

エンドトキシン検出用
Limulus J Test Wako

リムルス J テストワコー 50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（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。

本キットは、LAL試薬と 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試薬は、日本薬局方で定められた標準エンドトキシン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³⁾⁴⁾によって抽出、精製したリポ多糖（Lipopolysaccharide, LPS）500ng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、参考値として日本薬局方で定められた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. 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、さらに感度よく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。

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。

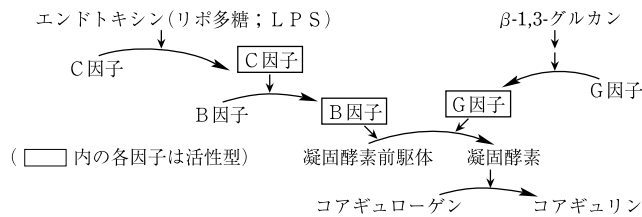


図1. カプトガニ体液凝固のカスケード機構

〔内 容〕

1. 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 0.25 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 500ng)
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〕

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 用)
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. 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. LAL試薬の溶解

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分程では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 $-20\sim-30^{\circ}\text{C}$ 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. 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の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、再びゴム栓をして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 $2\sim 10^{\circ}\text{C}$ 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する時には1分間以上ボルテックスミキサーで攪拌してください。

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。

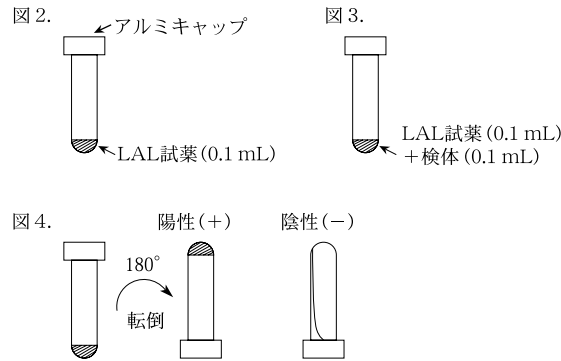
4. LAL試薬の分注および反応

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)



III. 阻害促進の確認

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。試料溶液とLAL試薬を等量混合したものの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5.0mL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局「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、再度同様の実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する。）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。

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。

〔付録 本品に添付のCSEのEU表示値の決定方法〕

1. 日本薬局方で定められた標準エンドトキシン (JPSE) の2倍希釈系列を Table 1 の様に作成して、0.0625~2.0 EU/mL の範囲で各濃度につき2回の繰り返しでトキシノメーターによりTgを測定します。測定は各濃度につき2回の繰り返しで行います。

次に $\log(\text{JPSE conc. (EU/mL)})$ と $\log(\text{Tg (min.)})$ の直線回帰式

$\log(\text{Tg (min)}) = A \log(\text{JPSE}_{\text{conc.}}(\text{EU/mL})) + B$ (A, B ; 定数) を最小自乗法によって求め、検量線とします。この時、相関係数 r の値が -0.980 以下であることを確認します。また使用した JPSE の最大濃度と最小濃度におけるそれぞれの Tg の平均値の間がこの検量線の有効範囲となります。

2. CSE の希釈及び測定

4 バイアルの CSE について Table 2 に示した様に希釈系列を作成します。測定は各濃度 2 回の繰り返しで行い、Tg の平均値 Tg [mean] を求めます。この時、希釈した CSE 溶液のうち 3 濃度以上が JPSE 検量線の Tg の有効範囲にはいなければならないと

3. CSE の EU 表示値の計算方法

CSE の各々のエンドトキシン濃度 (ng/mL) における Tg [mean] の 4 バイアルでの平均値を求めます。1. で求めた JPSE の検量線を基にこれをエンドトキシン濃度、EU/mL に換算します。次いで、CSE の重量当りのエンドトキシン単位を求め (EU/ng) バイアルの EU 表示値を計算します。(計算方法については Table 3~5 の実施例を参照してください。)

* 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 JPSE の希釈系列

JPSE soln.(mL)	H ₂ O (mL)	final JPSE 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 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

CSE の EU 表示値の計算実施例

Table 3 JPSE の濃度 (EU/mL) と Tg (min.)

JPSE (EU/mL)	Tg (min.)	
0.0625	50.8	49.2
0.125	42.8	42.2
0.25	35.0	34.8
0.5	30.0	29.8
1.0	24.8	24.4
2.0	21.0	21.4

$$\log(\text{Tg (min.)}) = -0.251 \log(\text{JPSE conc. (EU/mL)}) + 1.397$$

$$r = -0.9989$$

Table 4 CSE の濃度 (ng/mL) と Tg [mean] (min.)

CSE (ng/mL)	Tg [mean] (min)			
	vial 1	vial 2	vial 3	vial 4
0.00625	49.5	50.1	57.8	51.3
0.0125	40.2	42.2	43.1	42.0
0.025	34.8	35.4	36.3	36.7
0.05	29.9	31.2	31.2	30.0
0.1	24.6	24.2	24.8	24.5

Table 5 CSE の EU 換算係数

CSE (ng/mL)	4 バイアルの平均 Tg (min)	EU換算値 (EU/mL)	EU換算係数 (EU/ng)
0.00625	52.1	0.0532	8.51
0.0125	41.9	0.1268	10.14
0.025	35.8	0.2375	9.50
0.05	30.6	0.4439	8.88
0.1	24.5	1.0772	10.77

平均 EU 換算係数 9.56 (EU/ng)

$500 \text{ (ng/vial)} \times 9.56 \text{ (EU/ng)} = 4780 \text{ (EU/vial)}$
 従ってこの例では CSE の力価は 4800 (EU/vial) となります。

〔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. and 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. Pharmacopeial Convention Inc (1990).
7. Oishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39** (5), 194 (1985).

製造発売元

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

1805KA1