

国立衛生試験所リゾチーム標準品 (Control 951)

北島 文・田頭 洋子・前川 京子・谷本 剛・岡田 敏史

Lysozyme Reference Standard (Control 951) of the
National Institute of Health SciencesAya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa,
Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada

The "Lysozyme Reference Standard (Control 951)" of the National Institute of Health Sciences was prepared. The lysozyme potency of the standard material was assayed against the Lysozyme Reference Standard (Control 915) by two turbidimetric methods using the drycells of *Micrococcus luteus* as the substrate. The potency of the standard material was in satisfactory agreement with that of Lysozyme Reference Standard (Control 915) and was defined as 1 mg [potency] per mg.

Keywords : lysozyme, Lysozyme Reference Standard, NIHS reference standard

(Received May 31, 1996)

国立衛生試験所第13回リゾチーム標準品 (Control 951) を製造したので、その試験成績を報告する。

1. 標準品原料

リゾチーム標準品原料として、6回再結晶したニワトリ卵白リゾチームを生化学工業(株)より購入した。

2. 試験方法

2.1 力 価

標準品原料の力価を第12回リゾチーム標準品 (Control 915) を対照として、次の2方法で測定した。この2方法はともに、*Micrococcus luteus* の乾燥菌体を基質とした溶菌活性測定を基本原理とするものである。

(1) 力価測定法1: 日本薬局方外医薬品規格¹⁾に記載された定量法に準じて測定した。

(2) 力価測定法2: 塩化リゾチームの迅速分析法^{2,3)}に準じて測定した。

2.2 アミノ酸組成

Spackmanらの方法⁴⁾に従い、L-8500型日立高速アミノ酸分析計を用いて行った。すなわち、標準品原料約1mgをとり、6mol/l塩酸0.5mlを加え、減圧下110℃で24時間加水分解し、その内容物を乾固し、その残留物についてアミノ酸分析を行った。

2.3 SDS-ゲル電気泳動

ファルマシア社製の全自動ゲル電気泳動装置、Phast System、を用いてSDS-ゲル電気泳動を行った。ゲルは本装置専用の既製ゲル(20%ポリアクリルアミドゲル)を用いた。標準品原料の適量を量り、水に溶かし、1ml当たりそれぞれ15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000,

2000 μ gを含む液を調製し、それぞれの液20 μ lに10% SDS溶液20 μ lを加えて、沸騰水浴中で5分間加熱し、試料溶液とした。

2.4 乾燥減量

日本薬局方外医薬品規格「塩化リゾチーム」の規格¹⁾に準じて、標準品原料の約100mgを精密に量り、105℃で2時間乾燥した。

3. 試験の結果

3.1 力 価

2種の力価測定法で求めた試料1mg中のリゾチーム量[mg(力価)]をTable 1に示した。力価測定法1では25回の、力価測定法2では18回の繰り返し測定によって求めた値は、それぞれ 0.991 ± 0.063 mg(力価)および 1.015 ± 0.045 mg(力価)であった。両測定法で求めた値には有意の差はなかった(t検定, $p=0.155$)。これらの結果から、標準品原料の1mgは1mg(力価)のリゾチームを含有することが示された。

3.2 アミノ酸組成

標準品原料のアミノ酸分析の結果を理論値およびリゾチーム標準品 (Control 915) の測定結果とともにTable 2に示した。標準品原料のアミノ酸組成は、半シスチンを除いて文献値⁵⁾とよく一致しており、リゾチーム標準品 (Control 915) のそれともよく一致していた。

3.3 電気泳動的純度

試験方法に記した試料溶液の1 μ lをPhast Systemで電気泳動し、その結果をFig. 1に示した。レーン1~3では過量添付のためテーリングが見られるものの、至適添付

Table 1. Potency of the material for Lysozyme Reference Standard

Exp. No.	Potency [mg(potency)/mg]	
	Method-1	Method-2
1	1.071	0.911
2	0.925	1.063
3	0.995	0.988
4	0.951	1.054
5	1.096	0.932
6	1.148	0.950
7	1.008	1.015
8	0.993	0.998
9	0.965	1.010
10	0.967	0.973
11	1.009	0.951
12	0.967	1.022
13	0.974	1.071
14	1.078	1.025
15	0.910	1.041
16	0.953	1.095
17	0.996	1.067
18	1.085	1.011
19	0.987	
20	0.958	
21	0.954	
22	0.926	
23	0.971	
24	0.938	
25	0.948	
Mean \pm S.D.	0.991 \pm 0.063	1.015 \pm 0.045

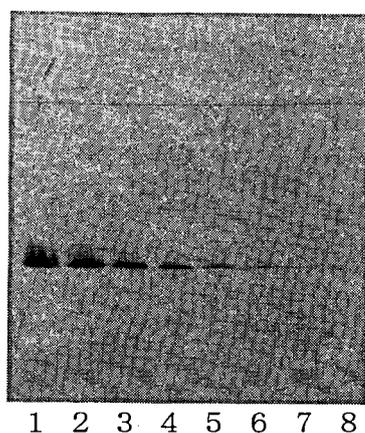


Fig. 1. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of the standard material

20% acrylamide gel (Homogenius 20, Pharmacia) was used. Applied amounts (ng) of the material were as follows; lane 1: 1000 ng, lane 2: 500 ng, lane 3: 250 ng, lane 4: 125 ng, lane 5: 62.5 ng, lane 6: 31.3 ng, lane 7: 15.6 ng, lane 8: 7.8 ng. Gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

量であるレーン4~7では単一のバンドが認められ、標準品原料は分子量的に均一な標品であることが示された。

3.4 乾燥減量

Table 2. Amino acid composition of the material for Lysozyme Reference Standard

Amino acid	Amino acid residues per mole of lysozyme		
	Material	Standard (Control 915)	Theoretical ⁵⁾
Asp	20.6	20.5	21
Thr	6.4*	6.7	7
Ser	7.7*	9.8	10
Glu	4.9	5.2	5
Pro	1.8	2.2	2
Gly	12.1	12.1	12
Ala	12.1	11.8	12
1/2Cys	2.0	2.4	8
Val	5.9	6.0	6
Met	2.0	2.2	2
Ile	5.8	5.9	6
Leu	8.1	8.1	8
Tyr	3.0	3.2	3
Phe	3.0	3.0	3
Lys	6.1	5.8	6
His	0.9	1.2	1
Arg	11.1	11.3	11

* uncorrected

日本薬局方外医薬品規格「塩化リゾチーム」の規格に準じた測定条件での標準品原料の乾燥減量は4.09% (S.D.: $\pm 0.24\%$, n=3)であった。ちなみに、同時に測定したリゾチーム標準品 (Control 915) の乾燥減量は6.11% (S.D.: $\pm 0.07\%$, n=3)であった。

まとめ

国立衛生試験所第13回リゾチーム標準品を製造するにあたり、標準品原料の力価を前回のリゾチーム標準品 (Control 915) を対照として2種の測定法で測定したところ、標準品原料の1 mgはそれぞれ 0.991 ± 0.063 mg (力価) および 1.015 ± 0.045 mg (力価) であり、両測定法での値はよく一致していた。また、標準品原料は電気泳動的に均一であり、そのアミノ酸組成は理論値とよく一致し、リゾチーム標準品 (Control 915) のアミノ酸組成とも差がなかった。これらの結果から、本標準品原料を国立衛生試験所リゾチーム標準品 (Control 951) とし、その1 mgはリゾチーム1 mg (力価) を含有するものと定めた。

文献

- 1) 厚生省薬務局審査：日本薬局方外医薬品規格, p. 310 (1993)
- 2) 厚生省薬務局監視指導課長通知, 薬監第49号 (平成4年9月24日)
- 3) 谷本 剛, 横田 崎江：月刊薬事, 36, 411 (1994)
- 4) D. H. Spackman, W. H. Stein and S. Moore: *Anal. Chem.*, 30, 1190 (1958)
- 5) R. E. Canfield: *J. Biol. Chem.*, 238, 2691 (1963)