

国立医薬品食品衛生研究所トロンビン標準品 (Control)
(日本薬局方トロンビン標準品)(Control 031)

開原亜樹子・村上美保・森田有紀子・小出達夫・村井敏美・斎藤博幸・谷本 剛[#]

Thrombin Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

Akiko Kaihara, Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo Koide, Toshimi Murai, Hiroyuki, Saito and Tsuyoshi Tanimoto[#]

The "Thrombin Reference Standard (Control 031)", of National Institute of Health Sciences was prepared. The precision of filling into ampoule was about 11.5% as C.V. The content of α -thrombin was about 89%. The thrombin potency of the standard material was assayed against the Thrombin Reference Standard (Control 961) according to the method of JP and the potency was 692 ± 35 units/ampoule. From the results, the potency of the proposed material for Thrombin Reference Standard was defined as 690 units per ampoule.

Key Words: 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 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。国立医薬品食品衛生研究所トロンビン標準品(日本薬局方トロンビン標準品)の新ロット(第3回標準品, Control 031)を製造したので、その試験成績を報告する。

実験方法

1. 標準品

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690,000単位当たりウシ血清アルブミン1g及び乳糖10gを加え、1アンプル中にトロンビン約690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。

2. 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アンプルを用いて質量重量偏差試験及びたん白質含量の測定を行った。質量重量偏差試験は日局14質量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¹⁾で測定した。

3. ゲル電気泳動

Laemmliの方法²⁾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 μ Lを用いて、SDS-PAGE用12.5%ゲルで電気泳動した。泳動帯の量比は画像解析で算出した。

4. 力価測定法

標準品原料の力価は、第2回トロンビン標準品(Control 961)を対照として、日局トロンビン定量法を一部改良した方法³⁾により試験した。

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

Sample No.	Weight variation test (mg)	Content of protein (mg)
1	11.48	1.46
2	11.52	1.46
3	11.17	1.49
4	11.32	1.45
5	11.53	1.46
6	11.36	1.44
7	11.23	1.44
8	11.12	1.44
9	10.96	1.44
10	11.48	1.42
Mean \pm S.D.	11.32 \pm 0.19	1.45 \pm 0.02
C.V.	1.71	1.30

[#]To whom correspondence should be addressed:

Tsuyoshi Tanimoto; Hoenzaka 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel:06-6941-4419; Fax:06-6942-0716;

E-mail:tanimoto@nihs.go.jp

結果とまとめ

標準品用原料の質量重量偏差試験及びたん白質量の試験結果はそれぞれ 11.32 ± 0.19 mg (CV : 1.71 %) 及び 1.45 ± 0.02 mg (CV : 1.30 %) 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 (β -トロンビン) の電気泳動で求めた含量は約 11 % であった (Fig.1). 26 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

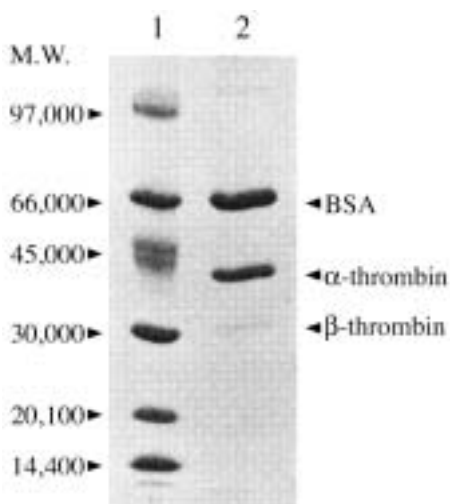


Fig.1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the material prepared for "Thrombin Reference Standard"

1: Standard proteins for molecular weight markers: phosphorylase b (M.W.: 97,000), bovine serum albumin (M.W.: 66,000), ovalbumin (M.W.: 45,000), carbonic anhydrase (M.W.: 30,000), trypsin inhibitor (M.W.: 20,100), α -lactalbumin (M.W.: 14,400)
 2: Sample (ca. 1 mg of thrombin/mL)

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

Exp.No.	Potency (unit/ampoule)	Exp.No.	Potency (unit/ampoule)
1	670	14	758
2	682	15	708
3	713	16	717
4	678	17	694
5	647	18	690
6	659	19	698
7	642	20	692
8	618	21	689
9	700	22	694
10	700	23	696
11	708	24	692
12	667	25	692
13	797	26	691
Mean \pm S.D.		692.1 \pm 34.5	

平均含有力価は 692.1 ± 34.5 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 690 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 (日本薬局方標準品) (Control 031) (日本薬局方標準品) として配布することにした.

文 献

- 1) Lowry, O.H., Rowebrugh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 2) Laemmli, U.K.: *Nature*, **227**, 680 (1970)
- 3) Tanimoto, T., Yokota, I., Hayakawa, T.: *Iyakuhin Kenkyu*, **25**, 988 (1994)