

FUJIFILM

Wako

Code 297-52601

エンドトキシン検出用

Limulus F Single Test *Wako*

リムルスFシングルテストワコー 25回用

使用説明書

〔はじめに〕

エンドトキシン（内毒素）は、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖（LPS）であり代表的な発熱性物質（パイロジェン）です。エンドトキシンにより汚染された血液、輸液、注射薬が体内に入ると発熱やショックなどの重篤な副作用をひき起すため、これらの医薬品のエンドトキシンによる汚染はきびしく検査する必要があります。

1956年、F. B. Bang が、グラム陰性菌によるカプトガニ体液の凝固を報告し¹⁾、さらに、1964年、J. Levin と F. B. Bang が、Limulus Amebocyte Lysate（LAL）の凝固がエンドトキシンによってひき起こされることを発見して以来²⁾、LALを用いたエンドトキシン検出法は、鋭敏で簡便な方法として広く用いられております。リムルステストとして知られるこの方法は、1980年、米国薬局方に記載され、1988年には、日本薬局方にも記載されました。

本キットは、LAL 試薬 LAL F と Control Standard Endotoxin（CSE）からなり、高感度で迅速にエンドトキシンを測定することができます。LAL F は、FDAに認可されたもので、米国標準エンドトキシンによるゲル化感度を力価として表示してあります。CSE は、*E. coli* UKT-B 株からフェノール法³⁾によって抽出、精製したリポ多糖（Lipopolysaccharide, LPS）500 ngに添加剤としてマンニトールを加え、凍結乾燥したもので、参考値として米国標準エンドトキシンを用いて検定した力価を表示してあります。

なお、本品による試験をウサギによる発熱性物質試験の代用とすることは認められておりませんのでご注意ください。

〔特長〕

1. 本品はFDAの認可を受けた試薬です。
2. 高感度でエンドトキシンを測定できます。
3. 強固なゲルが形成されるように工夫されておりますので、ゲル化判定が極めて容易です。
4. 測定に必要なだけLALを使用できますので無駄がありません。
5. 本品は冷蔵（2～8℃）保存で長期間安定であり、正確で再現性のよい結果が得られます。

〔原 理〕

エンドトキシンによるLALのゲル化機構は、下図のように考えられています。すなわち、LAL中に含まれるセリンプロテアーゼが順次活性化され、最後に凝固性蛋白（コアギュロゲン）が水解されてコアギュリンとなり、不溶性のゲルを形成するというものです⁹⁾。（図1）

ゲル化法では、LALと検体を混合し、37℃、1時間反応後、180°転倒しゲル形成の有無を観察することにより判定を行います。

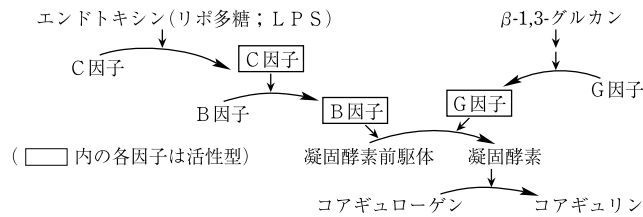


図1. カプトガニ体液凝固のカスケード機構

〔内 容〕

1. LAL 試薬 LAL F, 米国産カプトガニ (*Limulus polyphemus*) の血球抽出物, 凍結乾燥品…………… 25 バイアル (0.2 mL用)
力価: 米国標準エンドトキシン 0.25 EU/mL でゲル化します。
* 2~8℃保存 *
2. コントロールスタンダードエンドトキシン, 凍結乾燥品
…………… 1 バイアル (精製LPS 500 ng)
E. coli UKT-B の菌体から精製したエンドトキシンです。
添加剤としてマンニトールを含みます。
* 2~10℃保存 *

〔使用方法〕

I. 使用器具及び用意するもの

1. ピペット (0.2 mL, 0.5 mL, 2.0 mL, 5.0 mL 用)
2. 希釈用試験管 (アルミキャップ付き)
3. ブロックヒーター
または反応中試験管が振動しない恒温槽 (37℃)
4. エンドトキシン試験用水 (通常は局方注射用水が使用できます。)

注) 以下の操作には試験管, ピペットなどの器具は 250℃で 30分以上乾熱滅菌したものを, 水はエンドトキシン試験用水を用いて下さい。マイクロピペット用チップなどのプラスチック製品を用いる場合はエンドトキシンの汚染及び測定に対する干渉のないことを確認して下さい。

II. 測定手順

1. コントロールスタンダードエンドトキシン (CSE) の溶解
CSEのゴム栓をゆっくりとはずします。CSE表示含量を参照して終濃度が1000 EU/mL となるようにエンドトキシン

試験用水を加え、再びゴム栓をし数回転倒攪拌した後、ボルテックスミキサーで約2分間激しく攪拌してください。溶解後は2~10℃保存して1ヶ月以内に使用してください。保存したものを使用时には1分間以上ボルテックスミキサーで攪拌してください。

2 エンドトキシンの希釈及び試料のpH調整・希釈

希釈は氷冷下で行い、希釈したエンドトキシン及び試料溶液は氷冷してできるだけ速やかに使用してください。各希釈溶液は次の希釈操作を行う前に30秒以上ボルテックスミキサーで攪拌します。1段階の希釈で10倍をこえる希釈はしないでください。

0.20 mLの試料溶液でLAL試薬を溶解したもののpHが6.0から8.0の範囲からはずれている場合には、試料溶液のpHを適当な濃度の水酸化ナトリウムまたは塩酸溶液で6.0から8.0になるように調整してください。

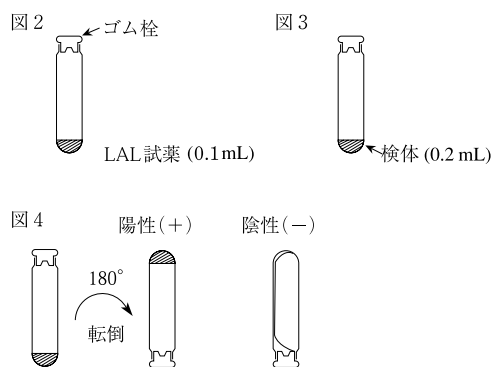
3 検体の添加および反応

必要な本数のLAL試薬をラックに並べゴム栓を緩めておきます。(図2)

これに検体を0.20 mLずつ加え再びゴム栓をして静かに混和しLAL試薬が充分溶解したことを確認した後、 37 ± 1 ℃で 60 ± 2 分間静置加温します。(図3)

4 判 定

加温終了後、試験管を取り出し振動を与えないように注意してゆっくりと180°転倒します。内容物が凝固して変型しない場合を陽性、それ以外の場合を陰性と判定します。(図4)



Ⅲ. 阻害促進の確認

試料溶液はあらかじめリムテストに対して阻害や促進作用がないことを確認しておかなければなりません。0.20 mLの試料溶液でLAL試薬を溶解したもののpHが6.0~8.0の範囲からはずれる場合には、適当な濃度の水酸化ナトリウムまたは塩酸溶液で試料のpHを上記の範囲に調整する必要があります。

(方法)

(1) エンドトキシンの2倍希釈系列(0.0625~0.5 EU/mL)をエンドトキシン試験用水で作成します。次に試料溶液5.0 mLにエンドトキシン50 EU/mL溶液を50 μ L添加します。(エンドトキシンの終濃度は0.5 EU/mLとなります。)添加したエンドトキシンの終濃度が0.0625 EU/Lとなるまでこの溶液を試料溶液で順次2倍希釈します。(試料の濃度は一定でエンドトキシンの濃度が0.0625~0.5 EU/mLとなります。)

(2) (1)で調製したエンドトキシンの希釈系列と一定濃度の試料が共存したエンドトキシンの希釈系列、およびエンドトキシンを添加しない試料溶液、陰性コントロール(エンドトキシン試験用水)について測定を行います。測定の繰り返し数はUSP「Bacterial Endotoxins Test」に従ってください。

(3) 陰性コントロールが陰性判定されること、エンドトキシンを添加していない試料溶液が陰性判定されること、エンドトキシンの希釈系列から求めたエンドポイントの幾何平均が0.125 EU/mL以上0.5 EU/mL以下となること、これらの条件がすべて満たされたとき試験は有効となります。

陰性コントロールが陰性判定され、かつエンドトキシンを添加していない試料溶液が陽性判定された場合には、試料溶液にもともと内在しているエンドトキシンを限外濾過その他の方法で除くか、または陽性判定されなくなるまで希釈した試料溶液を使用して再度同様の試験を行ってください。

試験が有効になった場合に、一定濃度の試料が共存したエンドトキシンの希釈系列より求めたエンドポイントの幾何平均が0.125 EU/mL以上0.5 EU/mL以下であれば、試料はリムルステストに影響を与えないといえます。

試料がリムルステストに影響を与える場合には、試料を希釈して同様の試験を行ってください。この際“Ⅳ. 試料の影響を調べる予備試験”を行って影響がなくなる試料の濃度をおおよそ知ることができます。

Ⅳ. 試料の影響を調べる予備試験

試料溶液の希釈系列(希釈倍率は試料溶液の影響の程度に合わせて適当に選択します。)を作成し、それぞれに終濃度がLAL試薬の表示力価の2倍濃度になるように(この場合は0.5 EU/mL)エンドトキシンを添加します。エンドトキシンを添加した試料溶液の希釈系列と、エンドトキシンを添加しなかった試料溶液の希釈系列を同時に測定します。

エンドトキシンを添加したある濃度の試料が陽性判定されて、かつ同じ濃度の試料でエンドトキシンを添加しなかったものが陰性判定される場合に、試料はその濃度まで希釈すれば影響がなくなると推測されます。

Ⅴ. 日常の測定

検体として次のものを少なくともそれぞれ2回の繰り返し(n=2)で測定します。

陰性コントロール（エンドトキシン試験用水）

エンドトキシンの希釈系列（0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 EU/mL）

試料溶液

試料溶液に終濃度がLALの表示力価の2倍濃度になるように（この場合は0.5 EU/mL）エンドトキシンを添加したもの（陽性製品コントロール）

陰性コントロールが陰性判定されること、エンドトキシンによるエンドポイントの幾何平均が0.125 EU/mL以上0.5 EU/mL以下であること、陽性製品コントロールが陽性判定されること、試料溶液が陰性判定されること、以上を満たしたとき試料溶液中のエンドトキシン量は0.25 EU/mL未満であると判定されます。

試料溶液が陽性判定された時には試料溶液のエンドトキシン試験用水による2倍希釈系列を測定して下さい。試料中のエンドトキシン量は

〔LAL試薬の表示力価（EU/mL）〕 × 〔試料溶液の希釈系列の中で陽性判定される最大希釈倍率〕 の式で求められます。

〔付録 本品に添付のCSEのEU表示値の決定方法〕

1. Table 1, 2に示すように米国標準エンドトキシン（RSE）及び4バイアルのCSEの2倍希釈系列を作成します。

RSE 0.0625～0.5 EU/mL とCSE 0.00625～0.05 ng/mLを各濃度で4回の繰り返しでゲル化法により測定します。

RSEのエンドポイントの幾何平均を求め、（Table 3 実施例参照）同様に求めたCSEのエンドポイントの幾何平均（Table 4 実施例参照）で割り、CSEの重量当りのエンドトキシン単位（EU/ng）を求めます。これにCSE 1バイアルあたりの含量500 ngを乗じて、CSE 1バイアルあたりのEU表示による含量を求めます。

* ただし使用するLAL試薬のロットが変われば、CSEの重量当りのエンドトキシン単位（EU/ng）も変化する可能性がありますので、再検定してください。本品のCSEには製品で組合せたロットのLAL試薬で検定した力価が参考値として表示してあります。

Table 1 RSE の希釈系列

RSE soln.(mL)	H ₂ O (mL)	final RSE conc. (EU/mL)
0.5 (2000 EU/mL)	4.5	200
0.5 (200 EU/mL)	4.5	20
0.5 (20 EU/mL)	4.5	2.0
2.0 (2.0 EU/mL)	2.0	1.0
2.0 (1.0 EU/mL)	2.0	0.5
2.0 (0.5 EU/mL)	2.0	0.25
2.0 (0.25 EU/mL)	2.0	0.125
2.0 (0.125 EU/mL)	2.0	0.0625

Table 2 CSE の希釈系列

CSE soln.(mL)	H ₂ O (mL)	final CSE conc. (ng/mL)
0.5 (100 ng/mL)	4.5	10
0.5 (10 ng/mL)	4.5	1.0
0.5 (1.0 ng/mL)	4.5	0.10
2.0 (0.1 ng/mL)	2.0	0.05
2.0 (0.05 ng/mL)	2.0	0.025
2.0 (0.025 ng/mL)	2.0	0.0125
2.0 (0.0125 ng/mL)	2.0	0.00625

Table 3 RSE のエンドポイント実測結果例

Replicate	Endotoxin (EU/mL)					endpoint(EU/mL)
	NC	0.5	0.25	0.125	0.0625	
1	-	+	+	+	-	0.125
2	-	+	+	-	-	0.25
3	-	+	+	-	-	0.25
4	-	+	+	-	-	0.25

Table 4 CSE のエンドポイント実測結果例

Replicate	Endotoxin (EU/mL)					endpoint(ng/mL)
	0.05	0.025	0.0125	0.00625	0.003125	
CSE (バイアル 1)	1	+	+	+	-	0.0125
	2	+	+	-	-	0.025
	3	+	+	-	-	0.025
	4	+	+	-	-	0.025
CSE (バイアル 2)	1	+	+	-	-	0.025
	2	+	+	-	-	0.025
	3	+	+	-	-	0.025
	4	+	+	-	-	0.025
CSE (バイアル 3)	1	+	+	-	-	0.025
	2	+	+	-	-	0.025
	3	+	+	-	-	0.025
	4	+	-	-	-	0.05
CSE (バイアル 4)	1	+	+	-	-	0.025
	2	+	+	-	-	0.025
	3	+	+	+	-	0.0125
	4	+	+	-	-	0.025

RSEのエンドポイントの幾何平均

$$\frac{\log(0.125) + 3 \log(0.25)}{4} = -0.677$$

$$\text{antilog}(-0.677) = 0.210 \text{ EU/mL}$$

CSEのエンドポイントの幾何平均

$$\frac{2 \log(0.0125) + 13 \log(0.025) + \log(0.05)}{16} = -1.621$$

$$\text{antilog}(-1.621) = 0.0239 \text{ ng/mL}$$

従ってCSEの力価は、

$$\frac{0.210}{0.0239} = 8.79 \text{ EU/ng} = 8.8 \text{ EU/ng}$$

CSEのEU表示による1バイアルあたりの含量は、

$$8.8 \times 500 = 4400 \text{ EU/vial}$$
 となる。

〔参考文献〕

1. Bang, F.B. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **98**, 325 (1956).
2. Levin, J. and Bang, F.B. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **115**, 265 (1964).
3. Westphal, O., Lüderitz, O., Eichenberger, E. and Keiderling, W. : *Z. Naturforsch.*, **7b**, 536 (1952).
4. Akama, K., Kuratsuka, K., Homma, R., Kanoh, S., Niwa, M., Iwanaga, S. and Nakahara, C. : *Bacterial Endotoxin*, eds. Homma, J.Y. *et al.*, p395, Verlag Chemie (1984).
5. 中村隆範, 森田隆司, 平永万寿代, 宮田敏行, 岩永貞昭 : 日本細菌学雑誌, **38** (6), 781 (1983).
6. *The United States Pharmacopeia 22th, The National Formulary 17th*, p1493, U.S. Pharmacoperial Conversion Inc. (1990).
7. Oishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39** (5), 194 (1985).

製造販売元

富士フィルム 和光純薬株式会社
大阪市中央区道修町三丁目1番2号
Tel : 06-6203-3741

ライセート試薬製造元

Charles River Endosafe
Div. of Charles River
Laboratories, Inc.
1023 Wappo Rd., Suite 43-B
Charleston, SC 29407
Telephone : +1-843-766-7575

1808KA1