

FUJIFILM

Wako

Code No. 295-51301 (25 tests)

Limulus ES-II Single Test Wako 0.015

Package insert

[Summary and General Information]

Endotoxin, lipopolysaccharide (LPS) 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 bacterial endotoxin test for pharmaceuticals, especially parenteral drugs, is important.

In 1956, F. B. Bang reported clotting of the horseshoe crab body fluid due to Gram negative bacteria¹⁾. In 1964, J. Levin and F. B. Bang discovered that horseshoe crab amebocytes (Limulus amebocyte lysate, or LAL) contained all the components needed to clot due to endotoxin²⁾. Subsequently, bacterial endotoxin detection by the Limulus test has been widely used. This method known as the Bacterial Endotoxin Test was recognized in 1980 by United States Pharmacopoeia and, in 1988 by Japanese Pharmacopoeia^{3), 4)}.

Kakinuma et al reported that LAL reacted with not only endotoxin but also β -1,3-glucan⁵⁾ and Iwanaga et al reported that the cascade system in LAL activated by β -1,3-glucan was different from the one activated by endotoxin^{6), 7)}. It was also reported that a LAL-reactive material was eluted from cellulose membranes, which activated LAL⁸⁾. The specificity of the LAL test for the detection of endotoxin became a problem.

This kit contains LAL ES-II reagent and Control Standard Endotoxin (CSE) and can specifically and rapidly assay and detect endotoxin with high sensitivity. LAL ES-II reagent is supplied in single use tubes able to assay just 0.2 mL sample with the LAL reagent including the buffer ingredient. In addition, the labelled gel-clot sensitivity was determined using the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard Endotoxin (JP-RSE), and this reagent is suitable for an analysis by the gel-clot technique and the kinetic-turbidimetric assay using Toxinometer. CSE contains 500 ng LPS (Lipopolysaccharide, LPS) which has been extracted and purified from *E. coli* UKT-B by phenol method^{9), 10)}, and combined with mannitol and glycine as additives, and is tested in comparison to the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard Endotoxin and the potency is printed on the label as a reference.

[Features]

1. Highly sensitive for specific detection of endotoxin without the interference of β -1,3-glucan in samples.
2. Gel forms strongly and easy to determine.
3. The reagent can assay by the gel-clot technique and the kinetic-turbidimetric assay using Toxinometer. Toxinometer can detect lower endotoxin than the gel-clot technique.
4. Store at 2 ~ 10°C.
5. Single test vials mean there is no reagent wasted.

[Principle]

In the gelation of LAL by endotoxin, serine proteases are activated in the cascade reactions. In the last reaction, the gel-forming protein precursor (coagulogen) is hydrolyzed to coagulin, which makes an insoluble gel. (Fig. 1) β -1,3-glucan also activates LAL. However, activation by β -1,3-glucan is dependent on the concentration of β -1,3-glucan itself. In a very high

concentration. β -1,3-glucan does not activate LAL. In such a high concentration β -1,3-glucan does not interfere with the activation of LAL by endotoxin. The LAL ES-II contains a large amount of β -1,3-glucan so that activation by β -1,3-glucan is completely inhibited and therefore, endotoxin can be specifically assayed.

The gel-clot technique is that LAL reagent is mixed with a sample. The mixture is incubated at 37°C for one hour. It is assayed by turning the tube upside down to determine if a gel has formed.

The kinetic-turbidimetric assay is when a sample containing endotoxin is mixed with the LAL reagent. During gelation, turbidity in the reaction mixture increases (i.e., transmittance decreases). The transmittance decrease is measured with the Toxinometer, which is programmed with a threshold value for the percent transmittance. The time it takes for the transmittance to reach the threshold value is also measured by the Toxinometer. This time is defined as gelation time (Tg). Endotoxin is calculated by Tg and endotoxin concentration.

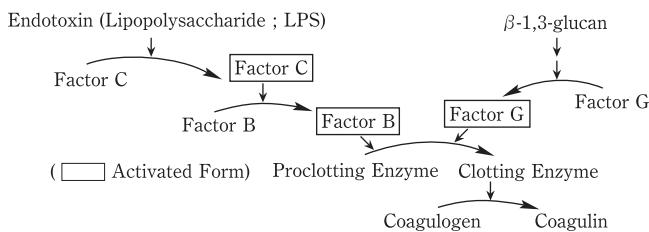


Fig. 1 the cascade system of Limulus Amebocyte Lysate

【Kit Contents】

1. LAL ES-II, lyophilized 25 tubes containing lyophilized extract of *Limulus polyphemus* amebocytes containing Tris buffer and β -1,3-glucan derivatives. 25 vials (for 0.2 mL)
Gel-clot sensitivity was determined using the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard Endotoxin
Store at 2 to 10°C
2. Control Standard Endotoxin, lyophilized 1 vial \times 500 ng (as purified LPS)
Endotoxin purified from *E. coli* UKT-B, containing mannitol and glycine as additives.
Store at 2 to 10°C

【Usage】

A. The gel-clot technique

- I . Materials required but not supplied
 1. Pipettes (for 0.2 mL, 0.5 mL, 2.0 mL and 5.0 mL)
 2. Test tubes with aluminum caps for dilution of standard solutions
 3. Block heater or an incubator able to maintain 37 ± 1°C.
 4. Endotoxin-free water

NOTE : A test tube and the pipette should be dehydrogenated by 250°C and more than 30 min. Water should be Endotoxin-free water. The plastic products such as tips for micropipets should be confirmed that they are no endotoxin contamination, and adsorption or interference with the measurement.

II . Procedure

1. Preparation of Control Standard Endotoxin (CSE) Solution
Remove the aluminum cap on the vial. The inside of the vial is a

vacuum. Release the vacuum by pulling slowly up on the rubber stopper and remove the stopper from the vial. The EU value (EU/vial) is printed on the label.

Determine the volume of water to be added into the vial to make a 1,000 EU/mL solution. Add the determined volume of endotoxin-free water into the vial. Put the rubber stopper on the vial. After turning the vial upside down several times, agitate the vial vigorously with a Vortex mixer for approximately 2 minutes. The Control Standard Endotoxin Solution can be stored at 2 ~ 10°C for 1 month. When the stored solution is used, agitate the solution vigorously with Vortex mixer for more than 1 minute before use.

2. Dilution of standard endotoxin solutions, the pH adjustment and dilution of samples

A dilute standard solution should be agitated with a Vortex mixer for more than 30 seconds before use in the next dilution procedure. One dilution should not be more than 10-fold.

When the pH of the LAL ES-II solution reconstituted with 0.2 mL of sample solution is out of the range between 6.0 and 8.0, adjust the pH range of sample solution with a dilute sodium hydroxide solution or dilute hydrochloric acid.

3. Dispensing of samples

Take LAL ES-II tubes out of the package and put the tubes in a tube rack. When powder of LAL is attached to the rubber stopper, knock on several times of bottoms of the vial. A little LAL attaches to a rubber stopper and does not influence the result of the examination. Each rubber stopper is loosened by releasing the vacuum and slowly pulling up the rubber stopper slightly. (Fig. 2) Dispense 0.2 mL of a sample into each LAL ES-II tube and put the rubber stopper on the tube. Mix the single test vial with a vortex mixer for 5 seconds to dissolve. Check to dissolved. Incubate the reaction mixture at 37 ± 1°C for 60 ± 2 min without vibration. (Fig. 3)

4. Judgment

After 60 minute incubation, slowly turn each tube upside down to determine if a gel is formed. A positive result is defined as the formation of a firm gel capable of maintaining its integrity. A negative result is defined as the absence of gel or the formation of a viscous mass, which does not hold. (Fig. 4)

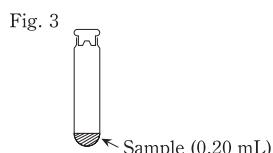
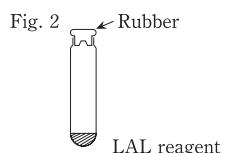
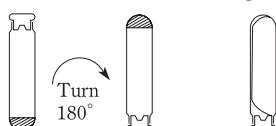


Fig. 4 Positive (+) Negative (-)



III. Interfering Testing

The inhibition or enhancement of the LAL test should be determined for each sample formulation before the LAL test is used to assess the endotoxin content of any sample. When the pH of the LAL ES-II solution reconstituted with 0.2 mL of sample solution is out of the range between 6.0 and 8.0, adjust the pH range of sample solution with a dilute sodium hydroxide solution, or dilute hydrochloric acid.

(Method)

1. Prepare a series of two-fold dilutions of endotoxin with endotoxin-free water to give concentrations of 2λ , λ , $1/2\lambda$, and $1/4\lambda$, where λ is the labeled sensitivity of the LAL reagent. Add 50 μ L of 200 λ endotoxin solution to 4.95 mL of sample solution, which makes a final endotoxin concentration of 2λ . Prepare another series of two-fold dilutions of the 2λ endotoxin-spiked sample solution diluted with the sample solution to give final endotoxin concentrations of 2λ , λ , $1/2\lambda$, and $1/4\lambda$.
2. Perform the test on the above 2 series of dilutions, an unspiked sample solution and a negative control (endotoxin-free water). Please follow "Inhibition and Enhancement Testing" of the station "bacterial endotoxin test" in the Japanese Pharmacopoeia about the number of the repetition.
3. The unspiked sample solutions and the negative controls must be negative. The geometric mean endpoint concentration of the first series of dilutions (diluted with endotoxin-free water) must be greater than or equal to $1/2\lambda$ and less than or equal to 2λ .
If the negative controls are negative and the unspiked sample solutions are positive, remove endogenous endotoxin by ultrafiltration/appropriate way or dilute the sample solution. And then retest.
If all the conditions in the above 3. are met and the geometric mean endpoint concentration of the second series of dilutions (diluted with sample solution) is greater than or equal to $1/2\lambda$ and less than or equal to 2λ , it is confirmed that the sample concentration in the sample solution does not interfere with the LAL test.

IV. Preliminary Test for Dilution Factor

Prepare a series of dilutions (determine an appropriate dilution factor according to the degree of interference) of the sample solution with endotoxin-free water. Add endotoxin solution to each of the dilutions making the final endotoxin concentration 2λ . Perform the test on 2 series of dilutions (a series of unspiked sample solutions and a series of 2λ endotoxin-spiked sample solutions). If a dilution of the spiked sample solution is positive and the same dilution of the unspiked sample solution is negative, it is confirmed that no interference is observed the sample concentration of that dilution.

V. Routine Testing (Limit Test)

Perform the test on the following specimens at least in duplicate ($n=2$).

- Negative control (Endotoxin-free water)
- A dilution of endotoxin (2λ) (Positive Control : PC)
- Sample solution
- Positive product control (2λ endotoxin-spiked sample solution) (PPC)

If all the following conditions are met, the endotoxin concentration of the sample solution is passed.

- Negative control is negative
- PC and PPC are positive

- Sample is negative

If the sample solution is positive, perform the test on a series of 2-fold dilutions of sample solution diluted with endotoxin-free water.

The endotoxin concentration in the sample solution is determined by :
 $[\lambda \text{ (EU/mL)}] \times [\text{Maximum dilution factor in the series of dilutions of positive results}]$

B. The kinetic-turbidimetric assay using Toxonometer^{12), 13), 14)}

1. Preparation of Reagents

Prepare reagents as stated in the "Preparation of Reagents" section.

2. Toximeter[®] Parameters

Set the Toximeter[®] parameters as shown :

Target temperature : 37°C

Threshold value (Th) : 94.9%

Count : 3

Wait time *1 : 5 minutes

Measurement time *2 : 60 minutes

*1 : When measuring at high concentrations, it is recommended to shorten the Wait time and change the setting to "Use the first count as Reaction time."

*2 : Please note that the higher the sensitivity, the more time may be required for the endotoxin to be measured by the Toximeter[®].

3. Assay procedure

1) Remove the appropriate number of LAL ES-II reagent out of the kit box and place each in the test tube rack.

2) Remove the cap by using the cap opener provided in the kit box.

3) If the lyophilized product is attached to the rubber stopper, gently tap the bottom of the vial on a firm surface before opening the vial. Small amounts of lyophilized product attached to the rubber stopper will not affect testing.

4) Use cap opener to pull up rubber stopper releasing the vacuum. If necessary, remove the rubber stopper and cover vial with an endotoxin-free aluminum cap.

5) Dispense 0.2 mL of water for BET (negative control), standard solutions, and/or samples into each of the lyophilized LAL ES-II reagent.

6) Return the rubber stopper or the aluminum cap on to the single test vial.

7) Mix the single test vial with a vortex mixer for 5 seconds to dissolve. Check to dissolved.

8) Place each vial into the Toximeter[®] to be measured by the Toximaster[®] software.

4. Standard curve and Data analysis

The endotoxin concentration of the sample is based on the sample's gel time using the generated standard curve.

A standard curve will be generated by taking the logarithm of the endotoxin concentration on the x axis and the logarithm (log-log) or twice the logarithm (log-loglog) of the gel time on the y axis. Linear or quadratic regression can be used for regression calculation. If the range of the standard curve is wide, improvement of the standard curve fitting can be expected by using twice the logarithm of gel time or quadratic regression.

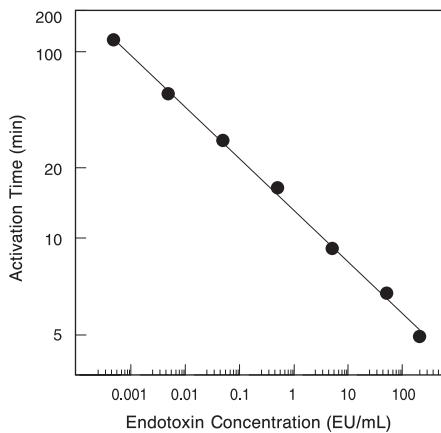


Figure 2 : An example of standard curve of endotoxin measured with LAL ES-II reagent using a Toxinometer®.

This figure shows that a high correlation standard curve can be obtained over a wide concentration range.

[Precautions]

1. Be very careful not to cause endotoxin contamination. Use endotoxin-free equipment and water
2. Do not use the reagent with a large quantity of insoluble material or when it changes color.
3. For research used only. For in vitro use only. Not for use in diagnostic procedures. Not for internal use in human or animals.
4. Exercise caution when handling LAL, because its toxicity is not known.
5. Even a trace amount of β -1,3-glucan derivatives, which is included in the LAL ES-II, activates normal LAL reagent that is sensitive to β -glucan. Be careful not to contaminate normal LAL with LAL ES-II.

[Procedure to Determine Potency of CSE (Reference)]

1. Prepare a series of dilutions of Japanese Pharmacopoeia Reference Standard Endotoxin (JP-RSE) according to Table 1. Perform the test on the dilutions of 0.0039 ~ 0.0313 EU/mL in duplicate using the Toxinometer.
A standard curve, $\log(Tg\text{ (min)}) = A \times \log(\text{JP-RSE conc. (EU/mL)}) + B$, will be obtained by the least squares method. The coefficient of correlation (r) of the standard curve must be less than -0.980. The valid range of the standard curve is between mean Tg of the maximum concentration and the minimum concentration.
 2. Prepare a series of dilutions of each of 4 vials of CSE according to Table 2. Perform the test on all the dilutions in duplicate by the Toxinometer. Calculate mean Tg ($Tg\text{ [mean]}$) for each concentration. Tg 's of 3 or more concentrations of CSE solution must be within the valid Tg range of the JP-RSE standard curve.
 3. Calculate mean $Tg\text{ [mean]}$ of 4 vials for each CSE concentration (ng/mL). Convert ng/mL to EU/mL. Calculate EU/ng. See Tables 3 ~ 5 for a calculation example.
The potency which calculated with the lot of LAL ES-II and CSE is printed on the label as a reference.
- Note : If a LAL lot is changed, the CSE potency test must be repeated because EU/ng of the CSE may be changed.

Table 1. Endotoxin dilution series of JP-RSE

JP-RSE soln. (mL)	H ₂ O (mL)	final JP-RSE conc. (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
1.0 (1.0 EU/mL)	3.0	0.25
1.0 (0.25 EU/mL)	3.0	0.0625
2.0 (0.0625 EU/mL)	2.0	0.0313
2.0 (0.0313 EU/mL)	2.0	0.0156
2.0 (0.0156 EU/mL)	2.0	0.0078
2.0 (0.0078 EU/mL)	2.0	0.0039

Table 2. Endotoxin dilution series of CSE

CSE soln. (mL)	H ₂ O (mL)	final CSE conc. (ng/mL)
0.5 (100 ng/mL)	4.5	10
0.5 (10 ng/mL)	4.5	1.0
0.5 (1.0 ng/mL)	4.5	0.1
1.0 (0.1 ng/mL)	3.0	0.025
2.0 (0.025 ng/mL)	2.0	0.0125
2.0 (0.0125 ng/mL)	2.0	0.00625
2.0 (0.00625 ng/mL)	2.0	0.00313
2.0 (0.00313 ng/mL)	2.0	0.00156

CSE calculation example

Table 3. Endotoxin conc. and Tg of JP-RSE

JP-RSE (EU/mL)	Tg (min)
0.0039	53.0 52.6
0.0078	44.4 44.0
0.0156	37.4 37.0
0.0313	29.6 29.4

$$\log (\text{Tg (min)}) = -0.276 \log (\text{JP-RSE conc. (EU/mL)}) + 1.061$$

$$r = -0.9973$$

Table 4. CSE conc. (ng/mL) and 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 Potency

CSE (ng/mL)	Tg [mean] (min)	Potency (EU/mL)	Potency (EU/ng)
0.00156	50.2	0.0049	3.14
0.00313	41.5	0.0097	3.10
0.00625	32.6	0.0231	3.71
0.0125	26.7	do not use	do not use
0.025	21.5	do not use	do not use

Calculated EU [mean] 3.32 (EU/ng)

500 (ng/vial) × 3.32 (EU/ng) = 1660 (EU/vial)

Round to 3 significant digits

Therefore CSE potency is 1700 (EU/vial).

[References]

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 Pharmacopeia 41st Edition*, U.S. Pharmacopeial Convention Inc.
4. The Japanese Pharmacopoeia, Eighteenth Edition (2021).
5. Kakinuma, J., Asano, T., Torii, H. and Sugino, Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434 (1981).
6. Nakamura, T., Morita, T., Hiranaga, M., Miyata, T., and Iwanaga, S. : *Nihon Saikinjaku Zasshi*, **38**, 781 (1983). Japanese.
7. 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 Westphal, O. p.365 Verlag Chemie (1984).
8. 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).
9. Westphal, O., Luderiz, O., Eichenberger, E. and Keiderling, W. : *Z. Naturforsch.*, **7b**, 536 (1952).
10. Akama, K., Kuratsuka, K., Homma, R., Kanoh, S., Niwa, M., Iwanaga, S. and Nakahara, C. : *Bacterial Endotoxin*, Eds. Homma, J.Y. et al., p.395, Verlag Chemie (1984).
11. Tsuchiya, M., Takaoka, A., Tokioka, N., and Matsuura, S. : *Nihon Saikinjaku Zasshi*, **45**, 903 (1990). Japanese.
12. Oishi, H., Hatayama, Y., Shiraishi, H., Yanagisawa, K., and Sakata, Y. : *Yakugakuzasshi*, **105**, 300 (1985). Japanese.
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).

Manufactured by
FUJIFILM Healthcare Manufacturing Corporation

2613-2, Ogohara, Komono-Cho, Mie-Gun, Mie 510-1222, Japan

Distributed by
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://fwk.fujifilm.co.jp>

Group Companies



Distributors



エンドトキシン検出用
Limulus ES-II Single Test Wako 0.015
リムルス ES-II シングルテストワコー 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輸液、注射薬、医療器具類からエンドトキシンが体内に入ると発熱やショックなどの重篤な症状をひき起すため、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。

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検体 0.2mL 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。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おり、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と対比して検定した力価を表示しております。

【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、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°C) 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 LAL 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 LAL 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、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¹¹⁾。

ゲル化法では、LAL 試薬と検体を混合し、37°C、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。

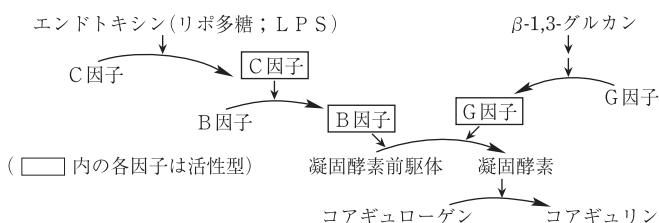


図 1. カブトガニ体液凝固のカスケード機構

【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） 25 バイアル (0.2mL 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測定。
* 2 ~ 10°C 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°C 保存 *

【使用方法】

A. ゲル化法で測定する場合

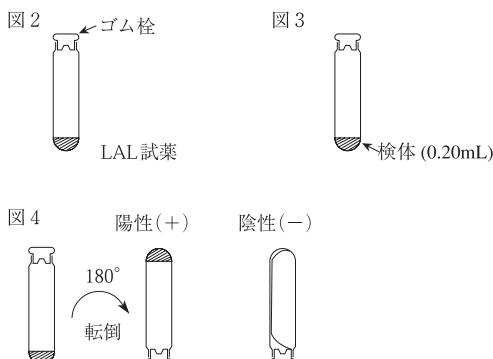
I. 使用器具及び用意するもの

1. ピペット (0.2mL, 0.5mL, 2.0mL, 5.0mL 用)
2. 希釈用試験管（アルミキャップ付き）
3. ブロックヒーター
または反応中の試験管が振動しない恒温槽 (37 ± 1°C)
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す。）
注) 以下の操作には試験管、ピペットなどの器具は 250°C 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や吸着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. 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攪拌した後、ボルテックスミキサーで約 2 分間激しく攪拌して下さい。溶解後は 2 ~ 10°C 保存して 1 ヶ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攪

- 拌して下さい。
2. エンドトキシンの希釈及び試料の pH 調製・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搅拌します。1段階の希釈で10倍をこえる希釈はしないで下さい。0.2mLの試料溶液でLAL ES-II 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で6.0から8.0になるように調製して下さい。
3. 検体の添加及び反応
必要な本数のLAL ES-II 試薬をラックに並べゴム栓を緩めておきます。(図2)もし、LAL 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 試薬がゴム栓に付着している程度では試験の結果に影響ありません。
これに検体を0.2mLずつ加え再びゴム栓をしてボルテックスミキサーで5秒間搅拌し、LAL ES-II 試薬が充分溶解したことを確認した後、 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で60±2分間静置加温します。(図3)
4. 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形しない場合を陽性、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。0.2mLの試料溶液でLAL ES-II 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を上記の範囲に調製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($1/4\lambda \sim 2\lambda$, λ は表示感度)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 200λ 溶液を $50\mu\text{L}$ 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 $1/4\lambda$ 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 $1/4\lambda \sim 2\lambda$ 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、再度同様の試験を行って下さい。
 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 $1/2\lambda$ 以上 2λ 以下であれば、試料はその濃度で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 ES-II試薬の表示感度の2倍濃度になるように（ 2λ ）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）
- ・エンドトキシンの希釈溶液（ 2λ ）（陽性コントロール）
- ・試料溶液
- ・試料溶液に終濃度がLAL試薬の表示感度の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、陽性コントロールおよび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試薬の表示力値（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. 比濁時間分析法（トキシノメーター）^{12), 13), 14)} で測定する場合

1. 試薬の調製

試薬の調製の項目の記載に従って試薬の調製を行います。

2. トキシノメーター[®]の推奨測定条件

測定温度	37°C
しきい値	94.9%
カウント	3
ウェイトタイム ^{*1}	5分
測定時間 ^{*2}	60分

*1：高濃度の測定を行う場合は、ウェイトタイムの短縮と1カウント目を反応時間とすることをお勧めします。

*2：測定するエンドトキシン濃度により任意に変更できます。

3. 測定手順

- 1) 必要な本数の LAL ES-II 試薬を箱から取り出します。
- 2) LAL ES-II 試薬をラックに並べゴム栓を緩めておきます。
- 3) 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ありません。
- 4) バイアルからゴム栓をゆっくりとはずします。ゴム栓をはずして代わりにアルミキップを使用することもできます。
- 5) 試料を 0.2mL ずつ LAL ES-II 試薬に加えます。
- 6) ゴム栓あるいはアルミキップをします。
- 7) ポルテックスミキサーで 5 秒間、攪拌し溶解させます。溶け残りがない事を確認します。
- 8) 試験チューブをトキシノメーター[®]に挿入し、測定します。

4. 検量線とデータ解析

標準エンドトキシンから得られたゲル化時間を用いて検量線を作成し、試料のゲル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 軸にはゲル化時間の対数あるいは二回対数が使用できます。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。検量線範囲が広い場合はゲル化時間の二回対数や二次式回帰を用いることで検量線のフィッティングの向上が期待できます。

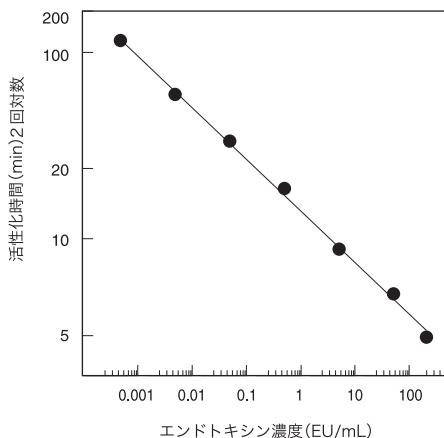


図 2. 本品とトキシノメーター[®]を用いたエンドトキシンの分析例
広い濃度範囲で高い相関の検量線が得られています。

【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、これらへの試薬の混入には十分ご注意下さい。

【付録 CSE の EU 表示値の決定方法（参考）】

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倍希釈系列を表1の様に作成して、0.0039～0.0313EU/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。
次にlog (JP-RSE濃度 (EU/mL))とlog (Tg (min))の直線回帰式 $\log (Tg (min)) = A \log (JP-RSE 濃度 (EU/mL)) + B$ (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について表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の有効範囲に入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、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表3～5の実施例を参照して下さい。）
*ただし使用するLAL ES-II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 ES-II試薬で検定した力価が参考値として表示してあります。

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 (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
1.0 (1.0EU/mL)	3.0	0.25
1.0 (0.25EU/mL)	3.0	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
2.0 (0.0078EU/mL)	2.0	0.0039

表2 CSEの希釈系列

CSE 溶液 (mL)	H ₂ O (mL)	CSE 終濃度 (ng/mL)
0.5 (100ng/mL)	4.5	10
0.5 (10ng/mL)	4.5	1.0
0.5 (1.0ng/mL)	4.5	0.1
1.0 (0.1ng/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

表3 JP-RSE の濃度 (EU/mL) と Tg (min)

JP-RSE (EU/mL)	Tg (min)
0.0039	53.0 52.6
0.0078	44.4 44.0
0.0156	37.4 37.0
0.0313	29.6 29.4

$$\log (\text{Tg (min)}) = -0.276 \log (\text{JP-RSE conc. (EU/mL)}) + 1.061$$

$$r = -0.9973$$

表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

表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	0.0049	3.14
0.00313	41.5	0.0097	3.10
0.00625	32.6	0.0231	3.71
0.0125	26.7	使用しない	使用しない
0.025	21.5	使用しない	使用しない

平均 EU 換算係数 3.32 (EU/ng)

500 (ng/vial) × 3.32 (EU/ng) = 1660 (EU/vial)

十の位を四捨五入します。

従ってこの例では CSE の力価は 1700 (EU/vial) となります。

【参考文献】

- Bang, F.B. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **98**, 325 (1956).
- Levin, J. and Bang, F. B. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **115**, 265 (1964).
- The United States Pharmacopeia 41st Edition, U.S. Pharmacopeial Convention Inc.
- 第十八改正日本薬局方 (2021).
- Kakinuma, J., Asano, T., Torii, H. and Sugino, Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434 (1981).
- 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).
- 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).
- 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).
- Westphal, O., Luderiz, O., Eichenberger, E. and Keiderling, W. : *Z. Naturforsch.*, **7b**, 536 (1952).

10. Akama, K., Kuratsuka, K., Homma, R., Kanoh, S., Niwa, M., Iwanaga, S. and Nakahara, C. : *Bacterial Endotoxin*, Eds. Homma, J.Y. et al., p.395, 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, 畠山泰道, 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

**富士フィルムヘルスケア
マニュファクチャリング株式会社**
三重県三重郡菰野町大字大強原2613-2

販売元

富士フィルム 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

2503KA3