

Limulus J Single Test *Wako*

25 tests

Package insert

[Summary and General Information]

Endotoxin, lipopolysaccharide (LPS) is a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Since endotoxin causes serious symptoms such as fever and shock in the human body, the bacterial endotoxin test for pharmaceuticals, especially parenteral drugs, is important.

In 1956, F. B. Bang reported clotting of the horseshoe crab body fluid due to Gram negative bacteria¹⁾. In 1964, J. Levin and F. B. Bang discovered that horseshoe crab amebocytes (Limulus amebocyte lysate, or LAL) contained all the components needed to clot due to endotoxin²⁾. Subsequently, bacterial endotoxin detection by the Limulus test has been widely used. This method known as the Bacterial Endotoxin Test was recognized in 1980 by United States Pharmacopoeia and, in 1988 by Japanese Pharmacopoeia^{3) 4)}.

This kit contains LAL reagent and Control Standard Endotoxin (CSE) and can rapidly assay and detect endotoxin with high sensitivity. In addition, the labelled gel-clot sensitivity was determined using the Japanese Pharmacopoeia Reference Endotoxin (JP-RSE). CSE contains 500 ng LPS (Lipopolysaccharide, LPS) which has been extracted and purified from *E. coli* UKT-B by phenol method^{5) 6)}, and combined with mannitol and glycine as additives, and is tested in comparison to the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard Endotoxin and the potency is printed on the label as a reference.

[Features]

1. Highly sensitive for detection of endotoxin.
2. Gel forms strongly and easy to determine.
3. Single test vials mean there is no reagent wasted.
4. Store at 2~10°C.

[Principle]

In the gelation of LAL by endotoxin, serine proteases are activated in the cascade reactions. In the last reaction, the gel-forming protein precursor (coagulogen) is hydrolyzed to coagulin, which makes an insoluble gel (Fig. 1).

The gel-clot technique is that LAL reagent is mixed with a sample. The mixture is incubated at 37°C for one hour. It is assayed by turning the tube upside down to determine if a gel has formed.

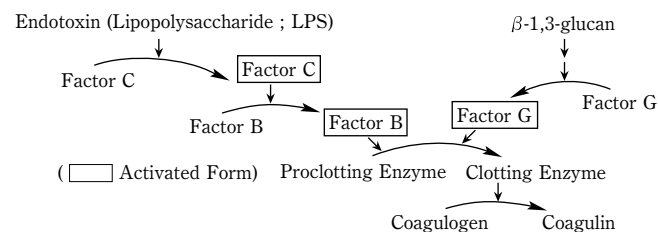


Fig. 1 the cascade system of Limulus Amebocyte Lysate

[Kit Contents]

1. LAL Reagent, lyophilized 25 tubes containing lyophilized extract of *Limulus polyphemus* amoebocytes

..... 25 vials (for 0.20 mL)

Gel-clot sensitivity was determined using the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard Endotoxin

Store at 2 to 10°C

2. Control Standard Endotoxin, lyophilized 1 vial × 500 ng (as purified LPS) Endotoxin purified from *E. coli* UKT-B, containing mannitol and glycine as additives.

Store at 2 to 10°C

[Usage]

I. Materials required but not supplied

1. Pipettes (for 0.2 mL, 0.5 mL, 2.0 mL and 5.0 mL)
2. Test tubes with aluminum caps for dilution of standard solutions
3. Block heater or an incubator able to maintain 37 ± 1°C.
4. Endotoxin-free water

NOTE : A test tube and the pipette should be dehydrogenated by 250°C and more than 30 min. Water should be Endotoxin-free water. The plastic products such as tips for micropipets should be confirmed that they are no endotoxin contamination and no interference for the measurement.

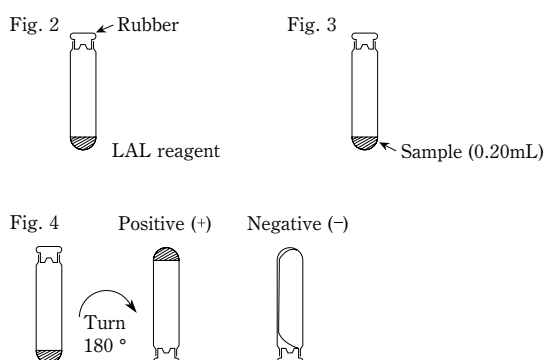
II. Procedure

1. Preparation of Control Standard Endotoxin (CSE) Solution
Remove the aluminum cap on the vial. The inside of the vial is a vacuum. Release the vacuum by pulling slowly up on the rubber stopper and remove the stopper from the vial. The EU value (EU/vial) is printed on the label. Determine the volume of water to be added into the vial to make a 1,000 EU/mL solution. Add the determined volume of endotoxin-free water into the vial. Put the rubber stopper on the vial. After turning the vial upside down several times, agitate the vial vigorously with a Vortex mixer for approximately 2 minutes. The Control Standard Endotoxin Solution can be stored at 2~10°C for 1 month. When the stored solution is used, agitate the solution vigorously with Vortex mixer for more than 1 minute before use.
2. Dilution of standard endotoxin solutions, the pH adjustment and dilution of samples
A dilute standard solution should be agitated with a Vortex mixer for more than 30 seconds before use in the next dilution procedure. One dilution should not be more than 10-fold.
When the pH of the LAL reagent solution reconstituted with 0.20 mL of sample solution is out of the range between 6.0 and 8.0, adjust the pH range of sample solution with a dilute sodium hydroxide solution or dilute hydrochloric acid.
3. Dispensing of samples
Take LAL reagent tubes out of the package and put the tubes in a tube rack. When powder of LAL is attached to the rubber stopper, knock on several times of bottoms of the vial. A little LAL attaches to a rubber stopper and does not influence the result of the examination. Each rubber stopper is loosened by releasing the vacuum and slowly pulling up the rubber stopper slightly. (Fig. 2)

Dispense 0.20 mL of a sample into each LAL reagent tube and put the rubber stopper on the tube. Mix gently to dissolve the LAL reagent without making bubbles. Incubate the reaction mixture at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 60 ± 2 min without vibration. (Fig. 3)

4. Judgment

After 60 minute incubation, slowly turn each tube upside down to determine if a gel is formed. A positive result is defined as the formation of a firm gel capable of maintaining its integrity. A negative result is defined as the absence of gel or the formation of a viscous mass, which does not hold. (Fig. 4)



III. Interfering Testing

The inhibition or enhancement of the LAL test should be determined for each sample formulation before the LAL test is used to assess the endotoxin content of any sample. When the pH of the LAL reagent solution reconstituted with 0.20 mL of sample solution is out of the range between 6.0 and 8.0, adjust pH range of sample with a dilute sodium hydroxide solution or dilute hydrochloric acid.

(Method)

1. Prepare a series of two-fold dilutions of endotoxin with endotoxin-free water to give concentrations of 0.0625 ~ 0.5 EU/mL. Add 50 μL of 50 EU/mL endotoxin solution to 4.95 mL of sample solution, which makes a final endotoxin concentration of 0.5 EU/mL. Prepare another series of two-fold dilutions of the 0.0625 EU/mL-spiked sample solution diluted with the sample solution to give final endotoxin concentrations of 0.0625~0.5 EU/mL.
2. Perform the test on the above 2 series of dilutions, an unspiked sample solution and a negative control (endotoxin-free water). Please follow "Inhibition and Enhancement Testing" of the station "bacterial endotoxins test" in the Japanese Pharmacopeia about the number of the repetition.
3. The unspiked sample solutions and the negative controls must be negative. The geometric mean endpoint concentration of the first series of dilutions (diluted with endotoxin-free water) must be greater than or equal to 0.125 EU/mL and less than or equal to 0.5 EU/mL.

If the negative controls are negative and the unspiked sample solutions are positive, remove endogenous endotoxin by ultrafiltration/appropriate way or dilute the sample solution. And then retest.

If all the conditions in the above 3. are met and the geometric mean endpoint concentration of the second series of dilutions (diluted with sample solution) is greater than or equal to 0.125 EU/mL and less than or equal to 0.5 EU/mL, it is confirmed that the sample concentration in the sample solution does not interfere with the LAL test.

IV. Preliminary Test for Dilution Factor

Prepare a series of dilutions (determine an appropriate dilution factor according to the degree of interference) of the sample solution with endotoxin-free water. Add endotoxin solution to each of the dilutions making the final endotoxin concentration 2λ (0.5 EU/mL). Perform the test on 2 series of dilutions (a series of unspiked sample solutions and a series of 2λ endotoxin-spiked sample solutions). If a dilution of the spiked sample solution is positive and the same dilution of the unspiked sample solution is negative, it is confirmed that no interference is observed the sample concentration of that dilution.

V. Routine Testing (Limit Test)

Perform the test on the following specimens at least in duplicate (n=2).

- Negative control (Endotoxin free water)
- A dilution of endotoxin (2λ) (Positive Control : PC)
- Sample solution
- Positive product control (2λ endotoxin-spiked sample solution) (PPC)

If all the following conditions are met, the endotoxin concentration of the sample solution is passed (The sample is less than 0.25 EU/mL).

- Negative control is negative.
- PC and PPC are positive
- Sample is negative

If the sample solution is positive, perform the test on a series of 2-fold dilutions of sample solution diluted with endotoxin-free water.

The endotoxin concentration in the sample solution is determined by :

$[\lambda \text{ (EU/mL)}] \times [\text{Maximum dilution factor in the series of dilutions of positive results}]$

[Precautions]

1. Be very careful not to cause endotoxin contamination. Use endotoxin free equipment and water.
2. Do not use the reagent with a large quantity of insoluble material or when it changes color.
3. For research used only. For in vitro use only. Not for use in diagnostic procedures. Not for internal use in human or animals.
4. Exercise caution when handling LAL, because its toxicity is not known.

[Procedure to Determine Potency of CSE (Reference)]

1. Prepare a series of dilutions of Japanese Pharmacopoeia Reference Standard Endotoxin (JP-RSE) and 4 vials of CSE according to Table 1 and 2. Perform the gel-clot technique test on the dilutions of 0.0625~0.5 EU/mL (JP-RSE) and 0.00625~0.05 ng/mL in tetra-plicate.

Calculate endpoint geometric mean of JP-RSE (refer to Table 3) and CSE (refer to Table4). Calculate Endotoxin Unit per CSE weight (EU/ng). CSE potency (EU/vial) is multiplied 500 (CSE contains 500 ng).

The potency which calculated with the lot of LAL reagent and CSE is printed on the label as a reference.

Note : If a LAL lot is changed, the CSE potency test must be repeated because EU/ng of the CSE may be changed.

Table 1. Endotoxin dilution series of JP-RSE

JP-RSE soln. (mL)	H ₂ O (mL)	final JP-RSE conc. (EU/mL)
0.5 (10000 EU/mL)	4.5	1000
0.5 (1000 EU/mL)	4.5	100
0.5 (100 EU/mL)	4.5	10
1.0 (10 EU/mL)	4.0	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. Endotoxin dilution series of CSE

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	0.1
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 Example of JP-RSE endpoint

Replication	NC	0.5	0.25	0.125	0.0625	endpoint(EU/mL)
1	—	+	+	+	—	0.125
2	—	+	+	—	—	0.25
3	—	+	+	—	—	0.25
4	—	+	+	—	—	0.25

Table 4 Example of CSE endpoint (Vial 1)

Replication	0.05	0.025	0.0125	0.00625	endpoint(ng/mL)
1	+	+	+	—	0.0125
2	+	+	—	—	0.025
3	+	+	—	—	0.025
4	+	+	—	—	0.025

CSE (Vial 2)

1	+	+	—	—	0.025
2	+	+	—	—	0.025
3	+	+	—	—	0.025
4	+	+	—	—	0.025

CSE (Vial 3)

1	+	+	—	—	0.025
2	+	+	—	—	0.025
3	+	+	—	—	0.025
4	+	—	—	—	0.05

CSE (Vial 4)

1	+	+	—	—	0.025
2	+	+	—	—	0.025
3	+	+	+	—	0.0125
4	+	+	—	—	0.025

Geometric Mean (GM) of JP-RSE

$$(\log(0.125) + 3\log(0.25))/4 = -0.677$$

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

GM of CSE

$$(2\log(0.0125) + 13\log(0.025) + \log(0.05))/16 = -1.621$$

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

$$\text{CSE (EU/ng)} = 0.210/0.0239 = 8.79 \text{ EU/ng} = 8.8 \text{ EU/ng}$$

$$\text{Therefore CSE potency is } 8.8 \text{ (EU/ng)} \times 500 \text{ (ng/vial)} = 4400 \text{ EU/vial}$$

[References]

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. *The United States Pharmacopoeia 22th, The National Formulary 17th*, Supplement 8, p.3349, U.S. Pharmacopoeial Convention Inc. (1990).
4. THE JAPANESE PHARMACOPOEIA TWELVE EDITION Handbook, B-57 (1991)
5. Westphal, O., Lüderitz, O., Eichenberger, E. and Keiderling, W. : *Z. Naturforsch.*, **7b**, 536 (1952).
6. Akama, K., Kuratsuka, K., Homma, R., Kanoh, S., Niwa, M., Iwanaga, S. and Nakahara, C. : *Bacterial Endotoxin*, Eds. Homma, J.Y. *et al.*, p.395, Verlag Chemie (1984).

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

LAL reagent Manufactured by :

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

Code 290-22041

エンドトキシン検出用

Limulus J Single Test *Wako*

リムルスJ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、米国薬局方に収載され、1988年には、日本薬局方にも収載されました^{3),4)}。

本キットは、LAL試薬と Control Standard Endotoxin（CSE）からなり、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エンドトキシン標準品（JP-RSE）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。CSEは、*E. coli* UKT-B 株からフェノール法^{5),6)}によって抽出、精製したりポ多糖（Lipopolysaccharide, LPS）500ng に添加剤としてマンニトールとグリシンを加え、凍結乾燥したもので、参考値として日本薬局方で定められたエンドトキシン標準品を用いて検定した力価を表示してあります。

〔特長〕

1. 高感度でエンドトキシンの検出ができます。
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. 測定に必要な数だけ LAL試薬を使用できますので、無駄がありません。
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 試薬のゲル化機構は、下図のように考えられています。すなわち、LAL 試薬中に含まれるセリンプロテアーゼが順次活性化され、最後に凝固性蛋白前駆体（コアギュローゲン）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（図 1）。

ゲル化転倒法では、LAL 試薬と検体を混合し、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。

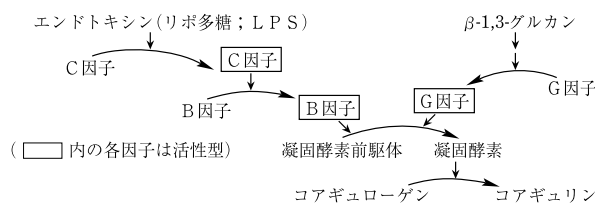


図 1. カプトガニ体液凝固のカスケード機構

【内 容】

1. LAL 試薬，米国产カプトガニ (*Limulus polyphemus*) の血球抽出物，凍結乾燥品…………… 25 バイアル (0.20 mL 用)
力価：日本薬局方で定められたエンドトキシン標準品で測定
0.25 EU/mL でゲル化します。
* 2～10℃ 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 として 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とグリシンを含みます。
* 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 ± 1℃)
 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

希釈したエンドトキシン及び試料溶液は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

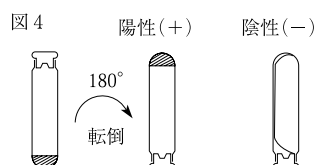
必要な本数の LAL 試薬をラックに並べゴム栓を緩めておきます (図 2)。

もし、LAL 試薬の粉末がゴム栓に付着している場合は、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 試薬の粉末をバイアルの底に落とします。少量の LAL 試薬がゴム栓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。

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形しない場合を陽性、それ以外の場合を陰性と判定します (図 4)。



III. 反応干渉因子の確認

試料溶液はあらかじめリムル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溶液の 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 4.95 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/mL 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。測定の繰り返し数については日本薬局方「エンドトキシン試験法」の「反応干渉因子試験」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、その濃度では試料はリムルテストに影響を与えないといえます。

試料がリムル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（限度試験法）

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溶液（2λ）（陽性コントロール）
- 試料溶液
- 試料溶液に終濃度が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）エンドトキシン標準品を添加したもの（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、陽性コントロールが陽性判定されること、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。

〔ご使用上の注意〕

1. 本品はエンドトキシンに対して極めて鋭敏に反応しますのでピペットその他の器具、溶解水などによるエンドトキシン汚染には十分ご注意下さい。
2. 変色したり、溶解した時に多量の不溶物が生じたものは変質しておりますので使用しないで下さい。
3. 本品はリムルステスト以外の目的には使用しないで下さい。
4. 本品の毒性については確認されておりませんので吸いこんだりしないよう取扱には十分ご注意下さい。

〔付録 CSE の EU 表示値の決定方法（参考）〕

1. Table 1, 2 に示すように日本薬局方で定められたエンドトキシン標準品（JP-RSE）及び4バイアルのCSEの2倍希釈系列を作成します。

JP-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転倒法により測定します。

JP-RSE のエンドポイントの幾何平均を求め、（Table 3 実施例参照）同様にして求めた 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 には製品で組み合わせたロットの 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 JP-RSE の希釈系列

JP-RSE 溶液 (mL)	H ₂ O (mL)	JP-RSE 終濃度 (EU/mL)
0.5 (10000 EU/mL)	4.5	1000
0.5 (1000 EU/mL)	4.5	100
0.5 (100 EU/mL)	4.5	10
1.0 (10 EU/mL)	4.0	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 溶液 (mL)	H ₂ O (mL)	CSE 終濃度 (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	0.1
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 JP-RSE のエンドポイント実測結果例

	回数	NC	0.5	0.25	0.125	0.0625	endpoint(EU/mL)
JP-RSE	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

	回数	0.05	0.025	0.0125	0.00625	endpoint(ng/mL)
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

JP-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 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 の重量当たりの EU 表示値は、

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

CSE バイアルあたりの力価は、

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

〔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. *The United States Pharmacopoeia 22th, The National Formulary 17th, Supplement 8*, p.3349, U.S. Pharmacopoeial Convention Inc (1990).
4. 第十二改定日本薬局方解説書, B-57 (1991).
5. Westphal, O., Lüderitz, O., Eichenberger, E. and Keiderling, W. : *Z. Naturforsch.*, **7b**, 536 (1952).
6. 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).

(製造・発売元)

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 : +843-766-7575

1802KA1

