

全有機体炭素測定

TOC-L と TNM-Lによる
ワクチン中のタンパク質評価を目的とした
全窒素 (TN) 測定

バイオ医薬品中のタンパク質を評価するための有力な分析手法として、全窒素測定法があります。ここでは、Serum Institute of India Pvt. Ltd.社 (Pune, India) が製造するワクチンの測定例を紹介します。

窒素はタンパク質の構成単位であるアミノ酸の基本要素です。窒素の測定は医薬品や食品、飲料、植物などに含まれるタンパク質やその代謝の評価に広く用いられてきました。一般的に、窒素は硝酸塩 (NO_3^-) や亜硝酸塩 (NO_2^-)、アンモニウム (NH_4^+) などの有機体あるいは無機体の形で存在しています。

ワクチンの製造では製造サイクルの開始時及び中間点、終了時において抗原量を制御する必要があり、この抗原量の分析には弱毒化あるいは不活性化されたウイルスや細菌を用います。この抗原は通常はタンパク質から成るので、総タンパク質の定量が重要です。ジフテリア及び破傷風トキソイドは、百日咳抗原と組み合わせて混合DTPワクチンとして用いられます。このワクチンを子供が接種することで、ジフテリア及び破傷風、百日咳に対する免疫がつけられます。

従来、タンパク質中の窒素量推定にはケルダール法が用いられてきました。しかし、この方法には異なるアミノ酸配列を持つタンパク質ごとに別々のタンパク質換算係数が必要であることや、時間がかかる、労力を伴うなどの欠点があります。また、高温の濃硫酸の使用は危険で、注意が必要です。

本稿では、熱分解 - 化学発光法により全窒素 (TN) を迅速かつ効率よく測定して有機および無機窒素の評価を行い、その測定結果をケルダール法と比較しました。

M. Kaji M. Tanaka

■TN測定

窒素化合物を含むサンプルは、720°Cで燃焼することで一酸化窒素 (NO) に分解されます。NOガスは冷却および除湿されて化学発光検出器へ送られ、そこでNOはオゾンと反応して二酸化窒素 (NO_2) と励起状態の二酸化窒素 (NO_2^*) の混合状態になります。

NO_2^* が基底状態に戻る際に光を発生し、この化学発光の強度を検出して試料中の窒素濃度に比例したピークが生じます。このTN分析の反応プロセスを図1に示します。

ここでは、従来のケルダール法とTOC/TN (熱分解 - 化学発光) 法それぞれによるDPTワクチンのTN測定を比較した結果を示します。



図1 TN検出原理



図2 TOC-L とTN M-Lオプション

■実験

ケルダール法とTOC/TN法を比較するため、Serum社の破傷風とジフテリアトキソイド、百日咳毒素、FHA (線維状赤血球凝集素) ワクチンの各3バッチを使用しました。TN分析は、全有機体炭素測定装置TOC-L_{CPH} と全窒素測定ユニットTNM-Lを用いて行いました。

TOC-L_{CPH}とTNM-Lを使用したTOC/TN法とケルダール法でアミノ酸標準試料を測定した結果を表1に示します。1000 mg/LのL-グルタミン酸と500 mg/LのL-ヒスチジンを使用して回収率試験を行いました。

TOC/TN法でのTN測定の校正は、硝酸カリウム標準水溶液で行いました。

表1 アミノ酸のTN測定結果

試料	ケルダール法 窒素量(mg/L)	TOC/TN法 窒素量(mg/L)	回収率
L-グルタミン酸 (1000 mg/L)	95.2	91.5	96.11
L-ヒスチジン (500 mg/L)	101.6	100.3	98.72

■結果と考察

ケルダール法とTOC/TN法で各ワクチンを分析した結果を表2、3に示します。

図3の硝酸カリウムの検量線では相関係数 (r) ≥ 0.9997 で、良好な相関を示しました。また、アミノ酸測定で得られた代表的なデータを図4に示します。

TOC/TN法によって測定したアミノ酸の全窒素量の回収率は100 \pm 10%以内であり、ケルダール法とほぼ等しくなりました。

表 2 TOC/TN法とケルダール法による精製破傷風及び精製ジフテリアトキソイド測定結果

試料	バッチ	TOC/TN法窒素量 (mg/mL)	ケルダール法窒素量 (mg/mL)
精製破傷風トキソイド	バッチ1	1.496	1.546
精製破傷風トキソイド	バッチ2	2.160	2.205
精製破傷風トキソイド	バッチ3	1.935	1.991
精製ジフテリアトキソイド	バッチ1	1.481	1.537
精製ジフテリアトキソイド	バッチ2	1.523	1.559
精製ジフテリアトキソイド	バッチ3	1.544	1.587

表 3 TOC/TN法及びケルダール法による精製百日咳毒素とFHA毒素測定結果

試料	バッチ	TOC/TN法窒素量 (μ g/mL)	ケルダール法窒素量 (μ g/mL)
精製百日咳毒素	バッチ1	71.590	69.100
精製百日咳毒素	バッチ2	79.220	74.500
精製百日咳毒素	バッチ3	83.260	76.500
精製FHA抗原	バッチ1	86.080	81.600
精製FHA抗原	バッチ2	35.540	32.900
精製FHA抗原	バッチ3	94.790	96.600

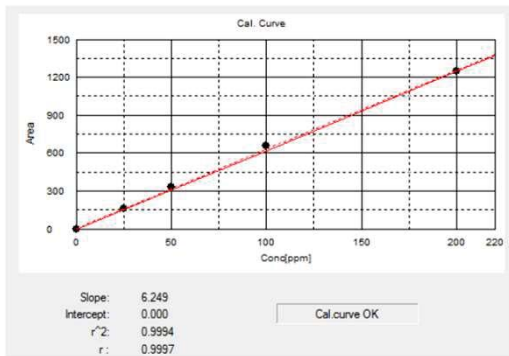


図 3 TN検量線

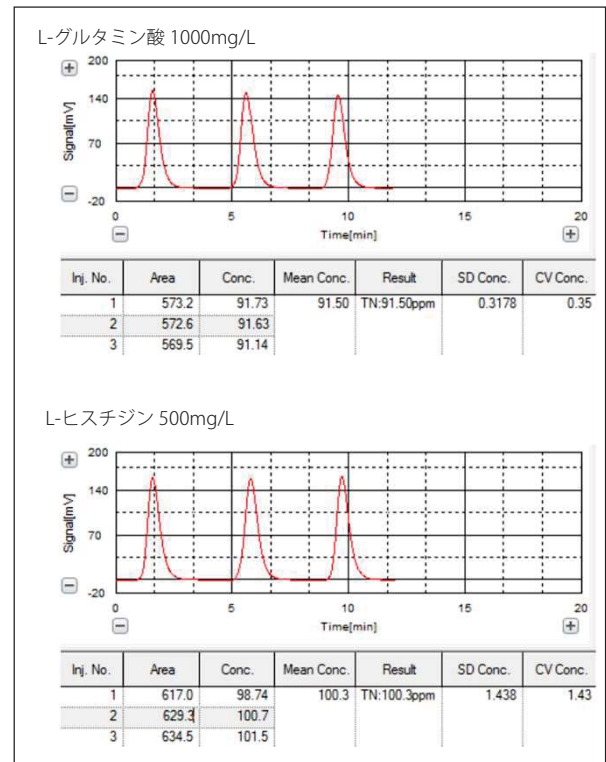


図 4 アミノ酸のTN測定結果

■結論

今回のTOC/TN法の測定結果は従来のケルダール法とほぼ等しいものとなり、TOC-LとTNM-Lを用いてタンパク質中の全窒素量を有効に測定できることがわかりました。

TOCとTNM-Lによる方法は短時間で安全、確実にタンパク質分析を行うことができ、このアプリケーションは医薬品およびバイオ医薬品を含む多様な窒素評価を目的とした研究に応用できる可能性があります。

■謝辞

- 1) 本研究においてワクチンをご提供いただいたSerum Institute of India Pvt. Ltd.社に、感謝の意を表します。
- 2) 代理店 M/S Saksham Analytical Instruments Pvt. Ltd.社の優れたアプリケーションとサービスに多大なる感謝を表します。

■参考文献

[1] ASTM D8-83-16: A New Method for Total Nitrogen(TN) & Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)

本資料はSHIMADZU Analytical (India) Pvt. Ltd.が作成したアプリケーションニュース SP-04-ADI-048から抜粋したものです。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。