

## 国立医薬品食品衛生研究所トロンビン標準品 (Control 961)

北島 文・岩田美保・前川京子・斎藤博幸  
谷本 剛<sup>#</sup>・岡田敏史

### Thrombin Reference Standard (Control 961) of National Institute of Health Sciences

Aya Kitajima, Miho Iwata, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito,  
Tsuyoshi Tanimoto<sup>#</sup> and Satoshi Okada

The "Thrombin Reference Standard (Control 961)" of National Institute of Health Sciences was prepared. The precision of filling into ampoule was about 1% as C.V. The content of a-thrombin was about 87%. The thrombin potency of the standard material was assayed against the Thrombin Reference Standard (Control 8710) according to the method of JP XIII and the potency was  $1033 \pm 59$  unit/ampoule. From the results, the potency of the proposed material for Thrombin Reference Standard was defined as 1,030 units per ampoule.

**Keywords:** thrombin, NIHS Reference Standard, potency

1962年に国立衛生試験所トロンビン標準品が新規に設定され、その後数次にわたるロット更新が行われてきたが、現行の標準品 (Control 871 シリーズ) の在庫が僅少となったため、新ロットの標準品を製造することになった。以下、新ロット製造の結果を報告する。

#### 実験方法

##### 1. 標準品

国立医薬品食品衛生研究所トロンビン標準品 (Control 8710) (610 単位/アンプル) を使用した。

##### 2. トロンビン標準品用原料

トロンビン標準品用原料は、ウシの血液から得たプロトロンビンにカルシウムイオンの存在下でトロンボプラスチンを作用させて製したトロンビンを精製した後、トロンビン溶液 1,000,000 単位当たりウシ血清アルブミン 1 g 及び乳糖 10 g を加え、1 アンプル中にトロンビン約 1,000 単位ずつ分注し、凍結乾燥したものであり、持田製薬株式会社 に依頼して調製した。

##### 3. 充てん精度

標準品用原料の製造工程における充てん精度を知るために、10 アンプルを用いて重量偏差試験及びたん白質含量の測定を行った。重量偏差試験は日局 12 重量偏差試験法に準じて試験した。たん白質量はウシ血清アルブミンを標

準にして Lowry 法<sup>1)</sup>で測定した。

##### 4. ゲル電気泳動

Laemmli の方法<sup>2)</sup>に従って試料溶液を調製した。すなわち、標準品用原料 1 アンプルの内容物をサンプルバッファー 0.5 ml に溶かし、沸騰水浴中で 15 分間加熱し、試料溶液とした。試料溶液 1  $\mu$ l を用いて、SDS-PAGE 用 12.5% ゲルで電気泳動した。電気泳動装置は PhastSystem を用いた。泳動帯の量比は画像解析で算出した。

##### 5. 力価測定法

日局トロンビン定量法を一部改良した方法<sup>3)</sup>で試験した。ただし、検液は濃度の異なる 2 種を製してそれぞれの凝固時間からその単位を求めた。

#### 結果とまとめ

標準品用原料の重量偏差試験及びたん白質量の試験結果はそれぞれ  $12.93 \pm 0.168$  mg (CV: 1.30%) 及び  $1.92 \pm 0.0178$  mg (CV: 0.93%) であり、製造工程での充てん量はよく管理されていた (Table 1)。トロンビンは製造工程中に自己消化によって一部低分子化するが、本標準品用原料の低分子化生成物 ( $\beta$ トロンビン) の電気泳動で求めた含量は約 13% であった (Fig. 1)。29 回の繰り返し測定で得られた標準品用原料 1 アンプルの平均含有力価は  $1,033.2 \pm 58.8$  単位であった (Table 2)。

以上の結果から、本標準品原料は 1 アンプル中に 1,030 単位のトロンビンを含むものと認定し、国立医薬品食品衛生研究所トロンビン標準品 (Control 961) (日本薬局方標

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; Hoenzaka 1-1-43, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-941-4419; Fax: 06-942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

Table 1. Weight variation test and content of protein of the material prepared for "Thrombin Reference Standard"

Sample No.	Weigh variation test (mg)	Content of protein (mg)
1	12.84	1.93
2	12.77	1.93
3	12.60	1.95
4	12.81	1.93
5	13.08	1.94
6	12.94	1.93
7	13.00	1.93
8	12.99	1.90
9	13.08	1.90
10	13.14	1.90
<b>Mean ± S.D.</b> <b>(C.V.)</b>	<b>12.93 ± 0.168</b> <b>(1.30%)</b>	<b>1.92 ± 0.0178</b> <b>(0.927%)</b>

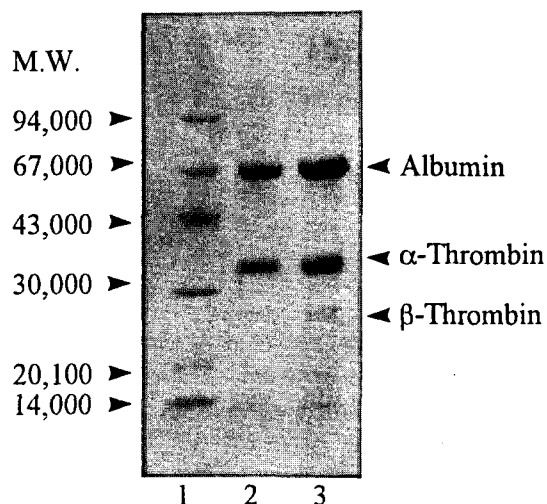


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the material prepared for "Thrombin Reference Standard"

1: Standard protein for molecular weight: phosphorylase b (M.W.: 94,000), bovine serum albumin (M.W.: 67,000), ovalbumin (M.W.: 43,000), carbonic anhydrase (M.W.: 30,000), trypsin inhibitor (M.W.: 20,100),  $\alpha$ -lactalbumin (M.W.: 14,400)  
 2: Sample (Ca. 1 mg of thrombin/mL)  
 3: Sample (Ca. 2 mg of thrombin/mL)

Table 2. Potency of the material prepared for "Thrombin Reference Standard"

Potency (unit/ampoule)										Mean ± S.D.
1035	1118	1005	935	1173	1019	1096	1035	1055	1044	1033.2 ± 58.8
985	1030	1043	1076	973	1142	907	981	1086	1097	
1047	1005	1003	1033	1033	997	978	1003	1005		

準品)として配布することにした。

#### 文 献

1) Lowry, O. H., Rowebrough, N. J., Farr, A. L. and

Randall, R. J.: J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951)

2) Laemmli, U. K.: Nature, **227**, 680 (1970)

3) 谷本 剛, 横田 橋江, 早川 堯夫: 医薬品研究, **25**, 988 (1994)