

Kinetic-QCL[®]
Limulus Amebocyte Lysate (LAL)
U.S. License No.1775
カタログ番号:50-650U

注意:試験を実施される前に必ずよくお読み下さい

使用目的

この製品はヒト及び動物の非経口薬、生物製剤、医療機器に関する最終製品の *In Vitro* エンドトキシン試験に使用するために作られています。本製品は臨床検体中のエンドキシンの検出またはヒト疾患の診断には使用できません。このテストは光学的にエンドトキシンを検出するために、Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 試薬およびインキュベーター付の光度計と然るべきソフトウェアを使用します。

1987年12月、アメリカ合衆国食品医薬品局(FDA)は「ヒト及び動物の非経口薬、生物製剤、医療機器に関する最終製品のエンドトキシン検査としてのLALテストの検証のためのガイドライン」を発行しました。このガイドラインは、1) 医薬品及び医療機器のためのエンドトキシン規格値を確立、2) 最終製品のエンドトキシンテストとしてのLALの使用の妥当性確認、3) ルーティン試験手順の作成、にあたりFDAが必要と考える手順、の概要をまとめたものです。

この説明書に述べられる手順はそのFDAガイドラインに従うものです。カイネティック比色法における同様の性能要求規定は米国薬局方で公表され定期的に更新されています⁹。

警告

*In Vitro*検査のみに使用するための製品です。ヒトのエンドトキシン血症の *In Vitro* 診断には使用しないで下さい。LAL試験はFDAによるヒト及び動物の非経口薬、生物製剤、医療機器の最終製品試験のガイドラインに沿って使用された場合、USPのウサギを用いたパイロジェン試験の代用とすることができます。

背景

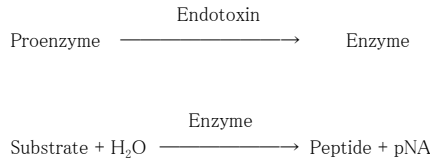
Kinetic-QCL[®]はグラム陰性細菌のエンドトキシンを検出する定量的カイネティック測定方法です。検体はLAL/基質試薬と混合後インキュベーターつき吸光度計に設置され、時間の経過に伴う黄色の出現は自動的に測定されます。黄色が現れるまでの時間(反応時間)は存在するエンドトキシンの量に反比例します。つまり、大量のエンドトキシンの存在下では反応時間は短く、少量のエンドトキシンの存在下では反応時間は長くなります。未知の検体中のエンドトキシン濃度は検量線から算出することができます。

エンドトキシン検出におけるリムルス試験の使用は、アメリカカプトガニ (*Limulus polyphemus*) がグラム陰性細菌に感染すると致命的な血管内凝固を引き起こすというBang¹の観察から発展したものです。その後LevinとBang^{2,3}はこの

凝固は、エンドトキシンとカプトガニの体内を循環するアメーバ細胞(amebocyte)の凝固タンパクとの反応であると立証しました。カプトガニの血液に適した抗凝固剤の開発に成功した後、LevinとBang⁴はエンドトキシンの存在に対して非常に高い感度を示すアメーバ細胞(amebocyte)水抽出物のライセートを調整しました。Solum^{5,6}とYoung、LevinとPrendergast⁸のグループはLALから凝固タンパクを精製してその特性を明らかにし、エンドトキシンと酵素反応を起こすことを示しました。

このLAL比色法は、LAL エンドトキシン反応の初期部分を利用し活性化された酵素が発色基質に働き、p-ニトロアニリン(pNA)を遊離し、黄色の色を発するものです。

原理



グラム陰性細菌のエンドトキシンはLAL中のある酵素前駆体の活性化を触媒させます。活性化の初期速度は存在するエンドトキシンの濃度によって決定されます。活性化された酵素は無色の基質 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA から pNA が遊離されるのを触媒します。遊離された pNA はインキュベーション時間を通して 405 nm で測定されます。検体中のエンドトキシン量は、その反応時間を既知量のエンドトキシンを含んだスタンダード溶液の反応時間と比較して算出されます。

キットに含まれる試薬と保存条件

Kinetic-QCL[®] Reagent ——— 8 バイアル

各バイアルにはアメリカカプトガニ (*Limulus polyphemus*) の体内を循環するアメーバ細胞(amebocyte)由来のライセートと発色性基質の混合物を凍結乾燥させたものが入っています。使用の直前に各バイアルを2.6 mlのLAL試験用水で溶解して下さい。もし複数のバイアルの使用を必要とする場合は、内容物をプールしてからご使用下さい。泡立つのを避けるために穏やかにバイアルを回して下さい。凍結乾燥されたKinetic-QCL[®] Reagentは2~8°Cで保存して下さい。長時間光に晒すのは避けて下さい。溶解されたKinetic-QCL[®] Reagentは直ちに使用して下さい。溶解されたKinetic-QCL[®] Reagentは2~8°Cで8時間安定です。溶解された試薬は-10°C以下で最長2週間保存可能です。凍結・融解は一回のみ可能です。

E. coli O55:B5 Endotoxin ————— 2 バイアル

各バイアルには50~200 EUの凍結乾燥されたエンドトキシンが入っています。溶解液量は各キットのCertificate of Analysis(COA、試験成績表)に記載されており、溶解後50 EU/ml(もしくはIU/ml)になるように計算されています。COAで指定された液量のエンドトキシン試験用水で溶解してボルテックスの高スピードで最低15分は攪拌して下さい。液量はロットごとに異なります。使用の前には必ず室温に戻し15分強く攪拌して下さい。エンドトキシンはガラスに付着しやすいのでこれは重要です。

凍結乾燥状態のE. coli O55:B5 Endotoxinは2~8°Cで冷蔵して下さい。溶解後のエンドトキシンは2~8°Cで4週間安定です。

このエンドトキシンはユーザーの利便性のために提供されるものです。他のエンドトキシンをスタンダードとして使用することも可能ですが、その場合そのエンドトキシンの比色法における性能をReference Standard Endotoxin(RSE、エンドトキシン標準品)を基準として決定する必要があります。

COAは下記のページよりはダウンロードしてください。
http://www.lonza.co.jp/products/endotoxin/exam_rec_ord.html

LAL Reagent Water ————— 3 バイアル(各 30 ml)

Kinetic-QCL[®] Reagent、E. coli Endotoxinの溶解、エンドキシンの溶解、検体の希釈調整に使用されます。LAL試験用水は2~8°Cで保存して下さい。

キット以外に必要な材料及び装置

1. エンドキシンプリーの希釈用ガラス試験管(13X100mm, N207か同等のもの)
2. 個別包装されたメスピペット
3. 自動ピペットと個別包装もしくはラック入りのエンドトキシン試験用チップ
4. 使い捨ての無菌マイクロプレート。ルーティン使用に先立ち、マイクロプレートが各ライセートのロットについて、下記の「パフォーマンス特性」に記述されている直線性の基準を満たしているかの確認が必要
5. 試薬リザーバー(ロンザ製品25-364か同等のもの)
6. 8チャンネルピペッター
7. 検体のpH調整が必要であれば、0.1N水酸化ナトリウム溶液もしくは0.1N塩酸溶液を必要に応じて使用する
8. マイクロプレートリーダー(ELx808™ ロンザ米国カタログ番号25-315)
9. WinKQCL[®]ソフトウェア
10. タイマー及びボルテックス

検体の採取及び調整

微生物またはエンドトキシンにより汚染されないように注意して下さい。検体または試薬に接触する器具は全てエンドキシンプリーでなければなりません。清潔なガラス器具を250°Cで30分間乾熱処理を行うと、エンドキシンプリーになります。適切な予防措置を取り、二次的な環境汚染から脱パイロジェン化した器具を保護して下さい。

経験上、滅菌個別包装プラスチックピペット及びビペットチップのほとんどはエンドキシンプリーですが、通常使用する前に試験して下さい。

エンドキシンプリーの水酸化ナトリウムまたは塩酸を使用して、検体のpHを6.0~8.0の範囲に収まるよう調整する必要がありますが、必ず検体の一部を取り分けてpHを測定し、検体全体がpHメーターの電極によって汚染されないようにして下さい。非緩衝液のpHは調整しないで下さい。

試験される検体は、全細菌活性が停止するように保存されなければなりません。そうしないと、時間の経過とともにエンドキシン値が上昇する可能性があります。例えば、検体を2~8°Cで保存する場合、その保存時間は24時間未満とし、24時間以上保存する場合は凍結して下さい。

もしKinetic-QCL[®]試薬を溶解する希釈液の容器が開封済みあるいはロンザ製品でない場合は、希釈液単独でエンドトキシン汚染の試験を実施して下さい。

Kinetic-QCL[®]アッセイの種類

Kinetic-QCL[®]アッセイによるカイネティック比色法試験にはインキュベーター付マイクロプレートリーダーとWinKQCL[®]ソフトウェアをご使用下さい。マイクロプレートリーダーとWinKQCL[®]の操作方法を理解しておくことが重要です。より詳しい情報についてはそれぞれの操作説明書をご参照下さい。

Kinetic-QCL[®]アッセイには4種類の基本的な試験タイプがあり、それぞれLAL試験の異なる特性に対応するものです。

1. 一般試験(ROUTINE)

一般試験とは未知濃度のエンドトキシンを既知のエンドトキシンスタンダードと比較して計算するものです。一般試験の一部として、製品によるエンドトキシン反応の阻害あるいは促進を調べる目的で、陽性コントロール(Positive Product Control, PPC)を含むオプションもあります。PPCは既知のエンドトキシンをスパイクとして検体に加えたものです。WinKQCL[®]ソフトウェアが自動的にPPCの回収量を計算します。

2. 阻害/促進試験(INHIBITION/ENHANCEMENT)

LAL反応は酵素反応であるため、最適なpH範囲と特定の塩および2価の正イオンの条件を必要とします。時として検体がそのような最適な条件を変えてしまい、ライセートがエンドトキシンに反応しないことがあります。LAL反応を阻害する検体による陰性結果は必ずしもエンドトキシ

ンが存在しないことを意味するものではありません。

阻害/促進試験は製品をどの程度まで希釈すれば阻害や促進を克服できるかを決定するための試験です。検体の希釈は陽性コントロール(Positive Product Control、PPC)を伴う必要があります。既知のエンドトキシン添加量(スパイク)と比較するために、WinKQCL®ソフトウェアがPPCの回収量を計算します。この方法により、製品をどの程度まで希釈すればLAL反応の阻害が生じないか決定することができます。

3. エンドトキシン力価試験(RSE/CSE)

エンドトキシン力価試験はエンドトキシン標準品(Reference Standard Endotoxin、RSE)を基準としてキットに含まれるエンドトキシン(Control Standard Endotoxin、CSE)の力価を決定するための試験です。

試験にはRSEの希釈系列一系列とCSEの希釈系列一系列以上が必要です。WinKQCL®ソフトウェアが自動的に平均的な活性値をEU/ng又はEU/mlの単位で算出します。EUやng以外の単位を入力するオプションもあります。

4. 初期品質確認試験(INITIAL QUALIFICATION)

初期品質確認試験はFDAの「ヒト及び動物の非経口薬、生物製剤、医療機器に関する最終製品のエンドトキシン検査としてのLALテスト検証のためのガイドライン」⁷に記述されている必要条件に基づいてデザインされています。この試験は分析者の初期資格認定及び再認定の一部として必要であり、またKinetic-QCL®の新しいロット毎に実施されるべきものです。

初期品質確認試験はエンドトキシスタンダードの各ポイントのlog(エンドトキシン濃度) vs. log(反応時間)の相関を使用します(注:濃度ごとに平均しません)。他の試験では各濃度の平均の反応時間を使用します。

初期品質確認試験では検体の試験は行いません。

試薬の調整

使用前に試薬を常温に戻してください。

未知濃度のエンドトキシンを測定するためには、有効な検量線がKinetic-QCL®試験毎に必要です。

測定できるエンドトキシン濃度範囲が広い場合、検量線を作成するためのエンドトキシスタンダードの濃度を調整することにより定量範囲を調節することが可能です。最低3濃度のスタンダードが必要とされます。

Kinetic-QCL®は0.05 EU/ml~50 EU/mlの範囲で直線性を示すように最適化されています。ただし、各ユーザーは特定の製品の必要条件に応じて検量線を短くすることも可能です。比色法LAL試験の検量線を短縮することにより検体のエンドトキシン値がより正確に予測されるかもしれないというデータが出ています。ユーザーは製品検体の一般試験のために比色法LAL試験の検量線範囲を確立する前に、FDAがカイネティックLAL法のために定めた暫定的なガイダンス¹⁰の必要条件に通じていることが推奨されます。

以下の表はキットに含まれるエンドトキシンから希釈系列を作成するための案です。全ての希釈濃度を検量線に使う必要はありません。他の希釈方法を用いることもできますし、キットに含まれているものとは異なるエンドトキシンを使用することも可能です。もしキットに含まれているもの以外のエンドトキシンを使用する場合は、FDAのガイドラインに従いエンドトキシン力価試験を実施してCSEの活性を決定することが必要となるかもしれません。⁷

エンドトキシン濃度(EU/ml)	LAL試験用水の量	LAL試験用水に加えるエンドトキシン溶液の量
5	0.9 ml	50 EU/ml を 0.1 ml
0.5	0.9 ml	5 EU/ml を 0.1 ml
0.05	0.9 ml	0.5 EU/ml を 0.1 ml
0.005	0.9 ml	0.05 EU/ml を 0.1 ml

1. 50 EU/ml のエンドトキシンスストック溶液 0.1 ml を 0.9 ml の LAL 試験用水に加えて 5 EU/ml エンドトキシン溶液を調整します。次のステップに進む前にこの溶液をボルテックスで強く 1 分以上攪拌して下さい。
2. 上記の 5 EU/ml のエンドトキシン溶液 0.1 ml を 0.9 ml の LAL 試験用水に加えて、これを 0.5 EU/ml エンドトキシン溶液とします。次のステップに進む前にこの溶液をボルテックスで強く 1 分以上攪拌して下さい。
3. 上記の 0.5 EU/ml のエンドトキシン溶液 0.1 ml を 0.9 ml の LAL 試験用水に加えて、これを 0.05 EU/ml エンドトキシン溶液とします。次のステップに進む前にこの溶液をボルテックスで強く 1 分以上攪拌して下さい。
4. 上記の 0.05 EU/ml のエンドトキシン溶液 0.1 ml を 0.9 ml の LAL 試験用水に加えて、これを 0.005 EU/ml エンドトキシン溶液とします。次のステップに進む前にこの溶液をボルテックスで強く 1 分以上攪拌して下さい。

試験方法

WinKQCL®ソフトウェアとマイクロプレートリーダーの操作に関する更に詳しい情報については、マイクロプレートリーダーとソフトウェアのマニュアルを参照して下さい。

1. 試験のためのテンプレート(TEMPLATE)を作成して下さい。テンプレートには分析者の名前、アッセイの種類、試薬のロット番号、エンドキシスタンダードの数と濃度、N 数、マイクロプレート上のスタンダードと検体の配置の情報が必要です。
 2. アッセイの種類(Type of Assay)は **KQCL** を指定して下さい。初期設定のテンプレートのパラメーターは以下の通りであり、事前の確認なしに変更はしないで下さい。
- | | |
|-------------------------|-----|
| Delta t (seconds) | 150 |
| Measurement Filter (nm) | 405 |
| Delta mOD | 200 |
| Number of Reads | 40 |

3. スタンダード及び検体をマイクロプレートに分注する際のガイド用にテンプレートを印刷して下さい。
4. WinKQCL®の指示に沿ってテンプレートを実行("Run")して下さい。
5. 注意深くブランク(LAL 試験用水)、エンドトキシスタンダード、製品検体、陽性コントロール(下記の「製品による阻害」を参照)などを 100 µl ずつマイクロプレートの適切なウェルに分注して下さい。
6. プレートをリーダーに設置して蓋を閉じて下さい。Kinetic QCL®リーダーを使用する場合は、インキュベーション室にプレートを送るためにUPキーを押して下さい。
7. 37°C±1°Cで 10 分間以上プレートを前加温して下さい。
8. 前加温が終わりに近づいたら、必要なKinetic-QCL® ReagentをLAL Reagent Water(1 バイアルにつき 2.6 ml)で溶解して下さい。穏やかにただし十分混合して下さい。
9. 試薬をリザーバーにプールし、リザーバーを穏やかに揺らして攪拌して下さい。
10. Kinetic-QCL®リーダーを使用する場合は、蓋を開け、DOWNボタンを押してマイクロプレートをインキュベーション位置から取り除いて下さい。
11. 8チャンネルのマルチピペッターを使って最初の列(A1~H1)から全てのウェルにKinetic-QCL® 試薬を 100 µL ずつ分注して下さい。できるだけ手早く試薬を加えて下さい。泡が立つのを避けて下さい!
12. 直ちにダイアログボックスの OK ボタンを押して試験を開始して下さい。

注意: Kinetic-QCL®試験はマイクロプレートの蓋を外したまま行って下さい。

パフォーマンス特性

直線性

エンドトキシン量を決定する濃度範囲の検量線の直線性の検証が必要です。希望する濃度範囲を含む最低3濃度以上のエンドキシスタンダードおよびブランクとしてのLAL試験用水を、初期品質確認試験のテストパラメーターに従い最低N=3で測定して下さい。検量線範囲の濃度の桁ごとにスタンダードを追加して下さい。算出された検量線の相関係数(r)の絶対値は≥0.980でなければなりません。

再現性

優れた技術と小さな変動係数(C.V.)を確立するために、同じ検体を複数回(N)で測定する必要があります。変動係数(C.V.)は反応時間の「サンプル」標準偏差を平均で割ったものに等しく、通常%で表記されます。同一検体のNのC.V.(%)は10%以下でなくてはなりません。経験があれば、3~4%程度が得られる筈です。

エンドトキシン濃度の計算

アッセイを通して、マイクロプレートリーダーおよびWinKQCL®ソフトウェアはマイクロプレートの各ウェルの405 nmにおける吸光度をモニターします。リーダーは各ウェルの最初の吸光度をブランクとして、吸光度が0.200増加するまでの時間を測定します。この時間は**反応時間(Reaction Time)**と呼ばれます。WinKQCL®が自動的に各スタンダードの反応時間とそれに対応するエンドトキシン濃度のlog/log線形相関を計算します。検量線のパラメーターはレポートに表示されます。もし相関係数の絶対値が(r) ≥ 0.980であれば、検量線構築に多項モデルを使用して検体のエンドトキシン濃度を予測することが可能です。この多項曲線モデル(POWERCURVE™)はWinKQCL®に含まれている機能です(以下のPOWERCURVE™の項参照)。

直線回帰

以下の情報はWinKQCL®がどのようにlog/log直線相関を実施し未知量の検体中のエンドトキシン濃度を計算するかの一例です。これらの計算を別途行う必要はありません。各製品の各検体について、WinKQCL®は検体の反応時間から対応するエンドトキシン濃度を計算します。ソフトウェアは製品の希釈に配慮して自動的に最終TEST RESULTSを調整します。

直線相関

スタンダード	濃度 (EU/ml)	計算例 平均反応 時間(秒)	Log[濃度]	Log[平均 反応時間]
陰性				
コントロール	-----	無反応	-----	-----
S1	0.005	4351	-2.301	3.639
S2	0.05	2496	-1.301	3.397
S3	0.5	1406	-0.301	3.148
S4	5.0	895	0.699	2.952
S5	50.0	561	1.699	2.749
検体				
1	-----	1576	-----	3.198
2	-----	943	-----	2.975

計算式については英語の使用説明書の p.11~12を参照。

POWERCURVE™

もし相関係数の絶対値が(r) ≥ 0.980 であれば、多項モデルを用いて検量線を作成して検体のエンドトキシン濃度を予測することができます。この多項モデル(POWERCURVE™)は、検量線領域全体(5 log)においてエンドトキシン濃度をより正確に予測します。POWERCURVE™の使用にはWinKQCL®が必要です。

POWERCURVE™を使用する場合、検量線は多項方程式を定義するためにlog₁₀[反応時間]とそれに対応するlog₁₀[エンドトキシン濃度]を用いて作成されます。回帰曲

線を作成するために使用される多項方程式の次数はアッセイのエンドトキシンスタンダードの数によって決定されます。多項次数は常にエンドトキシンスタンダードの数よりも一つ少なくなります。最大ではスタンダード数が 5 かそれ以上のアッセイで 4 次多項式となり、最低ではスタンダード数 3 のアッセイで 2 次多項式となります。

これらの多項方程式はWinKQCL®のPOWERCURVE™を使用すれば容易に解くことができます。以下は上記の表のデータセットを用いた多項方程式の解を求めた例です。

多項(POWERCURVE™)モデル

$$Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$$

$$A = 3.08374$$

$$B = -0.20432$$

$$C = 0.02894$$

$$D = -0.00596$$

$$E = -0.00503$$

検量線のパラメーターはレポート上に表示されます。WinKQCL®は各検体の反応時間から対応するエンドトキシン濃度を計算します。ソフトウェアは自動的に製品の希釈を考慮して最終のTEST RESULTSの値を算出します。

POWERCURVE™多項モデルは初期品質確認試験(INITIAL QUALIFICATION)には使用できないことにご注意下さい。FDAガイドラインに準拠する場合には直線回帰の使用が必要です。加えて、POWERCURVE™多項モデルはロンザ社製品のKinetic-QCL®とPYROGENT®-5000 試薬にのみ評価済みです。

製品による阻害

製品中の物質がLAL反応を阻害することがあります。Kinetic-QCL®試験の場合、この阻害反応は反応時間を延長し、実際に検体中に存在するよりも少ないエンドトキシン量を示すこととなります。各検体において、原液もしくは適切に希釈し、反応阻害がないことを確認する必要があります。

製品による反応阻害がないことを確認するには、検体(または検体の希釈物)の一部に既知量のエンドトキシンを添加します。添加するエンドトキシン量が最終的に 0.5 EU/ml になるように、検体に加えることをお奨めします。もし検体自身が 1.0 EU/ml 以上のエンドトキシンを含んでいる場合は、添加されるエンドトキシン量が最終的に 5.0 EU/ml になるように加えることをお奨めします。

阻害/促進試験(INHIBITION/ENHANCEMENT)において、スパイク溶液(PPC)を添加された検体はスパイク溶液を添加されない検体とともに測定され、各検体のエンドトキシン濃度及び添加されたエンドトキシンの回収量は自動的に計算されます。エンドトキシンの回収量は添加された既知量スパイクの 50~200%以内でなければなりません。¹⁰ スパイク溶液が添加された検体(またはその希釈物)は以下の方法のいずれかで調整することができます。

試験管を用いる方法:

4.95 ml の検体(またはその希釈物)に 50EU/ml のエンドトキシン溶液 50 μ l 加えます。この検体(またはその希釈物)は 0.5 EU/ml のエンドトキシンを含んでいます。使用前に 1 分間強くボルテックスにかけて下さい。

プレートを用いる方法(1):

WinKQCL®のAssay Templateに従い、5 EU/mlのエンドトキシン溶液 10 μ l を 96 穴マイクロプレートの各PPCウェルに加えて下さい。それらのウェルに 100 μ l の検体(またはその希釈物)を加えて下さい。これで各ウェルは 0.5 EU/ml のエンドトキシンを含んでいることとなります。穏やかに混合して下さい。

プレートを用いる方法(2):

WinKQCL®のAssay Templateに従い、96 穴マイクロプレートの各PPCウェルに検体(またはその希釈物) 100 μ l を加えて下さい。それらのウェルに 5 EU/mlのエンドトキシン溶液 10 μ l を加えて下さい。これで各ウェルは 0.5 EU/ml のエンドトキシンを含んでいることとなります。穏やかに混合して下さい。

もし検体(またはその希釈物)がこのKinetic-QCL®試験を阻害することがわかった場合、検体は阻害がなくなるまで更なる希釈を必要とするでしょう。

阻害を示さない希釈の決定の例

検体の希釈	エンドトキシンの回収量
1/10	0.125 阻害あり
1/20	0.212 阻害あり
1/40	0.550 阻害なし

はじめに検体を 10 倍単位の希釈系列で試験するとよいでしょう。阻害を生じないおおよその希釈率が決定されたら、その周辺を 2 倍単位の希釈系列で試験をして、より正確な希釈倍率を求めて下さい。

アッセイ限界と検体調整

LAL 反応の阻害と促進の程度は製品の濃度によります。同じ製品をいくつかの異なる濃度で測定する場合、それぞれのパフォーマンス特性を確立することが必要となります。

従来のゲル化試験とは異なる阻害や促進の傾向が見られるかもしれません。

阻害を克服するために、エンドキシンフリーの塩酸または水酸化ナトリウムで検体の pH を 6.0~8.0 に調節する必要がありますが、もしありません。

色のついた検体について

各ウェル最初の吸光度がブランクとして採用されるため、色のついた検体でも特別な問題は生じません。もしバックグラウンドの吸光度が ≥ 1.5 AU の場合、検体を希釈して再度アッセイしてください。

保存された検量線について

WinKQCL®に保存されている、既存の検量線を使用してアッセイを行うことが可能です。Kinetic-QCL® Reagent、LAL試験用水、Endotoxinのロットとマイクロプレートリーダーのパラメーターが保存されている検量線を作成した際に使用したものと一致するならば、新しい検量線用のエンドトキシンスタンダードをマイクロプレート上に設ける代わりに、保存されている検量線を利用することができます。

保存されている検量線を利用する場合は、スタンダードコントロールを 1 点、log スケールで保存されていた検量線範囲の中間点をとって、アッセイして下さい。予測された濃度は既知濃度の $\pm 25\%$ 以内でなくてはなりません。

例えば、0.005~50 EU/ml の検量線を用いたアッセイにおいては、0.5 EU/ml のスタンダードコントロールのアッセイが必要です。

log 50	= 1.6990
log 0.005	= -2.3010

log 平均	= -0.3010
Antilog -0.3010	= 0.5

0.01~1 EU/ml の検量線を用いたアッセイにおいては、0.1 EU/ml のスタンダードコントロールのアッセイが必要です。	
log 1.0	= 0.0000
log 0.01	= -2.0000

log 平均	= -1.0000
Antilog -1.0000	= 0.1

他の試験方法との相関

アメリカ合衆国においてはFDAがLAL試験の公式の使用を管理しています。FDAはLAL試験の標準化において大きな支援となる公式のLALとエンドトキシンの調整 品を有しています。FDA 標準 LAL は Kinetic-QCL®法向けに調整されたものではないため、この試験には使用されません。しかしながら、公式のエンドトキシンはこのキットに含まれるエンドトキシンを標準化するために使用されています。異なるエンドトキシンの調整品の活性は従来のゲル化法においても比色法においてもばらつきが見られます。このキットに含まれるエンドトキシンスタンダードはKinetic-QCL®アッセイを用いてFDAエンドキシン標準品(FDA Reference Standard Endotoxin、RSE)と比較され、その活性はCertificate of Analysis(試験成績表、COA)に指定され

た液量で溶解された時に 50 EU/mlになります。このスタンダードから希釈された検量線はRSEにおける 0.005~50 EU/mlの範囲を得ます。しかしながら、従来のゲル化法は 2 倍ごとの希釈により標準化されており、従ってそのばらつきは、標準化が連続的でばらつきが少ない比色法LAL試験に比べると大きくなることにご留意下さい。

アメリカ合衆国以外のお客様へ

各国の監督機関がその司法権に従った他の試験実施基準を設けているかもしれませんが、ご留意下さい。

参考文献

- Bang, F.B. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 98:325 (1956).
- Levin, J. and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265 (1964).
- Levin, J. and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337 (1964).
- Levin, J. and F.B. Bang. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186 (1968).
- Solum, N.O. Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. Thromb. Diath. Haemorrh. 23:170 (1970).
- Solum, N.O. The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. Thromb. Res. 2:55 (1973).
- U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, "Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test As an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices" (1987).
- Young, N.S., J. Levin, and R.A. Prendergast. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. J. Clin. Invest. 51:1790 (1972).
- Chapter <85> Bacterial Endotoxins. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.
- U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, "Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologics" (1991).

特許情報

この製品の構成品は下記の US patent で保護されています。

4322217

4510241

5310657

商標

ELx808™はBioTek Instruments社の商標です。

特別に表記された場合を除いて、ここにおける全ての商標は Lonza グループもしくはその系列のもです。

2008年(平成20年)8月改正

輸入発売元: ロンザジャパン株式会社

東京都中央区新川 2-20-8 協和新川ビル 8 階

電話 03-5566-0612 (代表)

FAX 03-5566-0619

<http://www.lonza.co.jp>

製造元: Lonza Walkersville, Inc

8830 Biggs Ford Road, Walkersville Maryland

<http://www.lonza.com>