FUJIFILM

Wako

Code No. 299-51201

エンドトキシン検出用

Limulus ES-Ⅱ Test *Wako* 0.015

リムルスES-Ⅱ テストワコー 0.015　60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，すでに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．

本キットは，LAL ES-Ⅱ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．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して使用します．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．

CSEは，*E. coli* UKT-B株からフェノール法[9,10]によって抽出，精製したリポ多糖（Lipopolysaccharide, LPS）500ng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，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を表示してあります．

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おりませんのでご注意下さい．

【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 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 の活性化を阻害します．かつ，エンドトキシンによる LAL 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[11]．

ゲル化法では，LAL 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 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．

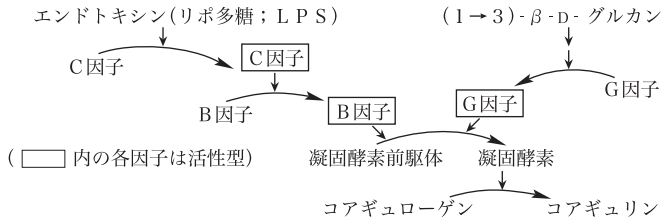


図１．カブトガニ体液凝固のカスケード機構

【内　　容】

１．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）
…… 2mL 用 × 3 バイアル（60 回用）
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．
＊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
…… １バイアル（精製 LPS として 500ng）
E. coli UKT-B 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】

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．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 の粉末をバイアルの底に落とします．少量の LAL がゴム栓等に付着している程度では試験の結果に影響

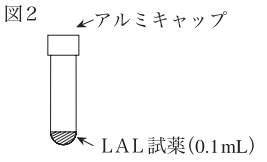
はありません.
ゴム栓のアルミキャップに接触していた部分（この部分はもともとエンドトキシンフリーではありません.）以外は触れないようにして下さい.
バイアルの口の内側に触れないように注意してゴム栓を持ち上げて開栓します．バイアルの内部は真空になっていますので，粉末が舞い上がらないようにゆっくりと開けて下さい．乾熱滅菌したスパテラ，ピンセット，ピペットの先端などを使用してゴム栓を持ち上げる方法をおすすめします．はずしたゴム栓は汚染しないように足を上に向けて置きます.
エンドトキシン試験用水 2mL をピペットでバイアルの口を濡らさないようにゆっくりと加え，再びゴム栓をしてゴム栓に内容液がつかない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．もし保存する場合は－ 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.

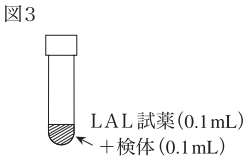
2．コントロールスタンダードエンドトキシン（CSE）の溶解
CSE のゴム栓をゆっくりとはずします．CSE の表示含量を参照して終濃度が 1000EU/mL となるようにエンドトキシン試験用水を加え，再びゴム栓をして数回転倒撹拌した後，ボルテックスミキサーで約 2 分間激しく撹拌して下さい．溶解後は 2 ～ 10℃保存して 1 ケ月以内に使用して下さい. 保存したものを使用するときには 1 分間以上ボルテックスミキサーで撹拌して下さい.

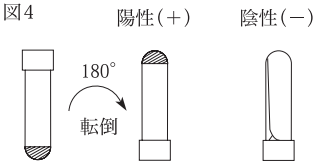
3．エンドトキシンの希釈及び試料の pH 調整・希釈
希釈は氷冷下で行い，希釈したエンドトキシン及び試料溶液は氷冷し、できるだけ速やかに使用して下さい．各希釈溶液は次の希釈操作を行う前に 30 秒以上ボルテックスミキサーで撹拌します．1 段階の希釈で 10 倍をこえる希釈はしないで下さい.
試料溶液と LAL ES-Ⅱ試薬を等量混合したものの pH が 6.0 から 8.0 の範囲からはずれている場合には，試料溶液の pH を適当な濃度の水酸化ナトリウムまたは塩酸溶液で 6.0 から 8.0 になるように調整して下さい.

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）







Ⅲ．阻害促進の確認

試料溶液はあらかじめリムルステストに対し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（1/4λ～2λ，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5.0mLにエンドトキシン200λ溶液を50μL添加します．（エンドトキシンの終濃度は2λ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1/4～2λEU/mL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1/2λ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希釈した試料溶液を使用して，再度同様の測定を行って下さい．

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1/2λ以上2λ以下であれば，その濃度で試料はリムルステストに影響を与えないといえます．

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って下さい．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LAL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

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）
エンドトキシンの希釈系列（1/4λ，1/2λ，λ，2λ）
試料溶液
試料溶液に終濃度がLALの表示力価の2倍濃度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，エンドトキシンによるエンドポイントの幾何平均が1/2λ以上2λ以下であること，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λ未満であると判定されます．

試料溶液が陽性判定された時には試料溶液のエンドトキシン試験用水による2倍希釈系列を測定して下さい．試料中のエンドトキシン量は
〔LAL 試薬の表示力価（EU/mL）〕×〔試料溶液の希釈系列の中で陽性判定される最大希釈倍率〕
の式で求められます．

B．トキシノメーター[12),13),14)]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，低濃度ではエンドトキシン特異的でないライセ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下さい．

【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，0.0078 ～ 0.0625EU/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．測定は各濃度につき2回の繰り返しで行います．
次に log（JP-RSE conc.（EU/mL））と log（Tg（min））の直線回帰式
log（Tg（min））= A log（JP-RSE conc.（EU/mL））+ B（A, B ; 定数）
を最小二乗法によって求め，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
4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 の有効範囲にはいらなければなりません．
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4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下さい．）
＊ただし使用する LAL 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，再検定して下さい．本品の CSE には製品で組合わせたロットの LAL 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_2O（mL）	final JP-RSE conc.（EU/mL）
0.5（10000EU/mL）	4.5	1000
0.5（1000EU/mL）	4.5	100
0.5（100EU/mL）	4.5	10
0.5（10EU/mL）	4.5	1.0
2.0（1.0EU/mL）	2.0	0.5
2.0（0.5EU/mL）	2.0	0.25
2.0（0.25EU/mL）	2.0	0.125
2.0（0.125EU/mL）	2.0	0.0625
2.0（0.0625EU/mL）	2.0	0.0313
2.0（0.0313EU/mL）	2.0	0.0156
2.0（0.0156EU/mL）	2.0	0.0078

Table 2　CSE の希釈系列

CSE soln.（mL）	H_2O（mL）	final CSE conc.（ng/mL）
0.5（100ng/mL）	4.5	10
0.5（10ng/mL）	4.5	1.0
0.5（1ng/mL）	4.5	0.10
1.0（0.10ng/mL）	3.0	0.025
2.0（0.025ng/mL）	2.0	0.0125
2.0（0.0125ng/mL）	2.0	0.00625
2.0（0.00625ng/mL）	2.0	0.00313
2.0（0.00313ng/mL）	2.0	0.00156

CSE の EU 表示値の計算実施例

Table 3　JP-RSE の濃度（EU/mL）と Tg（min.）

JP-RSE（EU/mL）	Tg（min）
0.0078	53.0　52.6
0.0156	44.4　44.0
0.0313	37.4　37.0
0.0625	29.6　29.4

log（Tg（min））= − 0.276log（JP-RSE conc.（EU/mL）+ 1.144
r = − 0.9972

Table 4　CSE の濃度（ng/mL）と Tg〔mean〕（min.）

CSE（ng/mL）	Tg〔mean〕（min）			
	vial 1	vial 2	vial 3	vial 4
0.00156	49.5	52.6	49.4	49.3
0.00313	39.4	45.3	40.0	41.1
0.00625	32.0	34.2	33.0	31.1
0.0125	25.8	27.3	27.3	26.2
0.025	21.2	22.4	21.2	21.0

Table 5　CSE の EU 換算係数

CSE (ng/mL)	4 バイアルの平均 Tg (min)	EU 換算値 (EU/mL)	EU 換算係数 (EU/ng)
0.00156	50.2	0.0097	6.22
0.00313	41.5	0.0193	6.17
0.00625	32.6	0.0463	7.41
0.0125	26.7	0.0953	7.62
0.025	21.5	0.2087	8.35

平均 EU 換算係数 7.15 (EU/ng)

500 (ng/vial) × 7.15 (EU/ng) = 3575 (EU/vial)
従ってこの例では CSE の力価は 3600 (EU/vial) 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. : *ibid.*, **115**, 265 (1964).
3．*The United States Parmacopeia 41 st Edition*, U.S. Pharmacopeial Convention Inc. (1990).
4．第十八改正日本薬局方, (2021).
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．Westphal, O., Lüderiz, O., Eichenberger, E. and Keiderling, W. : *Z. Naturforsh.*, **7b**, 536 (1952).
10. Akama, K., Kuratsuka, K. and Homma, R. Kanoh, S., Niwa, M., Iwanaga, S. and Nakahara, C. : *Bacterial Endotoxin*, eds. Homma, J.Y. *et al.*, p395, Verlag Chemie (1984).
11. 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).
12. 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).
13. Oishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39**, 194 (1985).
14. 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

2304KA3