

(109×210mm Size)

FUJIFILM

Wako

Code No. 294-22441

エンドトキシン検出用

カプトガニ血球抽出物 HS-J, 凍結乾燥品

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（ピロジェン）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、米国薬局方に収載され、1988年には、日本薬局方にも収載されました。

本品は高い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試薬は、日本薬局方で定められた標準エンドトキシン(JPSE)を用いて検定したゲル化感度を力価として表示してあります。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. 高感度でエンドトキシンを測定できます。
2. 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。
3. ゲル化法だけでなく、並列型比濁時間分析装置トキシノメーターに用いることができます。トキシノメーターを用いることにより、さらに精度よく高感度にエンドトキシンの定量が行えます。
4. 本品は冷蔵（2～10℃）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³⁾（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。

トキシノメーターでは、ゲル化にともなう生じる濁度を透過光量比としてとらえ、透過光量比が前もって設定したしきい値に達するまでの時間をゲル化時間（Tg）とし、Tgを比較することによってエンドトキシン濃度を算出します。

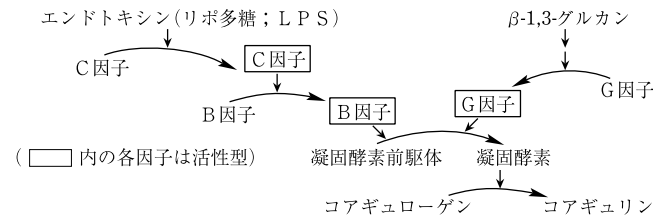


図1. カプトガニ体液凝固のカスケード機構

〔内 容〕

LAL試薬、米国産カプトガニ (*Limulus polyphemus*) の血球抽出物、凍結乾燥品…………… 1バイアル (50回用)
力価：日本薬局方で定められた標準エンドトキシン 0.03 EU/mLでゲル化します。

* 2～10℃保存 *

〔使用方法〕

A. ゲル化法で測定する場合

I. 使用器具及び用意するもの

1. ピペット (0.1mL, 0.5mL, 2.0mL, 5.0mL, 10.0mL)
2. 希釈用試験管 (アルミキャップ付き)
3. 反応用試験管 (専用試験管)
4. アルミキャップ
5. 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℃)
6. 標準エンドトキシン (日本薬局方標準エンドトキシンまたはコントロールスタンドエンドトキシン)
7. 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60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. LALの溶解

LAL試薬のアルミキャップをはずし、台上でバイアルの底を数回軽く叩きゴム栓に付着しているLALの粉末をバイアルの底に落とします。少量のLALがゴム栓等に付着している程度では試験の結果に影響はありません。

ゴム栓のアルミキャップに接触していた部分（この部分はずもととエンドトキシンフリーではありません。）以外は触れないようにしてください。バイアルの口の内側に触れないように注意してゴム栓を持ち上げて開栓します。バイアルの内部は真空になっていますので、粉末が舞い上がらないようにゆっくりと開けてください。乾熱滅菌したスパテラ、ピンセット、ピペットの先端などを使用してゴム栓を持ち上げる方法をおすすめします。はずしたゴム栓は汚染しないように足を上に向けて置きます。

エンドトキシン試験用水5.2mLをピペットでバイアルの口を濡らさないようにゆっくりと加え、再びゴム栓をして氷冷下で置きます。15分程でほぼ溶けるのでゴム栓に内容液がつかないように注意してゆっくりと振り混ぜ完全に溶かします。泡立ったり、激しく攪拌したりしないでください。

溶解したLAL試薬は氷冷下で置き、できるだけその日のうちに使用してください。保存する場合は-20~-30℃で凍結し2週間以内に使用してください。凍結融解を繰り返すと力価が変化することがあります。凍結融解は1回にとどめて下さい。

2. エンドトキシンの溶解

各々のエンドトキシンによって指定された溶解法に従って下さい。

3. 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。

試料溶液とLAL試薬を等量混合したものの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。

4. LAL試薬の分注および反応

反応用試験管を試験管の口に触れないように取り出し、ラックに立ててすみやかにアルミキャップをかぶせます。LAL試薬を再度ゆるやかに攪拌して均一であることを確認してから、反応用試験管に0.10mLずつ分注します。(図2)

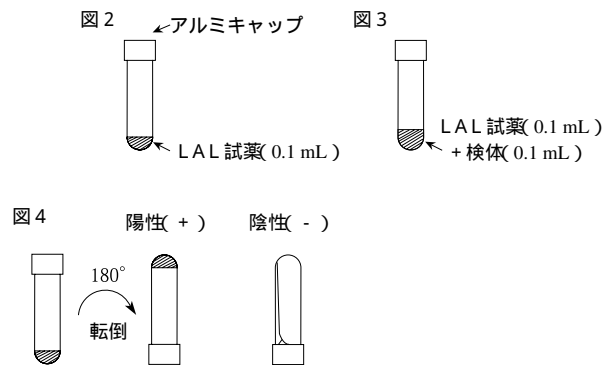
これに検体を0.10mLずつ加えアルミキャップをして静かに混和した後、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 60 ± 2 分間静置加温します。(図3)

5. 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)

B. トキシノメーターで測定する場合

別途“トキシノメーターにおける標準操作法”をご請求ください。



〔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. 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).
4. *The United States Pharmacopeia 22th, The National Formulary 17th*, p 1493, U.S. Pharmacopeial Convention Inc (1990).
5. Oishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39** (5), 194 (1985).

製造販売元

富士フイルム 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

1803KA1