

FUJIFILM

Wako

Code 299-53401

エンドトキシン検出用

Limulus HS-T Single Test *Wako*

リムルス HS-T 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⁾。

本キットは、LAL HS-T 試薬と Control Standard Endotoxin (CSE) からなり、高感度かつ迅速にエンドトキシンの検出を行うことができます。

LAL HS-T 試薬は凍結乾燥品で、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濁時間分析法に適しています。また、本試薬には、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ゲル化感度が力価として表示されています。

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. 比濁時間分析法に対応しています。
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. 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、最後に凝固性タンパク質前駆体(コアギュロゲン)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原理に基づいています。

トキシノメーターを用いた比濁時間分析法では、ゲル化にともなう生じた濁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ゲル化時間(Tg)として、Tg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。

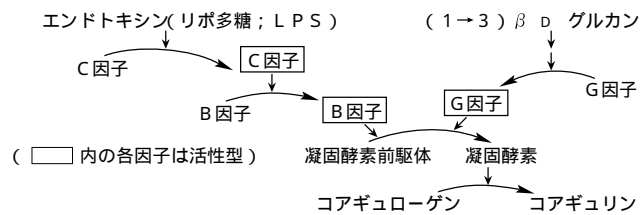


図1. カプトガニ体液凝固のカスケード機構

〔内 容〕

1. LAL HS-T 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
力価：日本薬局方で定められたエンドトキシン標準品で検定(ラベルに記載)
* 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とグリシンを含む)
* 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
- (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。バイアル瓶の中は減圧になっていますので、内容物を飛散させないように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LAL HS-T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LAL HS-T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、LAL HS-T試薬を完全に溶解します。
- (3) トキシノメーター^{7,8),9),10)}を用いて測定します*。
- (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1回または2回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。

*詳しくは「エンドトキシン試験法～標準操作法～」をご参照下さい。

〔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、ビベット、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. 本品はリムル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. 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。

〔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エンドトキシン標準品(JP-RSE)の2倍希釈系列を Table 1 の様に作成して、0.0039~0.0625 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。

次に $\log(\text{JP-RSE conc. (EU/mL)})$ と $\log(\text{Tg (min)})$ の直線回帰式 $\log(\text{Tg (min)}) = A \log(\text{JP-RSE conc. (EU/mL)}) + B$ (A, B; 定数) を最小自乗法によって求め、検量線とします。この時検量線の相関係数 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 JP-RSE 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

2 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 JP-RSE 検量線の Tg の有効範囲にはいなければならない。

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2バイアルでの平均値を求めます。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 HS-T 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 には製品で組合わせたロットの LAL HS-T 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 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
0.5 (10 EU/mL)	4.5	1.0
1.0 (1.0 EU/mL)	3.0	0.25
1.0 (0.25 EU/mL)	3.0	0.0625
2.0 (0.0625 EU/mL)	2.0	0.0313
2.0 (0.0313 EU/mL)	2.0	0.0156
2.0 (0.0156 EU/mL)	2.0	0.0078
2.0 (0.0078 EU/mL)	2.0	0.0039

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	0.1
1.0 (0.1 ng/mL)	3.0	0.025
2.0 (0.025 ng/mL)	2.0	0.0125
2.0 (0.0125 ng/mL)	2.0	0.00625
2.0 (0.00625 ng/mL)	2.0	0.00313
2.0 (0.00313 ng/mL)	2.0	0.00156

< CSE の EU 表示の計算実施例 >

Table 3 JP-RSE の濃度 (EU/mL) と Tg (min.)

JP-RSE (EU/mL)	Tg (min.)	
0.0039 EU/mL	55.0	55.0
0.0078 EU/mL	39.6	40.2
0.0156 EU/mL	30.4	30.6
0.0313 EU/mL	24.2	24.4
0.0625 EU/mL	19.6	19.4

$$\text{Log (Tg (min.))} = -0.3707 \text{ Log (JP-RSE conc. (EU/mL))} + 0.8306$$

$$r = -0.9966$$

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

CSE (ng/mL)	Tg [mean] (min.)	
	Vial 1	Vial 2
0.00156 ng/mL	42.3	43.4
0.00313 ng/mL	32.9	31.5
0.00625 ng/mL	24.9	25.3
0.0125 ng/mL	19.8	19.7
0.025 ng/mL	16.3	16.1

Table 5 CSE の EU 換算係数

CSE (ng/mL)	2 バイアルの平均Tg (min.)	EU換算値 (EU/mL)	EU換算係数 (EU/ng)
0.00156 ng/mL	42.85	0.006925	4.44
0.00313 ng/mL	32.20	0.01500	4.79
0.00625 ng/mL	25.10	0.02920	4.67
0.0125 ng/mL	19.75	0.05574	4.46
0.025 ng/mL	16.20	—	—

平均 EU 換算係数 4.59

$$500 \text{ (ng/Vial)} \times 4.59 \text{ (EU/ng)} = 2295 \text{ (EU/Vial)}$$

従ってこの例では CSE の力価は 2300 (EU/Vial) になります。

〔参考文献〕

1. Bang, F. B. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **98**, 325 (1956).
2. Levin, J. and Bang, F. B. : *Ibid.*, **115**, 265 (1964).
3. *The United States Pharmacopeia 41st Edition*, U.S.Pharmacopeial Convention Inc.
4. 第十八改正日本薬局方 (2021).
5. Westphal, O., Luderiz, 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).
7. 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).
8. Ohishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39**, 194 (1985).
9. Ohishi, H., Fusamoto, M., Hatayama, Y., Tsuchiya, M., Takaoka, A. and Sakata, Y. : *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3012 (1988).
10. 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).

製造元

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road, Richmond, VA 23237

販売元

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

2304KA2