

Code No. 294-36731 (50 tests)

PYROSTAR™ Neo Package Insert

[Summary and History]

Lipopolysaccharide (LPS) also known as endotoxin, is a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Since endotoxin causes serious symptoms such as fever and shock in the human body, the testing of bacterial endotoxins in parenteral drugs and medical devices is important.

The bacterial endotoxins test is performed using a lysate reagent that applies the blood coagulation of horseshoe crab. PYROSTAR™ Neo is a chromogenic endotoxin detection reagent in which a recombinant clotting factors, chromogenic substrate, and a buffer component are lyophilized. Horseshoe crab factor C, factor B and clotting enzyme are prepared by recombinant technologies.

Since natural horseshoe crabs are not used as a raw material, you can contribute to the protection of horseshoe crabs by switching from the conventional horseshoe crab-derived lysate reagent to PYROSTAR™ Neo.

[Features]

1. Since the main component is recombinant protein, the difference in reactivity between reagent lots is small.
2. Since (1→3)- β -glucan sensitive factor G is not contained, there is no false positive reaction due to (1→3)- β -glucan.
3. PYROSTAR™ Neo is a reagent for Kinetic Chromogenic Assay by onset time method using a microplate and can measure many samples at the same time in a wide quantitative range.

[Principle]

PYROSTAR™ Neo is a lyophilized reagent that contains three horseshoe crab recombinant proteins, factor C, factor B, and proclotting enzyme, with the chromogenic substrate Boc-Thr-Gly-Arg-pNA. The reaction mechanism of PYROSTAR™ Neo in the presence of endotoxin is summarized in Figure 1. Endotoxin in the test sample activates factor C, and the subsequent cascade reaction releases *p*-nitroaniline from the chromogenic substrate. Endotoxin concentration in the test sample is quantified based on the relationship between the time required for the absorbance to reach a preset threshold value and the endotoxin concentration.

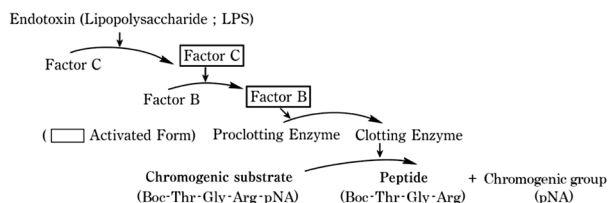


Figure 1 : Reaction Mechanism of PYROSTAR™ Neo

[Kit Contents]

PYROSTAR™ Neo

- A lyophilized reagent in which recombinant *Limulus polyphemus* factor C, factor B and proclotting enzyme, and additives such as chromogenic substrate and buffer are co-lyophilized.

[Test Procedure]

I. Materials & Equipment Required but NOT Supplied

1. Microplate reader and software
Capable of maintaining a temperature at 37°C during kinetic readings, and processing absorbance data by onset time method.
2. 96-well microplates* (BioCleanPlate Wako™ Code : 293-35221)
3. Pipettes
4. Pipette tips* (e.g. BioCleanTip Wako® Extend S II Code : 294-35011, 1000 II Code : 298-35031, 200 II Code : 291-35021)
5. Repeating pipette (e.g. Eppendorf Multipette M4)
6. Repeating pipette tips* (e.g. Eppendorf Combitips advanced Biopur)
7. Test tubes for dilution* (with aluminum caps are recommended)
8. Vortex mixer (e.g. Vial Tube Mixer VTM-252 II Code : 291-36241)
9. Water for Bacterial Endotoxins Test*
10. Standard Endotoxin (e.g. US Pharmacopeia Reference Standard Endotoxin)

* : Glassware such as test tubes should be sterilized by dry heat at 250°C for 30 minutes or more, and water for bacterial endotoxins test should be used. When using plastic wares such as 96-well microplates and pipette tips, make sure there is no endotoxin contamination or interference with the measurement.

II. Preparation of the reagents and test samples

1. Reconstitution of PYROSTAR™ Neo
 - 1) Collect the lyophilized product into the bottom of the vial by tapping on a firm surface. Small amounts of the product on the rubber stopper will not affect testing.
 - 2) Remove the aluminum cap from the vial.
 - 3) Slowly pull up the rubber stopper. The inside of the vial forms a vacuum, therefore avoid dispersion of the product. Do not touch the inside of the vial or the inside part of the rubber stopper when pulling up the rubber stopper.
 - 4) Dispense 2.7 mL of water for bacterial endotoxins test into the vial. Do not allow the rim of the vial to become wet.
 - 5) Gently swirl the vial to dissolve the lyophilized product completely. Be careful not to make bubbles in the solution or agitate the vial vigorously.

Notes : Dissolve the reagent just before use and use it all at once. If the dissolved reagent needs to be stored, freeze it at -30°C or lower and use it within 2 weeks. If refrigerate, keep it at 4°C or lower within 4 hours. Do not freeze and thaw repeatedly.

2. Preparation of Standard Endotoxin Solution

Dissolve the endotoxin standard solution by the method specified for the standard and dilute it with water for bacterial endotoxins test.

3. Dilution of the test samples

Dilute the test samples as needed.

4. pH adjustment of samples

If the pH of a mixture of the sample solution and PYROSTAR™ Neo solution is outside the range of 7.2 to 8.0, adjust the pH of the sample solution with a diluted sodium hydroxide or diluted hydrochloric acid solution.

III. Assay procedure

1. Recommended microplate reader system settings

Temperature : 37°C

Assay mode : Kinetic Onset time

Onset OD : 0.015

Auto mix : Once

Wavelength*1 : 405 nm for main and 650 nm for reference

Reading time*2 : 60 minutes

*1 : Two-wavelength measurement is recommended.
The main wavelength can be in the range of 370 nm to 410 nm, and the reference wavelength can be used in the range of 490 nm to 700 nm. Sensitivity varies slightly depending on the wavelength.

*2 : The reading time can be shortened depending on the required sensitivity.

2. Dispense 50 µL each of water for bacterial endotoxins test (negative control), standard solutions and samples into the corresponding wells of a microplate.

3. Gently swirl the PYROSTAR™ Neo solution again and quickly add 50 µL to each well using a repeating pipette.

4. Immediately after the addition of PYROSTAR™ Neo solution is completed, transfer the microplate into the microplate reader and start measurement. Be sure to agitate the plate at the start of measurement.

IV. Calculation of endotoxin concentration

A calibration curve is created using the onset time obtained from the standard endotoxin, and the endotoxin concentration of the sample is calculated from the onset time of the sample and the calibration curve.

The logarithm of endotoxin concentration can be used as the x-axis of the calibration curve and the logarithm of onset time as the y-axis.

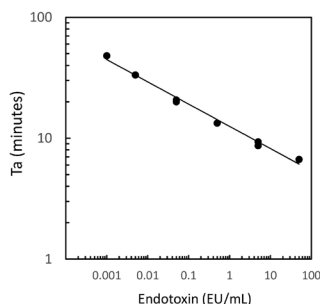


Figure 2 : Example of calibration curve of PYROSTAR™ Neo

【Expected Performance】

When used under the recommended conditions,

1. 0.001 EU/mL endotoxin can be detected within 60 minutes.
2. A linear calibration curve ($|r| \geq 0.980$) can be created in the range of 0.001 to 50 EU/mL.

【Warning and General Precautions】

1. PYROSTAR™ Neo does not correspond to the amebocyte lysate specified in bacterial endotoxins test of the Pharmacopoeia. When used as an alternative method for bacterial endotoxins test of pharmacopoeia, confirm that the accuracy, precision, sensitivity, specificity, etc. are equal or better compared to the bacterial endotoxins test using the amebocyte lysate.
2. PYROSTAR™ Neo is extremely sensitive to endotoxins. Be careful not to cause endotoxin contamination and always use aseptic techniques.
3. Since PYROSTAR™ Neo detects endotoxin on the same principle as the horseshoe crab-derived lysate reagent, the test sample may interfere with the reaction as in the case of the lysate reagent. Please evaluate the interfering factors in the same way as the bacterial endotoxins test.
4. Discard product if the color has changed to yellow or any insoluble matter is found after dissolution.

【Storage】

2 to 10°C

【Expiration Date】

Printed on the label

【Package】

1 multi-test vial (for 2.7 mL, 50 tests)

【References】

1. Bacterial Endotoxins Test and alternative methods using recombinant protein reagents for endotoxin assay, 〈G4-4-180〉 General Information, The Japanese Pharmacopoeia 18th edition, 2021
2. 4.01 Bacterial Endotoxins Test, The Japanese Pharmacopoeia 18th edition, 2021
3. Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxins testing : Questions and Answers, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2012

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コードNo. 294-36731 (50回用)

エンドトキシン検出用 PYROSTAR™ Neo パイロスター™ ネオ 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。

エンドトキシン試験はカプトガニの体液凝固を応用したライセート試験を用いて行われています。パイロスター™ ネオはライセート試験の主成分であるカプトガニ C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体の遺伝子組み換え技術による組換えタンパク質と発色合成基質、緩衝液成分などを組み合わせて凍結乾燥した発色合成基質法によるエンドトキシン測定用試験薬です。

天然のカプトガニを原料として使用しておらず、従来のカプトガニ由来のライセート試験薬から本品に切り替えることによりカプトガニの保護に貢献できます。

【特 長】

1. 主成分を組換えタンパク質とすることにより試験ロット間での反応性の差を低減しています。
2. G 因子を含まないため (1→3)-β-グルカンには感受せず、エンドトキシンに特異的な検出試験薬です。
3. マイクロプレートを用いた比色時間分析法用の試験薬で、多数の検体を同時に広い定量範囲で測定できます。

【原 理】

パイロスター™ ネオはカプトガニ C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体の三種の組換えタンパク質に発色合成基質 Boc-Thr-Gly-Arg-pNA を組み合わせて凍結乾燥した試験薬です。被験試料中にエンドトキシンが存在すると、図 1 のようなエンドトキシン依存的な C 因子の活性化とそれに引き続くカスケード反応が起こり、発色合成基質が切断されパラニトロアニリン (pNA) が遊離します。吸光度があらかじめ設定した一定の値に達するまでの時間、すなわち遊離 pNA 量が一定の濃度に達するまでの時間とエンドトキシン濃度の関係により被験試料中のエンドトキシン量を定量します。

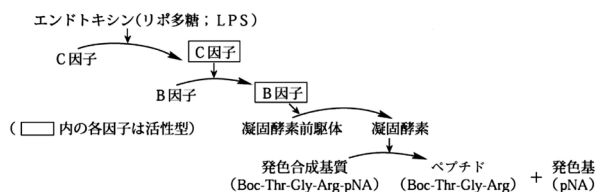


図 1: パイロスター™ ネオの反応原理

【内 容】

パイロスター™ ネオ

アメリカカプトガニ (*Limulus polyphemus*) 由来 C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体（遺伝子組み換え）の凍結乾燥品（発色合成基質、緩衝剤等を含む）

【使用方法】

I. 使用器具および用意するもの

1. マイクロプレートリーダー測定システム
37℃に設定しての Kinetic 測定が可能であり、比色時間分析が可能なソフトウェアを持つもの。
2. 96 ウェルマイクロプレート（バイオクリーンプレートワコー™ Code: 293-35221）
3. ピペット
4. チップ（バイオクリーンチップワコー® エクステンデッド S II Code: 294-35011, バイオクリーンチップワコー® 1000 II Code: 298-35031, バイオクリーンチップワコー® 200 II Code: 291-35021 等）
5. 連続分注式ピペット（エッペンドルフ マルチペット M4 等）
6. 連続分注式ピペットチップ（エッペンドルフ コンビチップ アドバンスドバイオビュア 2.5mL 等）
7. 希釈用試験管（アルミキャップ付き推奨）
8. 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: 291-36241 等）
9. 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。）
10. エンドトキシン標準品（日本薬局方エンドトキシン標準品等）

注) 以下の操作に用いる試験管、ピペットなどのガラス器具は 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。96 ウェルマイクロプレートや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無いことを確認して下さい。

II. 試験、試料の調製

1. パイロスター™ ネオの溶解

- 1) 台上でバイアル瓶の底を数回軽く叩きゴム栓に付着している試験薬の粉末をバイアルの底に落とします。少量の試験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。
- 2) バイアル瓶からアルミキャップを外します。
- 3) 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。ゴム栓の内側表面を汚染させないように取り扱って下さい。
- 4) エンドトキシン試験用水 2.7mL 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ます。
- 5) ゴム栓に内容物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。泡立てり激しく攪拌したりしないで下さい。

注) 試験薬の溶解はできるだけ使用直前に、一回で使い切ってください。溶解した試験薬を保管する必要がある場合、-30℃以下で凍結し 2 週間以内に、冷蔵する場合は 4℃以下で 4 時間以内に使用して下さい。凍結融解は一回にとどめて下さい。

2. エンドトキシン標準品の溶解と希釈系列の調製
使用する標準品で指定された方法で溶解したエンドトキシン標準品溶液をエンドトキシン試験用水で希釈して下さい。
3. 試料の希釈
試料を必要に応じて希釈して下さい。
4. 試料の pH 調整
試料溶液とパイロスターTM ネオ試液を等量混合したものの pH が 7.2 から 8.0 の範囲を外れている場合には、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調整して下さい。

Ⅲ. 測定手順

1. マイクロプレートリーダー測定システムの推奨測定条件
設定温度 : 37℃
測定モード: カイネティック測定 (Onset time)
Onset OD : 0.015
攪拌 : 反応開始時のみ攪拌
測定波長^{*1}: 主波長 405nm, 副波長 650nm
測定時間^{*2}: 60 分
*1: 二波長測定が可能な場合は副波長の測定をおすすめします。主波長は 370nm から 410nm の範囲、副波長は 490nm から 700nm の範囲が使用できます。測定波長により感度はやや変化します。
*2: 必要な感度により、測定時間の短縮は可能です。
2. エンドトキシン試験用水 (陰性コントロール)、検量線作成用のエンドトキシン希釈系列および希釈済み試料溶液を 50 μ L ずつマイクロプレートの各ウェルに加えます。
3. パイロスターTM ネオ試液を再度ゆるやかに攪拌し、連続分注式ピペットなどを用いて 50 μ L ずつ各ウェルにすみやかに添加します。
4. パイロスターTM ネオ試液の添加が完了したら直ちにマイクロプレートリーダーに入れ測定を開始します。測定開始時に必ず攪拌して下さい。

Ⅳ. エンドトキシン濃度の算出

標準エンドトキシンから得られた活性化時間を用いて検量線を作成し、試料の活性化時間と検量線から試料のエンドトキシン濃度を算出します。

検量線の x 軸にはエンドトキシン濃度の対数を、y 軸には活性化時間の対数を使用できます。回帰計算には一次式回帰あるいは二次式回帰が使用できます。

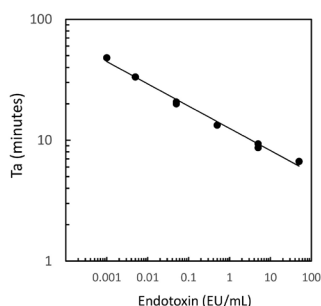


図 2: パイロスターTM ネオの検量線例

【性 能】

推奨測定条件で使用した場合、

1. 60 分以内に 0.001EU/mL のエンドトキシンを検出できます。
2. 0.001 から 50EU/mL の範囲で直線性のある検量線 ($|r| \geq 0.980$) が作成できます。

【ご使用上の注意】

1. 本品は日本薬局方エンドトキシン試験法に記載されたライセート試薬には該当しません。代替法として医薬品のエンドトキシン試験に使用される場合は、ライセート試薬を用いたエンドトキシン試験法と比較して、同等以上の真度、精度、感度、特異性などが得られることを確認した上でご使用下さい。
2. 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、器具、エンドトキシン試験用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。
3. 本品はカプトガニ由来のライセート試薬と同じ原理でエンドトキシンを検出しますので、ライセート試薬の場合と同様に被験試料成分が反応に干渉する場合があります。エンドトキシン試験法と同様に反応への干渉の有無を評価してご使用下さい。
4. 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いますので使用しないで下さい。

【貯 法】

2 ~ 10℃ 保存

【使用期限】

ラベルに記載

【包 装】

50 回用 (2.7mL 用) \times 1 本

【参考文献】

1. 第 18 改正日本薬局方 参考情報 (G4-4-180), エンドトキシン試験法と測定試薬に遺伝子組換えタンパク質を用いる代替法, 2021
2. 第 18 改正日本薬局方, 4.01 エンドトキシン試験法, 2021
3. Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxins testing: Questions and Answers, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2012

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