FUJIFILM

Wako

Code No. 292-51213（2mL用×5）
290-51214（5.2mL用）

エンドトキシン検出用

カブトガニ血球抽出物 ES-Ⅱ，凍結乾燥品 0.015

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ブ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．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年には，日本薬局方にも収載されました[3),4)]．

Kakinumaらは，LALがβ-1,3-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[6),7)]．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[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．

LAL ES-Ⅱ試薬は，緩衝液成分を含むLAL試薬の凍結乾燥品であり，エンドトキシン試験用水で溶解することによ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．また，本試薬は日本薬局方で定められたエンドトキシン標準品（JP-RSE）を用いて検定したゲル化感度を力価として表示してあり，ゲル化法並びに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．

【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特異的検出ができます．
2．強固なゲルが形成されるように工夫されておりますので，ゲル化判定が極めて容易です．
3．ゲル化法並びにトキシノメーターを用いた比濁時間分析法にて，さらに感度よくエンドトキシンの定量が行えます．
4．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，最後に凝固性蛋白前駆体（コアギュローゲン）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）．一方，β-1,3-グルカンもLAL試薬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試薬の活性化を阻害します．かつ，エンドトキシンによるLAL試薬の活性化には影響を与えません．本試薬は，反応系に，β-1,3-グルカン誘導体を高濃度共存させることにより，エンドトキシンを特異的に測定することができます[9]．

ゲル化法では，LAL 試薬と検体を混合し，37℃，1 時間反応後，180°転倒しゲル形成の有無を観察することにより判定を行います．
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，透過光量比があらかじめ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 とエンドトキシン濃度の関係からエンドトキシン濃度を算出します．

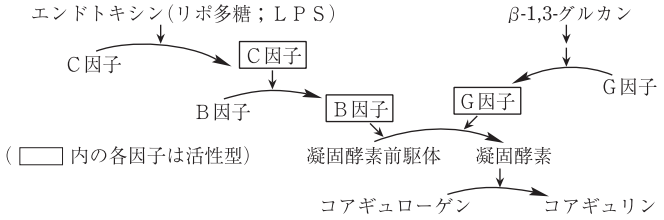


図１．カブトガニ体液凝固のカスケード機構

【内　　容】
LAL ES-Ⅱ試薬，米国産カブトガニ（*Limulus polyphemus*）血球抽出物の凍結乾燥品（トリス塩酸緩衝液，β-1,3- グルカン誘導体を含む）
力価：日本薬局方エンドトキシン標準品で検定．
＊2 ～ 10℃保存＊

【使用方法】
A．ゲル化法で測定する場合
Ⅰ．使用器具及び用意するもの
1．ピペット（0.1mL，0.5mL，2.0mL，5.0mL，10.0mL 用）
2．希釈用試験管（アルミキャップ付き）
3．反応用試験管（専用試験管）
4．アルミキャップ
5．ブロックヒーター
または反応中試験管が振動しない恒温槽（37℃）
6．標準エンドトキシン（日本薬局方エンドトキシン標準品またはコントロールスタンダードエンドトキシン）
7．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す．）
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．測定手順
1．LAL ES-Ⅱ試薬の溶解
LAL ES-Ⅱ試薬のアルミキャップをはずし，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 LAL 試薬の粉末をバイアルの底に落とします．少量の LAL 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．
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．バイアルの口の内側に触れないように注意してゴム栓を持ち上げて開栓します．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．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使用してゴム栓を持ち上げる方法をおすすめします．はずしたゴム栓は汚染しないように足を上に向けて置きます．
エンドトキシン試験用水 2mL（5.2mL 用の場合は 5.2mL）をピペット

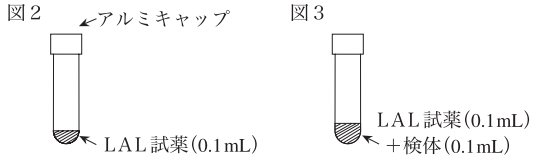
でバイアルの口を濡らさないようにゆっくりと加え，再びゴム栓をしてゴム栓に内容液がつかないように注意してゆっくりと振り混ぜ完全に溶かします．溶解したLAL ES-Ⅱ試薬は氷冷下に置き，泡立てたり，激しく撹拌したりしないで下さい．
溶解したLAL ES-Ⅱ試薬は氷冷下で置き，できるだけその日のうちに使用して下さい．保存する場合は－10～－30℃で凍結し2週間以内に使用して下さい．凍結融解を繰り返すと力価が変化することがあります．凍結融解は1回にとどめて下さい．

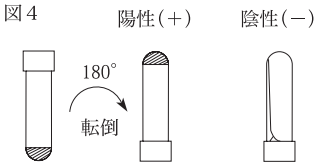
2．エンドトキシンの溶解
各々のエンドトキシンによって指定された溶解法に従って下さい．

3．エンドトキシンの希釈及び試料のpH調整・希釈
希釈したエンドトキシン及び試料溶液は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撹拌します．1段階の希釈で10倍をこえる希釈はしないで下さい．
試料溶液とLAL ES-Ⅱ試薬を等量混合したものの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で6.0から8.0になるように調整して下さい．

4．LAL ES-Ⅱ試薬の分注および反応
反応用試験管を試験管の口に触れないように取り出し，ラックに立ててすみやかにアルミキャップをかぶせます．LAL ES-Ⅱ試薬を再度ゆるやかに撹拌して均一であることを確認してから，反応用試験管に0.1mLずつ分注します．（図2）
これに検体を0.1mLずつ加えアルミキャップをして静かに混和した後，37±1℃で60±2分間静置加温します．（図3）

5．判　　定
加温終了後，試験管を取り出し振動を与えないように注意してゆっくりと180°転倒します．内容物が凝固して変型しない場合を陽性，それ以外の場合を陰性と判定します．（図4）





B．トキシノメーター[10),11),12)]で測定する場合

詳細は“エンドトキシン試験法標準操作法”をご参照下さい．

【ご使用上の注意】

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，溶解水などによるエンドトキシン汚染には十分ご注意下さい．
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こんだりしないよう

取扱には十分ご注意下さい.

5．LAL ES-Ⅱ中に含まれるβ-1,3-グルカン誘導体は，低濃度ではリムルスHS-Tテストワコーなどの通常のLAL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ご注意下さい.

【参考文献】

1．Bang, F.B. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **98**, 325 (1956).
2．Levin, J. and Bang, F. B. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **115**, 265 (1964).
3．*The United States Parmacopeia 22th, the National Formulary 17th, Supplement* 8, p.3349, U.S. Pharmacopeial Convention Inc. (1990).
4．第十二改正日本薬局方解説書，B-57 (1991).
5．Kakinuma, J., Asano, T., Torii, H., and Sugino, Y. : *Biochem. Biophys. Res. Comun.*, **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., p365, 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．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).
10. 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).
11. Oishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39**, 194 (1985).
12. Oishi, H., Fusamoto, M., Hatayama, Y., Tsuchiya, M., Takaoka, A. and Sakata, Y. : *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3012 (1988).

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

2301KA3