

(109×210mm Size)

FUJIFILM

Wako

Code 299-77201

エンドトキシン検出用

Limulus ES-II plus CS Single Test Wako

リムルス ES-II プラスCSシングルテストワコー

32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。

Kakinumaらは、LALが β -1,3-グルカンにも反応することを報告し³⁾、さらにIwanagaらは、LAL中にはエンドトキシン以外に β -1,3-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⁴⁾。また、セルロース系の膜よりLALに反応する物質が溶出することも報告され⁶⁾、LALのエンドトキシンに対する特異性が問題となっております。

本キットは、ライセート試薬とControl Standard Endotoxin（CSE）からなり、高い感度で迅速にエンドトキシンの特異的な検出を行うことができます。ライセート試薬は、緩衝液成分を含むライセート試薬の凍結乾燥品で検体0.2 mLを添加するだけで測定が行える試験管タイプの試薬です。

本キットは日本薬局方で定められたエンドトキシン標準品（JP-RSE）を用いて感度を測定してあります。CSEは、*E. coli*からフェノール法⁷⁾によって抽出、精製したリポ多糖（Lipopolysaccharide, LPS）に添加剤としてマンニトールとグリシンを加え、凍結乾燥したものです。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おり、CSEは検量線の midpoint 0.1 EU/mL になるように溶解いたします。よって、CSEをエンドトキシン試験用水で溶解することによって陽性コントロール（PC）、試料溶液で直接溶解すると陽性製品コントロール（PPC）が調製できます。また、添付検量線（保存検量線）を使用することによって、測定回毎に検量線を作成する必要がありません^{8),9)}。

尚、本試薬は〔使用方法〕Ⅱ．日常測定手順に従って測定した場合、日本薬局方のエンドトキシン試験法には適合いたしません。また、本試薬はゲル化法用の試薬ではありません。

【特 長】

1. 検体中の β -1,3-グルカンの影響を受けることなく、高感度でエンドトキシンの検出ができます。
2. 低含量CSEと添付検量線を用いることによってエンドトキシンが簡便に測定できます。
3. 並列型比濁時間分析装置トキシノメーターを用いて測定を行います。
4. 本キットは冷蔵(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。
5. 測定に必要な数だけライセート試薬を使用できますので、無駄がありません。

【原 理】

エンドトキシンによるライセート試薬のゲル化機構は、下図のように考えられています。すなわち、ライセート試薬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(図1)。

トキシノメーターでは、ゲル化にともなって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を添付検量線と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。

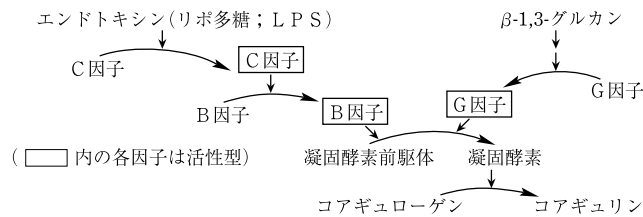


図1. カプトガニ体液凝固のカスケード機構

【内 容】

1. ライセート試薬, 米国産カプトガニ (*Limulus polyphemus*) の血球抽出物, 凍結乾燥品(トリス塩酸緩衝液, β -1,3-グルカン誘導体を含む) 32バイアル(0.20 mL用)
感度: 日本薬局方エンドトキシン標準品で測定。
* 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
..... 16バイアル(精製LPS含有)
*E. coli*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・グリシンを含みます。
* 2~10℃保存 *

【使用方法】

I. 使用器具及び用意するもの

1. ピペット(0.2 mL, 1 mL用)
2. 乾熱滅菌済みアルミキャップ
3. トキシノメーター ET-ミニ, ET-6000と同等品

4. 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せん。）

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. 日常測定手順

1. PC及びPPCの調製

CSEのゴム栓をゆっくりとはずします。箱ラベルおよび添付検量線データシートに記載のCSEの表示含量を参照して終濃度が0.1 EU/mLとなるように（例0.084EU/バイアルの場合、840 μ L）エンドトキシン試験用水（陽性コントロール：PCを調製する場合）または試料溶液（陽性製品コントロール：PPCを調製する場合）を加え、アルミキャップをしてボルテックスミキサーで約30秒激しく攪拌してください。

溶解後は2～10℃保存して4時間以内に使用してください。

もし、CSEの粉末がゴム栓に付着している場合は、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CSEの粉末をバイアルの底に落としてください。

2. 試料のpH調整・希釈

0.20 mLの試料溶液でライセート試薬を溶解したものの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などで6.0から8.0になるように調整してください。

3. 検体の添加及び反応

1検体当たり4本数のライセート試薬をラックに並べゴム栓を取り、乾熱滅菌済みのアルミキャップを被せておきます。

- 試料溶液 n = 2
- 陽性コントロール（PC） n = 1
- 陽性製品コントロール（PPC） n = 1

これに検体を0.20 mLずつ加え再びアルミキャップをし、検体を加えて2秒後から、5秒間ボルテックスミキサーで攪拌します。更に3秒後にトキシノメーターにセットし測定を開始します。

もし、ライセート試薬の粉末がゴム栓に付着している場合は、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ライセート試薬の粉末をバイアルの底に落とします。少量のライセート試薬がゴム栓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。

添付検量線と検体のゲル化時間（T_g）から検体のエンドトキシン濃度を求めることができます。

陽性コントロールの測定値が0.06 EU/mLから0.17 EU/mLであり、陽性製品コントロールの測定値から試料溶液の測定値を引いた値が0.05 EU/mLから0.2 EU/mLであるとき、試験は成立します。その時の試料溶液中の測定値が試料溶液中のエンドトキシン濃度となります。

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うか、適切な方法によって影響を除去して測定を行ってください。

【付録 CSEのEU表示値の決定方法】

- 日本薬局方エンドトキシン標準品 (JP-RSE) の10倍希釈系列を表1の様子で作成して、0.01~1 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T_gを測定します。その測定を3回行い、検量線のデータとします。
次に2回対数 (loglog) (T_g (min)) と対数 (log) (JP-RSE conc. (EU/mL)) の直線回帰式 $\log\log (T_g (\text{min})) = A \log (\text{JP-RSE conc. (EU/mL)}) + B$ (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、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T_gの平均値の間がこの検量線の有効範囲となります。
- CSEの希釈及び測定
8バイアルのCSEについて1 mLのエンドトキシン試験用水で溶解します。溶解したCSE溶液はそのまま測定します。CSE溶液のT_gは検量線の有効範囲にはいなければならない。
- CSEのEU表示値の計算方法
CSEのT_gを検量線に代入しエンドトキシン測定値 (EU/mL) を求めます。8バイアルのエンドトキシンの平均から1バイアル当たりの力価を算出します (1 mLで溶解したのでEU/mL = EU/バイアル)。 (計算方法については下記の実施例を参照してください。)

表 1. JP-RSEの希釈系列

JP-RSE 溶液 (mL)	H ₂ O (mL)	JP-RSE 終濃度 (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
0.5 (1 EU/mL)	4.5	0.1
0.5 (0.1 EU/mL)	4.5	0.01

CSEのEU表示値の計算実施例

表 2. JP-RSEの濃度とT_g (min)

JP-RSE (EU/mL)	T _g (min)					
	0.01EU/mL	36.8	37.2	37.4	37.4	37.8
0.1EU/mL	18.2	18.2	18.4	18.4	18.6	18.4
1EU/mL	10.0	10.0	10.2	10.2	10.2	10.2

$$\log\log (T_g(\text{min})) = -0.09721 \log (\text{JP-RSE conc. (EU/mL)}) + 0.003167$$

$$r = -0.9998$$

表 3. CSEのTg (min) とエンドトキシン濃度

Vial#	Tg (min)	ETX (EU/mL)
1	20.4	0.0672
2	20.8	0.0629
3	20.2	0.0695
4	20.2	0.0695
5	21.2	0.0590
6	21.0	0.0609
7	21.0	0.0609
8	21.0	0.0609
平均	20.73	0.0639

1 mLのエンドトキシン試験用水で溶解しているので

$$0.0639 \text{ (EU/mL)} = 0.0639 \text{ (EU/バイアル)}$$

小数点以下4位を四捨五入します。

従ってこの例ではCSEの力価は0.064 (EU/バイアル) 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. Kakinuma, J., Asano, T., Torii, H. and Sugino, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434 (1981).
4. 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).
5. Iwanaga, S., Morita, T., Miyata, T., Nakamura, T., Hiranaga, M. and Ohtusbo, S. : *Bacterial Endotoxin*, Eds. Homma, J.Y., Kanegasaki, S., Luderitz, O., Shiba, T., and Westpha., O., p.365 Verlag Chemie (1984).
6. Pearson, F.C., Weary, M. and Bohon, J. : *Endotoxin 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).
7. Westphal, O., Lüderitz, O., Eichenberger, E. and Keiderling, W. : *Z. Naturforsch.*, **7b**, 536 (1952).
8. 脇厚生, 森哲也, 西嶋剣一, 本城和義, 萱野勇一郎, 矢野良一, 白石浩巳, 高岡文, 清野泰, 藤林靖久: 核医学, **50**, 289-296 (2013).
9. 脇厚生, 森哲也, 西嶋剣一, 本城和義, 萱野勇一郎, 矢野良一, 白石浩巳, 高岡文, 清野泰, 藤林靖久: 核医学, **51**, 383-386 (2014).

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

1804KA1