

リムルス PS シングルテストによるエンドトキシン測定法

2015年3月

和光純薬工業株式会社 機器システム部

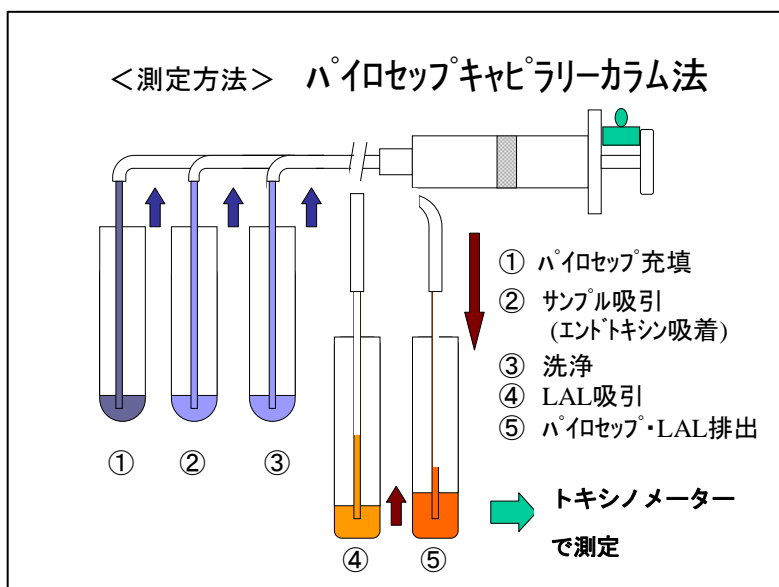
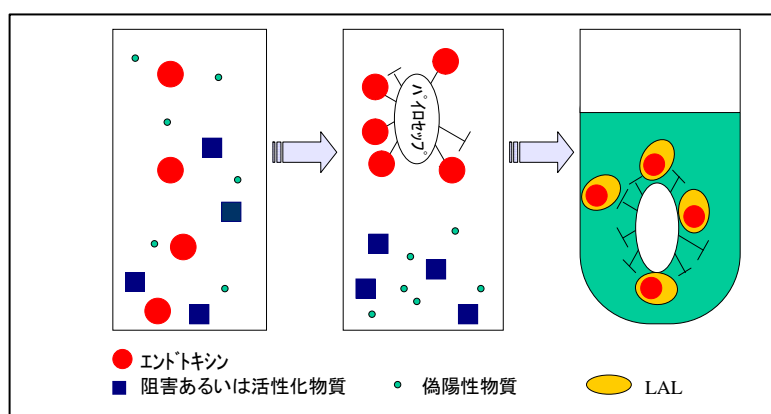
<特長>

リムルス PS シングルテストは反応干渉因子を除去する必要がある場合や、水に不溶で有機溶媒にしか溶解しない試料の測定に適用可能です。パイロセップにより試料中のエンドトキシンを特異的に吸着させ、濃縮しますので 共存物質の影響を受けずに微量のエンドトキシンが測定可能です。

<測定原理>

パイロセップ (*1) を充填したキャピラリーカラムに、試料中のエンドトキシンを吸着させます。試料を洗い流した後、吸着したエンドトキシンをライセート試薬と反応させて、試料中のエンドトキシンの定量を行います。(測定はトキシノメーターに限る)

*1: 水不溶性担体にスパーサーを介してヒスチジンを結合させたアフィニティー吸着体で、エンドトキシンを特異的に吸着する。



<PS シングルテストワーク>

商品コード：299-54501

LAL ES シングル試薬：カプトガニ血球抽出物の凍結乾燥品	20 バイアル (0.3mL用)
パイロセップ懸濁液	20 バイアル (0.77mL)
LAL 溶解液	2 バイアル (7mL)
洗浄液	4 バイアル (11mL)
検体希釈用緩衝液	4 バイアル (10mL)
キャピラリー (シリコンチューブ付き)	20 本

※本品には、注射器、3方コック、専用アダプターは入っておりません。

別途、PS アクセサリーキット (294-33311) をお求めください。

<PS アクセサリーキット>

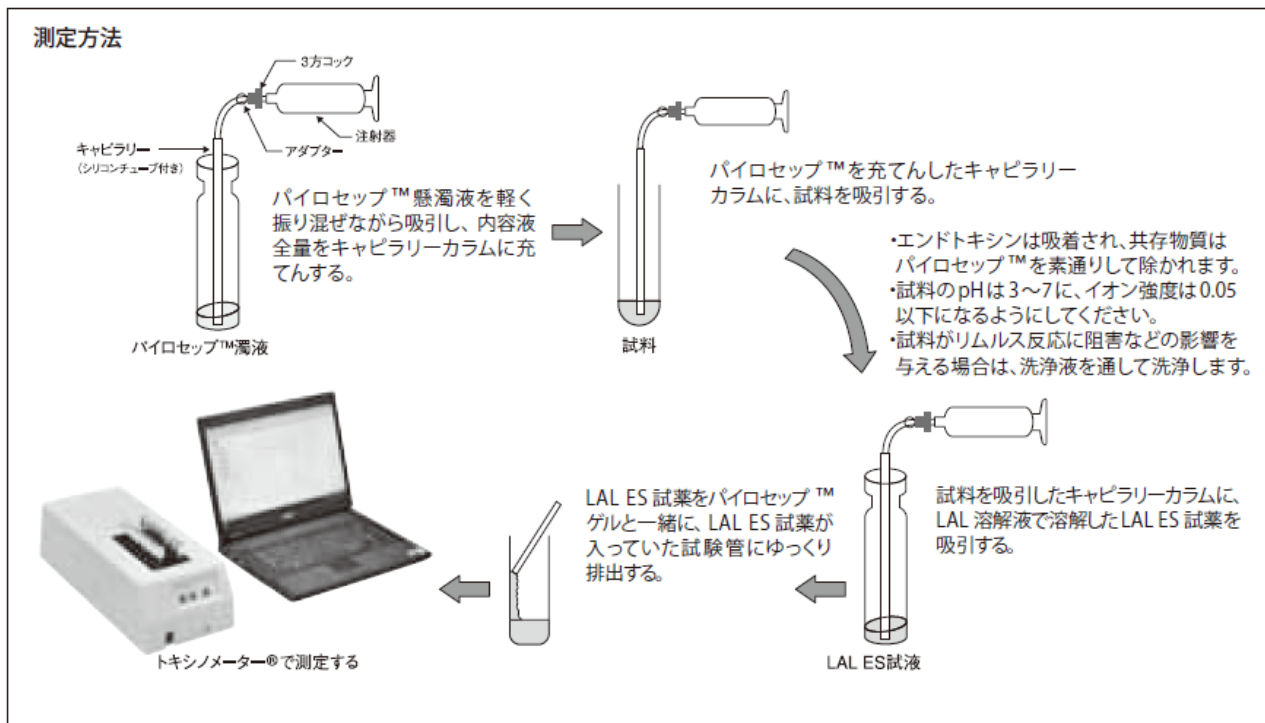
商品コード：294-33311

20mL 注射器 (針なし)	12 本
三方コック R 型	12 個
専用アダプター	20 個
目玉クリップ	12 個
FALCON 2058 ポリスチレンチューブ (5mL)	25 本
FALCON 2057 ポリスチレンチューブ (14mL)	25 本
試験管立て (50 穴)	1 個
手順書	1 部

■その他、必要なもの

- ・希釈用試験管 (エンドトキシンフリーのもの)
- ・エンドトキシン試験用水
- ・エンドトキシン標準品 (JP-RSE)
- ・タッチミキサー

<操作法手順>



I. 試料の調製

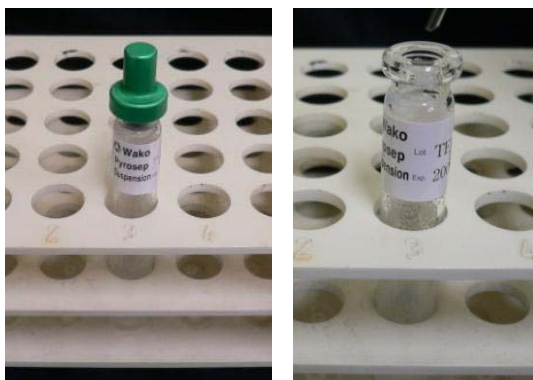
検量線用希釈系列及び検体は5mLで調製する。

【注意】 pH調整をする場合は**【検体希釈用緩衝液】**を1/10量加え、pHを3~7に調整する。(至適pH5)なるべく液量を増やさないこと。

II. 操作手順

<パイロセップ充填>

① **【パイロセップ懸濁液】**のバイアルを1, 2回**転倒攪拌**し(ゴム栓にゲルが付着しているため)、アルミキャップ(とゴム栓)をはずす。



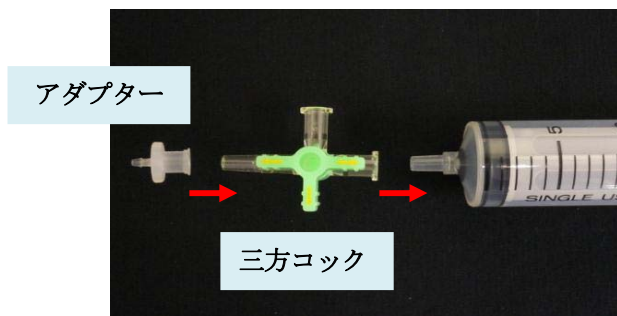
懸濁前



懸濁後



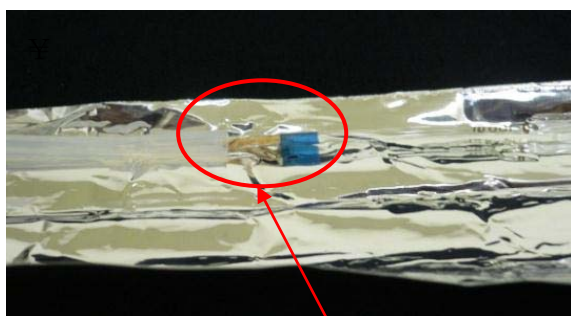
② 注射器（シリンジ）に三方コック、アダプターを接続する。



アルミホイルからキャピラリーを取り出し、

- 「キャピラリーの先端」を【パイロセップ懸濁液】（バイアル）に入れる。
- 「キャピラリーのシリコンチューブの先端」をアダプターに接続する。

【注意】 キャピラリーを取り出す際は、先端に触れないように中央付近を持つ。



中央付近

③ シリンジのピストン部分に目玉クリップを挟みこみ、内容量全体を吸引する。

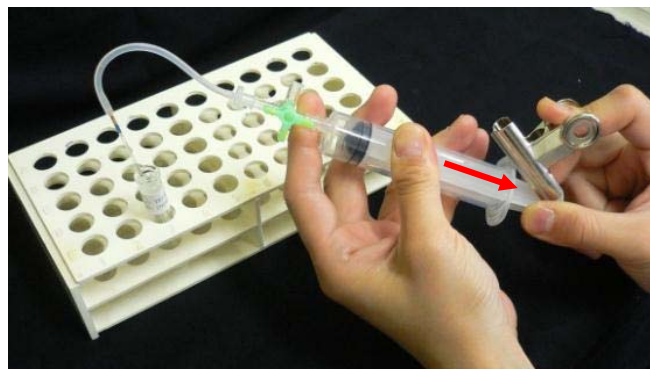
【注意】 パイロセップ懸濁液は沈殿しやすいので、時々振り混ぜながら吸引する。

※吸引の方法：三方コックの向きが図1のように「シリンジ」と「キャピラリー」になるようにして、ピストンを引きながら、目玉クリップを挟みこむ。

図1

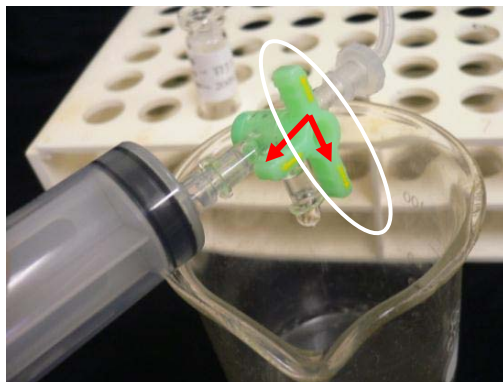


図2



- ④ 吸引が終了したら、図3のように**三方コックを切り替えて**、ピストンを押しながら、シリンジ内の液を廃棄する。

図3



<洗浄1>

検体がエタノール溶液の場合は、ゲルが目詰まりを起こす可能性がある為、検体を吸引する前にエンドトキシン試験用水でゲルを洗浄する。(1~2mL程度)

※エンドトキシン試験用水にキャピラリーを入れ、図1~2のように**三方コックを切り替えて**、目玉クリップを挟みこんで吸引する。(図2) 吸引が終了したらシリンジ内の廃液を廃棄する。(図3)

【注意】 キャピラリーのガラス部分が汚染されないように注意する。

<検体吸引>

※検体を入れた試験管にキャピラリーを入れ、図1のように**三方コックを切り替えて**、目玉クリップを挟みこんで吸引する。(図2) 吸引が終了したらシリンジ内の廃液を廃棄する。(図3)

【注意】 キャピラリーのガラス部分が汚染されないように注意する。

<洗浄2> (検体吸引後の洗浄はゲル間隙の検体を洗う目的で行う)

リムルス反応に対して阻害、促進などの干渉作用の強い検体の場合は、エンドトキシン試験用水または**【洗浄液】**を適当量(通常2mL)吸引することによりゲルの洗浄を行う。(洗浄1と同様)

※**検体がエタノール溶液の場合はエタノールでゲルを洗浄する。**

(エタノールで洗浄することにより検体の析出を防ぐ)

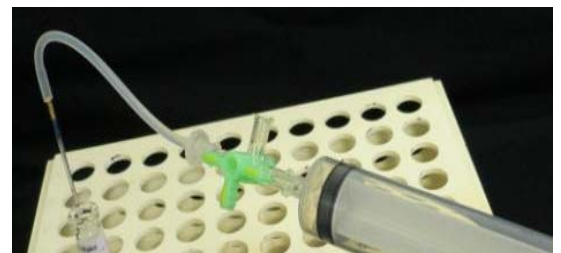
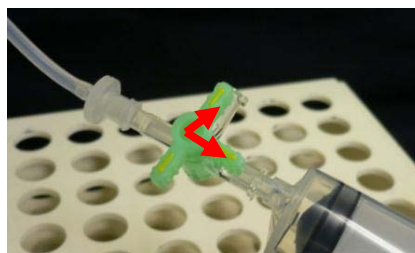
※キットの**【洗浄液】**は薄い食塩水。水に比べてイオン強度が強いため、エンドトキシンが外れにくい
特長がある。

<LAL 吸引>

ライセート試薬を【LAL 溶解液】0.3mLで溶解する。

※LAL の溶解は使用直前に行う。すぐに使用できない場合は冷蔵保存して、少なくとも 30 分以内に使用する。

検体を吸引し終わったキャピラリーを LAL 試液中に入れ、ゆっくり手で吸引し、液面が上昇（シリコンチューブの中間まで吸引）したら、直ちに三方コックを切り替えて、外部から空気を導入し、三方コックを戻し、ピストンを押しながら LAL 試液とゲルを共にゆっくり吐き出す。



※三方コックを切り替えても、LAL 試液の液面が上昇し続けるので、LAL 試液が未滅菌のアダプターへ到達しないうちに、すぐに吐き出し操作を行う。

※LAL 試液とゲルを共に吐き出す際、ゆっくりと吐き出す。

強く吐き出すとキャピラリーカラムに詰めてあるガラスフィルターのプラグがはずれる可能性がある。吐き出し終盤は、キャピラリーの先端を液面より上にして、気泡を液中に入れないようにする。

⑦キャピラリーのゲルを吐き出した後、気泡が試験管内に入っていないか確認し、大きい気泡（概ね 2mm 以上）があれば指ではじいて壊す。

⑧試験管内の内容物をミキサーで 5 秒攪拌してトキシノメーターにセットし、測定を開始する。
（しきい値：94.9%、ウェイトタイム：5 分に設定）

⑨検体と同様に測定した標準エンドトキシン溶液の検量線を用いてエンドトキシン濃度を算出する。

<エンドトキシン濃度の算出方法>

検量線作製に関してもすべて PS シングルテストワコーを使用します。

Toximaster で算出される濃度は、キャピラリーに吸引したエンドトキシン標準液のエンドトキシン濃度で表されますので、試料サンプルと検量線作成用のエンドトキシン標準液の吸引液量が異なる時は、補正計算をする必要があります。エンドトキシン濃度の算出方法（補正計算）の例を下記に示します。

●例 1.

検量線作製において標準サンプル（5， 0.5， 0.05， 0.005EU/mL）を **1mL** 吸引して検量線を作製し、試料サンプルを **100mL** 吸引した場合の算出方法。

■検量線は実質、5， 0.5， 0.05， 0.005EU/キャピラリーで作成されたことになるので、検量線は 5， 0.5， 0.05， 0.005EU/mL の 4 濃度になる。

サンプルのゲル化時間を検量線と参照して、エンドトキシン濃度が 1EU/mL と算出された場合、サンプル全量中のエンドトキシン量は 1EU となるので、サンプル 1mL 中のエンドトキシン濃度は $1 \div 100 = 0.01 \text{EU/mL}$ となる。

●例 2.

検量線作製において標準サンプル（1， 0.1， 0.01， 0.001EU/mL）を **5mL** 吸引して検量線を作製し、試料サンプルを **100mL** 吸引した場合の算出方法。

■検量線は実質、5， 0.5， 0.05， 0.005EU/キャピラリーで作成されたことになるので、検量線は 5， 0.5， 0.05， 0.005EU/mL の 4 濃度になる。

サンプルのゲル化時間を検量線と参照して、エンドトキシン濃度が 5EU/mL と算出された場合、サンプル全量中のエンドトキシン量は 5EU となるので、サンプル 1mL 中のエンドトキシン濃度は $5 \div 100 = 0.05 \text{EU/mL}$ となる。