40°C 付近の一定温度

移動相 A: ギ酸アンモニウム 6.3 g を水 1000 mL に溶かし、ギ酸で pH 4.5 に調整した溶液

移動相 B: アセトニトリル

移動相の送液: 移動相 A 及び移動相 B の混合比及び流量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%)
0-2	30	70
2-65	30→44	70→56

流量: 毎分 1.0 mL

面積測定範囲: 試料注入後 10 分から 65 分の範囲

システム適合性

システムの性能: 陰性対照 10 µL につき、上記の条件で試験を行うとき、面積測定範囲にピークを認めない。システム適合性試験用溶液 10 µL につき、上記の条件で試験

を行うとき、G0F、Man5、G1F、G1'F、G2F（それぞれ図1のピーク4、5、7、8及び9）の順に溶出し、その分離度は1.0以上である。

#### 試薬・試液

**PNGase F** : PNGase F (●●社製、製品番号 XXXXX、又は同等品) を用いる。1ユニットは、国際単位である1 IUB milliunit に等しい。

**2-アミノベンズアミド誘導体化試液** : 2-アミノベンズアミド 500 mg をジメチルスルホキシド/氷酢酸混液 (7:3) 10 mL に溶解する。この液にシアノ水素化ホウ素ナトリウム 630 mg を加える。

## 2. 力価試験

### 1) 前提

- ▶ バイオ医薬品特有の試験法の記載例として、バイオアッセイによる比活性試験法を選択した。
- ▶ 日本薬局方に3各条収載されているG-CSF類の規格及び試験方法を元とした。
- ▶ しかし、3各条とも解析方法が異なるため、合理化した記載例を示すことが困難であった。そこでバイオアッセイで汎用される4パラメーター近似式でのロジスティック回帰により、2検体間の効力比を算出する方法に変更し、試験成立条件はUSP<1032>~<1034>を参考に設定した。
- ▶ インハウスで遺伝子導入や馴化などを経て樹立した細胞株を試験に用いる場合は、合理化記載の場合でも試薬試液欄に細胞の管理に関する情報を記載すべきと考えられる。USP monograph、Fligraestim に記載された細胞の管理方法を基に、当該記載を整理した。ただしUSP monograph で力価試験に使用される培地は日本薬局方と異なるため、必要に応じて日本薬局方記載に合わせている。

### 2) 合理化記載案

#### 比活性

試験方法 : NFS-60 細胞の細胞増殖アッセイ。プレートリーダーによる蛍光光度測定。4パラメーターロジスティック (4-PL) 回帰。

規格値/判定基準 : 本品の力価  $0.8 \times 10^8 \sim 1.2 \times 10^8$  単位/mg

$$\text{本品の力価 (単位/mg)} = S \times GM \times D_T / D_S / C$$

$S$  : 標準物質の力価 (単位/mL)、 $GM$  : 各プレートから求めた効力比 ( $P_r$ ) の幾何平均、 $D_T$  : 試料溶液の希釈倍率、 $D_S$  : 標準溶液の希釈倍率、 $C$  : 本品のタンパク質濃度 (mg/mL)

効力比 ( $P_r$ ) = 標準溶液の50%有効濃度 / 試料溶液の50%有効濃度

50%有効濃度 : 測定した蛍光光度を以下の4-PL回帰式にて解析し、求める。

$$y = D + \frac{A - D}{1 + (X/C)^S}$$

$y$  : 蛍光光度、 $X$  : 溶液の濃度、 $D$  : 上側漸近線、 $C$  : 50%有効濃度、 $A$  : 下側漸近

線、 $B$ ：勾配パラメーター

#### 分析方法

##### 試験試料：

標準溶液：標準物質を測定用培地で希釈した希釈系列（6 ng/mL～6 pg/mL の範囲で10段階）。

試料溶液：本品を測定用培地で希釈した希釈系列（6 ng/mL～6 pg/mL の範囲で10段階）。

陰性対照：測定用培地

NFS-60 細胞懸濁液：測定用培地中に  $5 \times 10^5$  個/mL。

##### アッセイ条件：

培養プレート：96 穴平底マイクロプレート

プレート数：3 枚使用

添加量：標準溶液、試料溶液又は陰性対照を 50  $\mu$ L/ウェル添加後、NFS-60 細胞懸濁液を 50  $\mu$ L/ウェル添加。

培養条件：37°C 付近（炭酸ガス培養器）、21～40 時間

染色：レザズリン溶液 10  $\mu$ L/ウェル添加、37°C（炭酸ガス培養器）、4～6 時間培養

蛍光光度測定：励起波長：530～560nm、測定波長：590nm

##### 試験成立条件

標準溶液の曲線の形状：上側漸近線及び下側漸近線間に直線部分を有する S 字曲線。

標準溶液の 4-PL curve の  $R^2$  値：0.95 以上。

陰性対照の蛍光光度： $A$  値を超えない。

標準溶液の  $A$  値に対する  $D$  値の比：2.5 倍以上。

試料溶液の  $A$  値と標準溶液の  $A$  値の比：0.8～1.2。

試料溶液の  $D$  値と標準溶液の  $D$  値の比：0.8～1.2。

試料溶液の  $B$  値と標準溶液の  $B$  値の比が：0.7～1.3。

次式により求める効力比の幾何相対標準偏差 (%GCV)：25%以下。

$$\%GCV = 100 \times (e^{SD_{ln} - 1})$$

$SD_{ln}$ ：各プレートから求めた効力比 ( $P_i$ ) を自然対数変換した結果の標準偏差

#### 試薬・試液

イスコフ改変ダルベッコ培地：イスコフ改変ダルベッコ液体培地（●●社製、製品番号 XXXXX、又は同等品）。

測定用培地：イスコフ改変ダルベッコ液体培地にウシ胎児血清 10vol%、1 mL 当たりベンジルペニシリンカリウム  $1.0 \times 10^4$  単位及びストレプトマイシン硫酸塩 0.01 g（力価）を含む液 1vol%及び2-メルカプトエタノール溶液(9→125) 0.005vol%を加える。

凍結用培地：ジメチルスルホキシドをウシ胎児血清に添加（10vol%）

継代用培地：G-CSF（●●社製、製品番号 XXXXX、又は同等品）を測定用培地に添加（10 ng/mL）

NFS-60 細胞：M-NFS-60 細胞（ATCC CRL-1838）を継代用培地にて継代して馴化させたのち、凍結用培地に懸濁し、凍結保存。試験に使用する際は、継代用培地にて 2

～25 回の範囲で継代した細胞を用いる。

レザズリン溶液： レザズリン（●●社製、製品番号 XXXXX、又は同等品）。

#### 注釈

- 培養温度については、設定値を 37°C 付近で記載した。許容域がもともとの承認事項となっている場合（37°C±2°C）、合理化記載案でも、37°C±2°Cとする必要があると考える。
- 炭酸ガス培養器の二酸化炭素濃度は培養液中の pH を保つことが目的であり、通常 5% であることから、合理化記載案では記載していない。特別な管理が必要な培養においては、合理化記載案でも記載が必要と考える。
- 培養条件、染色、の順は、培養後に染色液を加えることは常識的に読み取れる範囲と考え、合理化記載案では記載していない。
- 承認書において、試薬試液の欄に、（●●社製、製品番号 XXXXX、又は同等品）との記載がある場合は、合理化した記載においても削除せずに記載する。
- 試薬試液等で製品名を記載する場合は、販社、製品番号が変更される可能性を考慮し、“又は同等品”の記載をする。
- 試薬試液欄での培地の記載において、血清の非働化や培地の滅菌等は常識的に読み取れる範囲と考え、合理化記載案では記載していない。
- 試験に用いる細胞の継代数は、試験の再現性及び信頼性を保つため、融解後の最低必要継代数（2 回）及び継代数上限（25 回）を規定する。これらの継代数は細胞株により異なり、試験法バリデーションの頑健性の検証等でバリデートされた範囲で記載する。
- 培地の記載は、調製方法の詳細を省き、濃度組成が理解できる記載のみとする。
- 標準溶液と試料溶液の希釈系列の濃度域及び希釈段数は一般的に同一である。希釈段数は 4-PL 回帰に十分な数の、バリデートされた段数を設定し、本記載では 10 段階とした。
- プレート枚数は実際の日本薬局方の記載では 3 枚以上準備し、試験が成立したプレートすべての効力比の幾何平均から力価を求めている。しかし、プレート数の変動は試験系に内在するばらつきを変動させ、規格の許容範囲の妥当性に影響を及ぼすことから、本記載では固定のプレート数、3 枚を用いた。

### 3) 日本薬局方や承認書相当の記載例

#### 比活性

1 mL にタンパク質 0.5～6 ng を含む液となるように本品へ測定用培地を加えて試料溶液とする。1 mL にタンパク質 0.5～6 ng を含む液となるように標準物質に測定用培地を加えて標準溶液とする。8 行×12 列（96 ウェル）のマイクロプレート 3 枚を用いる。マイクロプレートの全ウェルに測定用培地 50  $\mu$ L を分注する。次に 12 列目の 2～4 行のウェルに標準溶液 50  $\mu$ L を加え、5～7 行のウェルに試料溶液 50  $\mu$ L を加える。次いで 12 列目から 50  $\mu$ L をとり、1 列目の対応する行のウェルに入れる。次に 1 列目から 50  $\mu$ L をとり、2 列目に入れ、順次 10 列目まで同様の操作を行い、2 倍段階希釈ウェルを調製する。11 列目は操作しない。NFS-60 細胞を含む培養液を遠心分離し、上澄液を吸引除去した後、測定用培地を加えて洗浄する。洗浄操作を 3 回繰り返した後、1 mL 中に細胞数  $5 \times 10^5$  個になるように測定用培地を加え、細胞懸濁液とする。マイクロプレートの全ウェルに細胞懸濁液 50  $\mu$ L を分注する（ただし、

1行目と8行目のウェルは試験に用いない)。炭酸ガス濃度5%の培養器内37℃で、21~40時間培養する。培養後、レザズリン液10µLを全ウェルに添加し、炭酸ガス濃度5%の培養器内37℃付近の一定温度で、4~6時間培養する。培養後、マイクロプレートリーダーを用い、励起波長530~560nm、測定波長590nmにおける蛍光光度を求める。

各濃度における蛍光光度から次の式に従い、4パラメーターロジスティック(4-PL)回帰式で解析し、標準溶液に対する試料溶液の効力比( $P_r$ )を求める。

$$y = D + \frac{A - D}{1 + (X/C)^B}$$

$y$ : 蛍光光度、 $X$ : 溶液の濃度、 $D$ : 上側漸近線、 $C$ : 50%有効濃度( $EC_{50}$ )、 $A$ : 下側漸近線、 $B$ : 勾配パラメーター

$P_r = \text{標準溶液の} C \text{ 値} / \text{試料溶液の} C \text{ 値}$

プレートそれぞれから求めた効力比の幾何平均(GM)から、以下の式で本品1mgタンパク質当たりの力価(単位/mg)を求める時、本品はタンパク質1mg当たり $0.8 \sim 1.2 \times 10^8$ 単位を含む。

本品の力価(単位/mg) =  $S \times GM_r \times D_T / D_S / C$

$S$ : 標準物質の力価(単位/mL)、 $D_T$ : 試料溶液の希釈倍率、 $D_S$ : 標準溶液の希釈倍率、 $C$ : 本品のタンパク質濃度(mg/mL)

#### 試験成立条件

標準溶液の曲線の形状: 上側漸近線及び下側漸近線間に直線部分を有するS字曲線であることを確認する。

標準溶液の4-PL curveの $R^2$ 値が0.95以上である。

陰性対照の蛍光光度(プレートの11列目)がA値を超えない。

標準溶液のA値に対するD値の比が2.5倍以上である。

試料溶液のA値と標準溶液のA'値の比が0.8~1.2である。

試料溶液のD値と標準溶液のD'値の比が0.8~1.2である。

試料溶液のB値と標準溶液のB'値の比が0.7~1.3である。

下記の式から求める効力比の幾何相対標準偏差(%GCV)が25%以下である。

$$\%GCV = 100 \times (e^{SD_{ln}} - 1)$$

$SD_{ln}$ : 各プレートから求めた効力比( $P_r$ )を自然対数変換した結果の標準偏差

#### 試薬・試液

イスコフ改変ダルベッコ培地: イスコフ改変ダルベッコ液体培地(●●社製、製品番号XXXXXX、又は同等品)を用いる。

測定用培地: イスコフ改変ダルベッコ培地90mLに56℃で30分間加温したウシ胎児血清10mL、ベンジルペニシリンカリウム $1.0 \times 10^5$ 単位及びストレプトマイシン硫酸塩0.1g(力価)を生理食塩液10mLに溶かした液1mL及び2-メルカプトエタノール溶液(9→125)5µLを加えた後、ろ過滅菌する。

凍結用培地: 56℃で30分間加温したウシ胎児血清90mLに、0.22µmのメンブランフィルターでろ過滅菌したジメチルスルホキシド10mLを加える。

継代用培地：G-CSF 0.2 mg をリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液 20 mL に溶かし、0.22  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターでろ過滅菌する。この液 0.1 mL に測定用培地 100 mL を加える。

NFS-60 細胞：M-NFS-60 細胞 (ATCC CRL-1838) を継代用培地にて 5 回以上継代して馴化させたのち、凍結用培地に  $1.5 \times 10^6$  個/mL の濃度で懸濁し、凍結保存する。試験に使用する際は、細胞を融解した後、継代用培地にて 2~25 回の範囲で継代した細胞を用いる。

レザズリン液：レザズリン (●●社製、製品番号 XXXXX、又は同等品) を用いる。

### 3. 結論

以上の検討から、バイオ医薬品に関しても、通知別添に示されている液体クロマトグラフィーを用いた化学薬品の規格及び試験方法と同様に、試験方法の品質を保証する上で、実質的な問題を生じることなく、承認申請書/承認書における規格及び試験方法欄の記載の合理化は可能と考えられた。

以上