

FUJIFILM

Wako

Code 291-53601

エンドトキシン検出用

Limulus Color KY Single Test *Wako*

リムルスカラー KY シングルテストワーク

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引き起こすため、これらの医薬品のエンドトキシンによる汚染は厳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引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います。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、日本薬局方にも収載されました³⁾。現在では、リムルステストの手法には、ゲル化法、比濁法および比色法(発色合成基質法)があり、エンドトキシン試験はこれらのいずれかで行うように規定されています⁴⁾。

Kakinuma らは、LAL が(1→3)-β-D-グルカンにも反応することを報告し⁵⁾、さらに Iwanaga らは、LAL 中にはエンドトキシン以外に(1→3)-β-D-グルカンで活性化が起こる系があることを明らかにしました^{6,7)}。また、セルロース系の膜から LAL に反応する物質が溶出することも報告され⁸⁾、LAL のエンドトキシンに対する特異性が問題となっています。

本キットは、リムルスカラー試薬と Control Standard Endotoxin (CSE) からなり、高感度かつ特異的にエンドトキシンの検出を行うことができます。

リムルスカラー試薬は発色合成基質および緩衝液成分を含む LAL の凍結乾燥品で、試料 0.2 mL を加えるだけで測定が可能な試験管タイプになっており、トキシノメーターを用いた比色時間分析法(カインティック法)に適しています。

CSEは、*E. coli* UKT-B 株からフェノール法^{9,10)}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とグリシンを加えて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が表示されています。

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いませんので注意して下さい。

【特 長】

1. リムルス試薬と発色合成基質が一体製剤されており、試料を加えるだけでエンドトキシンを測定することができます。
2. 1バイアル1検体のシングルタイプであり、検体数に応じて試薬を無駄なく使用できます。
3. (1→3)-β-D-グルカンとの反応性が抑えられており、エンドトキシンを特異的に検出できます。
4. 検量範囲が広く、ほとんどの場合、試料を希釈する必要がありません。
5. 高感度のため、試料中の反応阻害・促進物質の影響を希釈により低減できます。
6. トキシノメーター(青色光源タイプ)を用いることにより、比色時間分析法による定量が可能です¹¹⁾。

【原 理】

エンドトキシンによる本試薬の発色機構は図1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前駆体が順次活性化され、最後に黄色発色合成基質が水解されて発色基(pNA)が遊離し、黄色の発色が生じるという原理に基づいています。

一方、(1→3)-β-D-グルカンもLALの活性化を引き起こしますが、濃度依存性があり、高濃度では逆にLALの活性化を阻害し、かつ、エンドトキシンによるLALの活性化には影響を与えません。本試薬は、反応系に(1→3)-β-D-グルカン誘導体を高濃度に共存させているため、エンドトキシンを特異的に検出することができます¹²⁾。

トキシノメーター(青色光源タイプ)を用いた比色時間分析法(カインティック法)では、活性化に伴って生じた色素による吸光度の増加を透過光量比の減少として測定し、あらかじめ設定したしきい値に達するまでの反応時間を活性化時間(Ta)として、Taとエンドトキシン濃度との相関からエンドトキシン濃度を算出します。

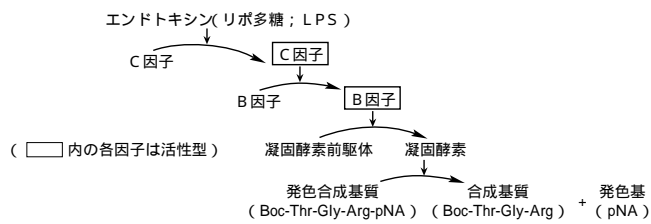


図1. リムルスカラー試薬の発色カスケード機構

〔内 容〕

1. リムルスカラー試薬 0.2 mL 用×25バイアル
米国産カプトガニ (*Limulus polyphemus*) 血球抽出物 (LAL) の凍結乾燥品 (発色合成基質, トリス塩酸緩衝液および (1→3)- β -D-グルカン誘導体を含む)

* 2~10℃ 保存 *
2. Control Standard Endotoxin 500 ng (精製 LPS として) × 1 バイアル
E. coli UKT-B 株の菌体から精製した LPS の凍結乾燥品 (添加剤としてマンニトールおよびグリシンを含む)

* 2~10℃ 保存 *

〔使用方法〕

1. 使用器具および用意するもの
 - (1) ガラスピペット
 - (2) 希釈用試験管 (アルミキャップ付)
 - (3) ボルテックスミキサー
 - (4) トキシノメーター^{13),14),15),16)} (青色光源タイプ)
 - (5) エンドトキシン試験用水

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.
2. 試薬の調製
 - (1) Control Standard Endotoxin (CSE) の溶解
CSE を開栓します. 内容物を飛散させないよう静かに開けて下さい. CSE の表示含量を参照して, 終濃度が 1,000 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混和した後, ボルテックスミキサーで約 2 分, 激しく攪拌して下さい. 溶解後は 2~10℃ で保存して 1 か月以内に使用して下さい. 保存したものを使用する時は, 1 分以上ボルテックスミキサーで攪拌して下さい.
 - (2) エンドトキシンの希釈および試料の pH 調整・希釈
エンドトキシンおよび試料溶液の希釈は氷冷下で行い, 希釈後, 氷冷してできるだけ速やかに使用して下さい. 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 倍を越える希釈はしないで下さい.
試料溶液の pH が酸性または pH 8.0 以上のアルカリ性領域にある時は, 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 7.0~8.0 の範囲内になるよう調整して下さい. もし, 0.20 mL の試料溶液でリムルスカラー試薬を溶解した液の pH がその範囲内になれば pH 調整は必要ありません.

3. 測定手順

- (1) 必要な本数のリムスカラー試薬を取り出し、ラックに並べゴム栓を緩めておきます。
- (2) これにエンドトキシンの希釈系列、エンドトキシン試験用水および試料を 0.20 mL ずつ加え、再びゴム栓をして静かに混和し、リムスカラー試薬を完全に溶解します。
- (3) トキシノメーター(青色光源タイプ)を用いて以下の条件で測定します*。

温度：37℃ しきい値：94.9%

Wait time：5分(通常)

- (4) x 軸にエンドトキシン濃度の対数を、 y 軸に活性化時間の2回対数をとり検量線を作成します。得られた検量線を用いて、試料の活性化時間からエンドトキシン濃度を算出します。

*詳しくは「トキシノメーターの標準操作法」をご請求下さい。

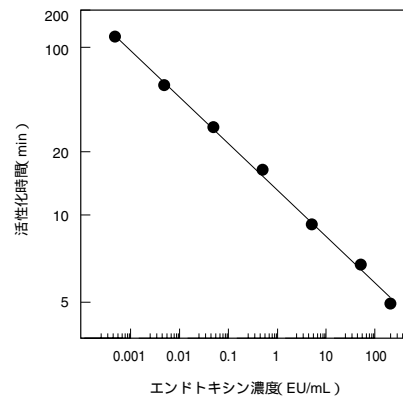


図2. 本品とトキシノメーター(青色光源タイプ)を用いたエンドトキシンの分析例

広い濃度範囲で高い相関の検量線が得られています。

〔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、その他の器具および溶解水などによるエンドトキシン汚染には十分注意して下さい。
2. 変色したり、溶解した時に多量の不溶物が生じたりし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、吸い込んだりしないよう取扱いには十分注意して下さい。
5. リムスカラー試薬に含まれる(1→3)- β -D-グルカン誘導体は、低濃度ではリムス HS-J テストワコーなど通常のリムス試薬を強くゲル化しますので、これらの試薬への混入には十分注意して下さい。
6. バイアル瓶の開栓は、アルミキャップ部分で怪我をしないよう慎重に行ってください。

〔参考文献〕

1. Bang, F. B. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **98**, 325 (1956).
2. Levin, J. and Bang, F. B. : *Ibid.*, **115**, 265 (1964).
3. *The United States Pharmacopeia 22th, the National Formulary 17th, Supplement 8*, p.3349, U.S.Pharmacopeial Convention Inc. (1990).
4. 第十三改正日本薬局方, 26 (1996).
5. Kakinuma, J., Asano, T., Torii, H. and Sugino, Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434 (1981).
6. 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**, 781 (1983).
7. Iwanaga, S., Morita, T., Miyata, T., Nakamura, T., Hiranaga, M. and Ohtsubo, S. : *Bacterial Endotoxin*, eds. Homma, J. Y., Kanegasaki, S., Luderitz, O., Shiba, T. and Westphal, O., p.365, Verlag Chemie (1984).
8. Peason, F. C., Weary, M. and Bohon, J. : *Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test*, eds. Watson, S. W., Levin, J. and Novitsky, T. J., p.247, Alan R. Liss, Inc. (1982).
9. Westphal, O., Luderiz, O., Eichenberger, E. and Keiderling, W. : *Z. Naturforsch.*, **7b**, 536 (1952).
10. 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).
11. 高須賀禎浩, 井尻晴久, 土谷正和, 山本直之, 田中 巧, 松浦脩治 : 日本防菌防黴学会第23回年次大会, 131 (1996).
12. 土谷正和, 高岡 文, 時岡伸之, 松浦脩治 : 日本細菌学雑誌, **45**, 903 (1990).
13. 大石晴樹, 畑山泰道, 白石浩己, 柳沢和也, 佐方由嗣 : 薬学雑誌, **105**, 300 (1985).
14. Ohishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39**, 194 (1985).
15. Ohishi, H., Fusamoto, M., Hatayama, Y., Tsuchiya, M., Takao-ka, A. and Sakata, Y. : *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3012 (1988).
16. 大石晴樹, 和田正悟, 白石浩己, 小新堂 透, 辻野隆三 : 日本薬学会第116年会, 100, (1996).

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

1805KA1