

FUJIFILM

Wako

Code 291-53101

エンドトキシン検出用

Limulus Color KY Test *Wako*

リムルスカラー KY テストワコー

60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、既に米国薬局方に記載され、1988年、日本薬局方にも記載されました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 KY 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 KY 試薬は、発色合成基質および緩衝液成分を含む LAL 試薬の凍結乾燥品で、エンドトキシン試験用水で溶解して使用します。また、本試薬は、トキシノメーターならびにマイクロプレートリーダーを用いた比色時間分析法(カイネティック法)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および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、試薬溶解後、試料と混合するだけで反応を開始させることができます。
2. 溶解後の試薬の安定性にすぐれ、ブランクの反応性が低く抑えられています。
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。また、マイクロプレートリーダーによる測定も同様に可能です。

〔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が順次活性化され、最後に凝固酵素が黄色発色合成基質を水解し、発色基(pNA)が遊離して、黄色の発色が生じるというものです。

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¹⁾。

トキシノメーター(青色光源タイプ)ならびにマイクロプレートリーダーを用いた比色時間分析法(カイネティック法)では、活性化に伴って生じた色素による吸光度の増大、あるいは透過光量比の減少を測定し、これらが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。

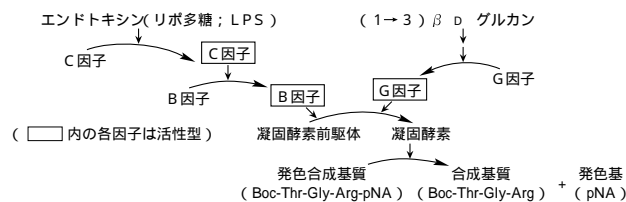


図1. リムルスカラー KY 試薬の発色カスケード機構

〔内 容〕

1. リムルスカラー KY 試薬 2 mL用(20回用*)×3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)

*トキシノメーターで約20回, マイクロプレートリーダーで約40回測定できます。

* 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〕

A. トキシノメーター^{(12),(13),(14),(15)}で測定する場合

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) リムルステストチューブ-S (Code 293-26551)
- (4) アルミキャップ-S (Code 293-28251)
- (5) トキシノメーター(青色光源タイプ)
- (6) 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) リムルスカラー KY 試薬の溶解

リムルスカラー KY 試薬のバイアルの底を台上で数回軽く叩き、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。少量の試薬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。

アルミキャップを外し、バイアルの口の内側に触れないよう注意し、ゴム栓を持ち上げて開栓します。ゴム栓のアルミキャップに接触していた部分(この部分はもと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下さい。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下さい。例えば、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利用してゴム栓を持ち上げるように外して下さい。外したゴム栓は汚染しないよう足を上に向けて置いて下さい。

エンドトキシン試験用水 2 mL 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、ゴム栓に内容液が付かないよう注意し、ゆっくりと振り混ぜて完全に溶解します。溶解したリムルスカラー KY 試薬は氷冷下に置き、泡立ったり、激しく攪拌したりせず、6時間以内に使用して下さい。もし保存する場合は、-80℃以下で凍結し、2週間以内に使用して下さい。凍結融解は、繰り返すと感度が変化することがありますので、1回にとどめて下さい。

(2) Control Standard Endotoxin (CSE)の溶解

CSE のゴム栓をゆっくりと外します。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。

(3) 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、試料溶液とリムスカラー KY 試薬を等
量混合したものの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) リムステストチューブ-Sを試験管の口にふれないよう
に取り出し、ラックに立てて速やかにアルミキャップ-S
をかぶせます。

(2) リムスカラー KY 試薬を、再度ゆるやかに攪拌して均
一であることを確認後、リムステストチューブ-Sに
0.10 mL ずつ分注します。

(3) 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0.10 mL ずつ加えます。

(4) 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)

(5) 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。

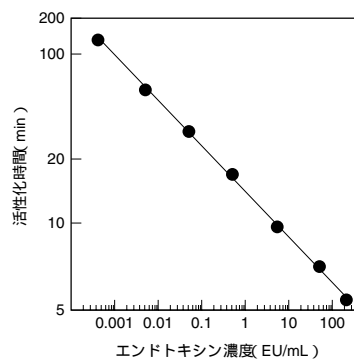


図2. 本品とトキシノメーター(青色光源タイプ)を用いた
エンドトキシンの分析例

広い濃度範囲で高い相関の検量線が得られています。

B. マイクロプレートリーダーで測定する場合

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) 96穴マイクロプレート
- (4) マイクロプレートリーダー(恒温機能付)
- (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、96穴マイクロプレートなどのプラスチック製品はエンドトキシン汚染及び測定に対する干渉がないことを確認したものをを用いて下さい。使用可能なマイクロプレートについては別途お問い合わせ下さい。

2. 試薬の調製

A. トキシノメーターで測定する場合の2. 試薬の調製と同様に操作を行って下さい。

*ただし CSE の含量はマイクロプレートリーダーで測定し、決定した値を別途ご請求の上、ご使用下さい。

3. 測定手順

- (1) 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それぞれ0.05 mL ずつマイクロプレートの各ウェルに入れます。
- (2) これにリムスカラー KY 試薬を、再度ゆるやかに攪拌して均一であることを確認後、0.05 mL ずつ加えます。
- (3) マイクロプレートリーダーを用いて以下の条件で測定します*。
温度：37℃ 測定モード：カイネティック
Onset OD：0.015 Auto mix：Once
波長：405 nm(主波長)－650 nm(副波長)
- (4) x 軸にエンドトキシン濃度の対数を、y 軸に活性化時間の対数を取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。

〔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 KY 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、これらの試薬の混入には十分注意して下さい。

〔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. 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).
12. 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).
13. Ohishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39**, 194 (1985).
14. Ohishi, H., Fusamoto, M., Hatayama, Y., Tsuchiya, M., Takao-ka, A. and Sakata, Y. : *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3012 (1988).
15. 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

1805KA2