

エンドトキシン検出用

Limulus Amebocyte Lysate ES- II, lyophilized 0.03
カプトガニ血球抽出物 ES- II, 凍結乾燥品 0.03**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⁾、ライセート試薬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年には、日本薬局方にも記載されました^{3), 4)}。

Kakinuma らは、ライセート試薬が(1→3)-β-D-グルカン(β-グルカン)にも反応することを報告し⁵⁾、さらに Iwanaga らは、ライセート試薬中にはエンドトキシン以外にβ-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ライセート試薬に反応する物質が溶出することも報告され⁸⁾、ライセート試薬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。

ES- II 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が力価として表示されており、ゲル化法並びにトキシノメーターを用いた比濁法に適しています。

【特長】

1. 検体中のβ-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いますので、ゲル化判定が極めて容易です。
3. ゲル化法だけでなく、トキシノメーターでの比濁法に用いることができます。トキシノメーターを用いることにより、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ライセート試薬のゲル化機構は、図1のように考えられています。すなわち、ライセート試薬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-グルカンもライセート試薬の活性化を引き起こしますが、濃度依存性があり、高濃度では逆にライセート試薬の活性化を阻害します。かつ、エンドトキシンによるライセート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-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、ライセート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法では、ゲル化にともなう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。

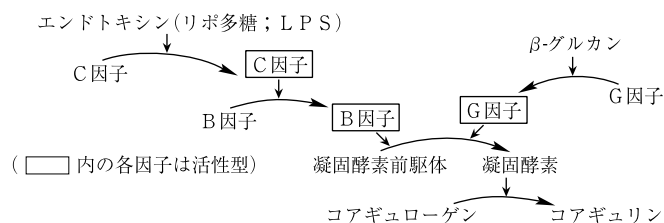


図1. カプトガニ体液凝固のカスケード機構

【内 容】

ES-II 試薬, 米国産カプトガニ (*Limulus polyphemus*) 血球抽出物の凍結乾燥品 (トリス塩酸緩衝液, (1→3)-β-D-グルカン誘導体を含む) …… 5.2mL 用 1 バイアル
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】

I. 使用器具及び用意するもの

1. ピペット
2. 希釈用試験管 (アルミキャップ付き)
3. 反应用試験管 (リムルステストチューブ-Sアルミキャップ付 Code: 292-32751等)
4. トキシノメーター, または反応中試験管が振動しないブロックヒーターあるいは, 恒温槽 (37℃±1℃)
5. ボルテックスミキサー(バイアルチューブミキサー VTM-252 II Code: 295-35421等)
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 (通常は日本薬局方注射用水が使用できます。)
8. チップ (バイオクリーンチップワコーエクステンD SII Code: 294-35011, バイオクリーンチップワコー 1000 II Code: 298-35031等)

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

試薬の調製

1. ES-II 試薬の溶解

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ください。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ください。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 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 ES-II 試薬は, 泡立てたり, 激しく攪拌したりしないでください。

溶解した ES- II 試薬は冷蔵で 8 時間以内に使用してください。保存する場合は - 20 ~ - 10℃ で凍結し 2 週間以内に使用してください。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ください。各希釈溶液は次の希釈操作を行う前に 1 分程度ボルテックスミキサーで攪拌します。1 段階の希釈で 10 倍をこえる希釈はしないでください。

試料溶液と 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ください。

測定方法に応じて、「A. ゲル化法で測定する場合」または「B. トキシノメーターで測定する場合」をご参照下さい。

A. ゲル化法で測定する場合

1. ES- II 試薬の分注および反応

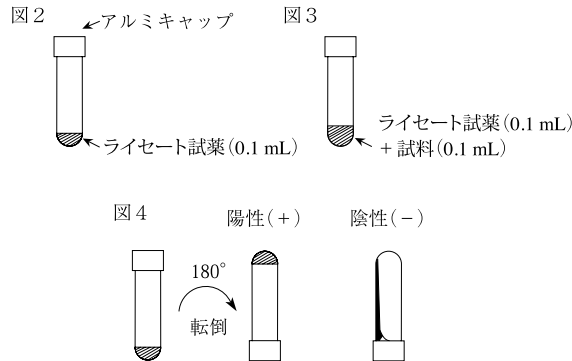
反応用試験管を試験管の口に触れないように取り出し、ラックに立ててすみやかにアルミキャップをかぶせます。ES- II 試薬を再度ゆるやかに攪拌して均一であることを確認してから、反応用試験管に 0.1mL ずつ分注します (図 2)。

2. ゲル化法による測定

ES- II 試薬を分注した反応用試験管に試料を 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)。

3. 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)。



III. 反応干渉因子の確認

試料溶液はあらかじめエンドトキシン試験において阻害や促進作用がないことを確認しておかなければなりません。試料溶液と ES- II 試薬を等量混合したものの pH が 6.0 ~ 8.0 の範囲からはずれる場合には、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 を上記の範囲に調整する必要があります。

(方法)

- (1) エンドトキシンの 2 倍希釈系列 (1/4 λ ~ 2 λ, λ は表示力価) をエンドトキシン試験用水で作成します。次に試料溶液 4.95mL にエンドトキシン 200 λ 溶液を 50 μL 添加します (エンドトキシンの終濃度は 2 λ となります)。この溶液を、試料溶液で添加したエンドトキシンの終濃度が 1/4 λ となるまで順次 2 倍希釈します (試料の濃度は一定でエンドトキシンの濃度が 1/4 ~ 2 λ となります)。
- (2) (1) で調製したエンドトキシンの希釈系列と一定濃度の試料が共存したエンドトキシンの希釈系列、およびエンドトキシンを添加しない試料溶液、陰性コントロール

(エンドトキシン試験用水)について測定を行います。測定の繰り返し数は日本薬局方「エンドトキシン試験法」の「反応干渉因子試験」に従って下さい。

- (3) 陰性コントロールが陰性判定されること、エンドトキシンを添加していない試料溶液が陰性判定されること、エンドトキシンの希釈系列から求めたエンドポイントの幾何平均が $1/2\lambda$ 以上 2λ 以下となること、これらの条件がすべて満たされたとき試験は有効となります。

陰性コントロールが陰性判定され、かつエンドトキシンを添加していない試料溶液が陽性判定された場合には、試料溶液にもともと内在しているエンドトキシンを限外濾過その他の方法で除くか、または陽性判定されなくなるまで最大有効希釈倍数内で希釈した試料溶液を使用して、再度同様の実験を行ってください。

試験が有効となった場合に、一定濃度の試料が共存したエンドトキシンの希釈系列より求めたエンドポイントの幾何平均が $1/2\lambda$ 以上 2λ 以下であれば、その濃度で試料はエンドトキシン試験に影響を与えないといえます。

試料がエンドトキシン試験に影響を与える場合には試料を最大有効希釈倍数内で希釈して同様の試験を行ってください。この際“IV. 試料の影響を調べる予備試験”を行って、影響がなくなる試料の濃度をおおよそ知ることができます。

IV. 試料の影響を調べる予備試験

試料溶液の希釈系列（希釈倍率は試料溶液の影響の程度に合わせて適当に選択します。）を作成し、それぞれに終濃度がライセート試薬の表示力価の2倍濃度（ 2λ ）になるようにエンドトキシンを添加します。エンドトキシンを添加した試料溶液の希釈系列と、エンドトキシンを添加しなかった試料溶液の希釈系列を同時に測定します。

エンドトキシンを添加したある濃度の試料が陽性判定されて、かつ同じ濃度の試料でエンドトキシンを添加しなかったものが陰性判定される場合に、試料はその濃度まで希釈すれば影響がなくなると推測されます。

V. 日常の測定（限度試験法）

検体として次のものを少なくともそれぞれ2回の繰り返し（ $n = 2$ ）で測定します。

陰性コントロール（エンドトキシン試験用水）

陽性コントロール（ 2λ ）

試料溶液

試料溶液に終濃度がライセート試薬の表示力価の2倍濃度（ 2λ ）になるようにエンドトキシン標準品を添加したもの（陽性製品コントロール）

陰性コントロールが陰性判定されること、陽性製品コントロールが陽性判定されること、試料溶液が陰性判定されること、以上を満たしたとき試料溶液中のエンドトキシン量はエンドトキシン規格値未満であると判定されます。

試料溶液が両方又は一方が陽性の場合には不適とします。ただし、陽性の結果が得られたいずれの場合でも、最大有効希釈倍数又はそれを超えない希釈倍数で試験をやり直すことができます。

B. トキシノメーター^{10),11),12)}で測定する場合

1. ES-II 試薬の分注および反応

反应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。ES-II 試薬を再度ゆるやかに攪拌して均一であることを確認してから、反应用試験管に 0.1mL ずつ分注します（図 2）。

2. トキシノメーターによる測定

ES-II 試薬を分注した反应用試験管に試料を 0.1mL ずつ加え、泡立たないよう直ちに攪拌し、トキシノメーターを用いて以下の条件で測定します。

<トキシノメーターの推奨測定条件>

測定温度 37℃

しきい値 94.9%

カウント 3

ウェイトタイム 5分

測定時間 60分（測定するエンドトキシン濃度で任意に変更できます。）

3. データ解析

x 軸にエンドトキシン濃度の対数を, y 軸にゲル化時間の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, 試料のゲル化時間からエンドトキシン濃度を算出します。

詳細は“エンドトキシン試験法標準操作法”をご参照ください。

【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ください。
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. 本品はエンドトキシン試験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ください。
5. ES-II 試薬中に含まれる β -グルカン誘導体は, 低濃度ではエンドトキシン特異的でないライゼート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ください。

【参考文献】

1. Bang, F.B. : *Bull Johns Hopkins Hosp.* **98**, 325-351 (1956).
2. Levin, J. and Bang, F.B. : *Bull Johns Hopkins Hosp.* **115**, 265-274 (1964).
3. *The United States Pharmacopeia 41st, the National Formulary 36*, 6011, U.S. Pharmacopeial Convention Inc. (2018).
4. 第十七改正日本薬局方・解説書, B-473-B-492 (2016).
5. Kakinuma, J., Asano, T., Torii, H., and Sugino, Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434-439 (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**, 781-803 (1983).
7. Iwanaga, S., Morita, T., Miyata, T., Nakamura, T., Hiranaga, M. and Ohtsubo, S. : *Bacterial Endotoxin: Chemical, Biological and Clinical Aspects*, edited by Homma, J. Y., Kanegasaki, S., Luderitz, O., Shiba, T. and Westphal, O., 365-382, Verlag Chemie (1984).
8. Peason, F. C., Weary, M. and Bohon, J. : *Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test*, edited by Watson, S. W., Levin, J. and Novitsky, T. J., 247-260, 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**, 903-911 (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**, 194-199 (1985).
12. Oishi, H., Fusamoto, M., Hatayama, Y., Tsuchiya, M., Takaoka, A. and Sakata, Y. : *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3012-3019 (1988).

【貯 法】 2 ~ 10℃保存

【使用期限】 ラベルに記載

【包 装】 50 回用

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

1901KA1