

Lonza

PyroGene®

Recombinant Factor C
エンドトキシン検出システム

カタログ番号: 50-658U

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

PyroGene®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* エンドトキシン検査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。

PyroGene®はエンドトキシン感受性タンパク質であるリコンビナント C 因子 (rFC) を利用します。rFC は蛍光性基質と結合して、インキュベーター付蛍光マイクロプレートリーダー、適切なソフトウェアと共にエンドトキシン試験に使用されます。0.01 EU/ml を検出限界とし、0.01~10 EU/ml のエンドトキシン濃度範囲で測定が可能です。

警告

In Vitro 検査のみに使用してください。PyroGene®はヒトあるいは動物のエンドトキシン血症の *In Vitro* 診断、臨床診断、患者管理、血液および血液製品の検査における使用を意図するものではありません。

安全注意事項

このキットに含まれる試薬の毒性については試験されておりません。これらの試薬はアメリカ合衆国 OSHA Hazard Communication Standard 29 CFR 1910.1200 により有害であるとはみなされておられません。通常の実験室の注意事項に加え、リコンビナント DNA 実験における NIH のガイドラインに従うことをお勧めします。

背景

グラム陰性細菌によるアメリカカブトガニ (*Limulus polyphemus*) の感染は、致命的な血管内凝固を引き起こします¹。分子レベルでは、エンドキシンがセリンプロテアーゼを触媒とする凝固カスケードを活性化し、結果としてカブトガニの血液をゲル化させます。このカスケードは *Limulus Amebocyte Lysate (LAL)*^{1, 2, 3, 4} エンドキシン検出試験に利用されています。

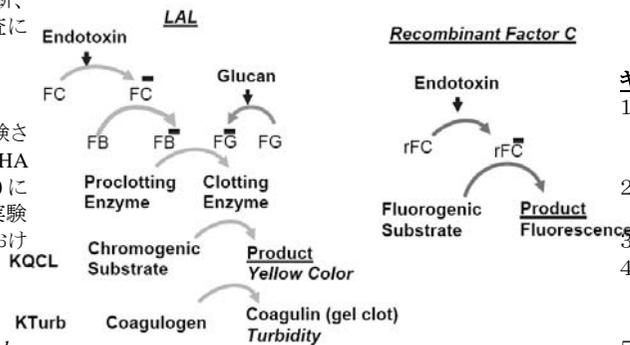
プロテアーゼカスケードおよび従来の LAL 試験の原理は Figure 1 の LAL 経路に図解されています。カスケードの最初の成分である C 因子は、エンドキシンの結

合によって活性化されるプロテアーゼ前駆体です^{5, 6, 7}。この経路で B 因子が C 因子により活性化されます。もう一つの経路である G 因子 (FG) 経路はグルカンの結合によって活性化されます⁸。下流では、C 因子経路と G 因子経路はそれぞれ proclotting enzyme を clotting enzyme へ活性化します。比色 LAL アッセイ (Lonza の Kinetic-QCL®、KQCL) は clotting enzyme によって切り離される合成の発色性ペプチド基質を利用し、黄色く発色します。比濁法 (Lonza の PYROGENT®-5000) は LAL 中に存在する基質 coagulogen を利用します。Coagulogen は切り離されると coagulin になります。coagulin は互いに結びつき、その結果濁度が上昇します。

比色法における黄色の濃さ (OD 405 nm) と比濁法における濁度 (OD 340 nm) はエンドキシンの濃度と比例します。

C 因子がエンドトキシンを選択的に認識してプロテアーゼカスケードを活性化することが研究で示されています。エンドトキシンに特異的なアッセイを作成するために、C 因子は精製されクローンされました^{5, 6, 7, 9, 10, 11}。エンドキシンの結合により活性化されると、リコンビナント C 因子はアッセイ混合液中の蛍光性基質に作用して、検体中のエンドキシン濃度に比例する量の蛍光シグナルを発生させます。

Figure 1. LAL システムおよび rFC システムにおけるエンドトキシン検出メカニズムの図解



原理

リコンビナント C 因子はエンドキシンの結合により活性化され、活性化された部分は合成基質から蛍光性の化合物を切り離します (Figure 1, rFC 経路)。アッセイは 96 ウェルのプレート上で実施されます。蛍光量は 2 回、①T=0 と②37°C ± 1°C で 1 時間インキュベーション後に、蛍光マイクロプレートリーダーにより excitation/emission wavelength 380/440 nm で測定され

ます。一時間後の蛍光量と T=0 の蛍光量の差 (ΔRFU) は、ブランクの ΔRFU で補正されます。Log 換算された補正後の蛍光量は log 換算されたエンドトキシン濃度と比例し、0.01~10 EU/ml で直線性を示します。検体中のエンドトキシン量は検量線と比較して算出されます。

保存条件

PyroGene® キット ロンザカタログ製品番号 50-658U は 2~8°C で保存して下さい。

キットに含まれる試薬

1. rFC Enzyme Solution, R50-658, 1.2 ml/vial 2 バイアル
2. Fluorogenic Substrate, S50-658, 6.0 ml/vial 2 バイアル
3. rFC Assay Buffer, B50-658, 5.0 ml/vial 2 バイアル
4. *E. coli* Endotoxin, O55:B5, E50-643, 凍結乾燥品 2 バイアル
溶解液量は Certificate of Analysis (COA, 試験成績表)に記載されており、濃度が 20 EU/ml の溶液になるように計算されています。溶解されたエンドトキシンは 2~8°C で 4 週間安定です。
5. LAL 試験用水, W50-640, 30 ml/vial 2 バイアル
これは *E. coli* エンドキシンの溶解、およびエンドトキシンスタンダードと検体の調整、希釈に使用します。

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ガラス試験管 (検体希釈用) (13X100mm, ロンザ製品 N207 か同等のもの)
2. エンドキシンプリーの個別包装されたメスピペット
3. 自動ピペットと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 (ロンザ製品 25-340 か同等のもの)。ルーティン使用に先立ち、基準を満たしている必要がある。
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. 蛍光マイクロプレートリーダー (ロンザ米国カタログ番号 25-344 FLx800™ インキュベーター付蛍光プレートリーダー及び 380/20 の励起フィルターと 440/30 の発光フィルター)
8. WinKQCL®ソフトウェアバージョン 3.0.1 以上
9. タイマー
10. 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 分間加熱すると、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ピ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るかもしれません。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。

試験の検体は、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。

蛍光リーダーの感度設定

蛍光シグナルは通常 Relative Fluorescence Unit (RFU) で測定されます。真の蛍光シグナルは増幅率設定と感度設定で調整できる電子シグナルに変換されるため、RFU は任意の単位です。検出されるシグナルの強さによって、機器の増幅率・感度設定を高くて弱いシグナルを押し上げたり、シグナルが強すぎる場合は増幅率・感度設定を低くして抑えたりすることができます。FLx800™ Reader Operation Manual の Operation Section の製造者の説明をご参照下さい。

PyroGene®アッセイでは、エンドトキシン濃度範囲の 3 x log が RFU 範囲の 3 x log に対応します。もし感度の調整が低すぎる場合は、一番低いスタンダードの蛍光性の測定が難しくなり、また、感度が高すぎる場合、一番高いスタンダードの蛍光値が測定範囲から外れます。アッセイを実施する前に、PyroGene®アッセイの適切な感度を決定することが大切です。FLx800™ は 0 から 99999 までの蛍光範囲を有しています。検量線に 3 x log の 蛍光範囲を確立するために、1 EU/ml スタンダードに 1000~10000 の RFU 範囲が選ばれました。1000~10000 の RFU 範囲は log スケールで 3~4、log 中間点は 3.5 となります。したがって、1 EU/ml のターゲット RFC は 10^{3.5}、約 3000 RFU となります。一般試験においてブランクと一番低いスタンダードを十分区別するには、この値を望ましい範囲の最小値とすべきです。

適切な感度設定の決定方法

注意:この手順は performance qualification(PQ)の一部として、試薬の新しいロット、機器の主要な保守点検(ランプ交換など)の後に、またはリーダーが正しく作動しているかが疑わしいときに実施して下さい。定期的な感度設定の再確認は、通常の機器の保守点検プログラムの一部として推奨されています。

- 1 EU/ml のエンドキシン溶液を調整して下さい(「エンドキシンスタンダードの調整」参照)。試薬は混合する前に室温で安定させて下さい。
- WinKQCL®ソフトウェアで「Other Tests」→「Validation」→「FLx800 Reader」→「Sensitivity Test」を選択し、「New」ボタンをクリックして下さい。
- ブランクの欄に適切な情報を入力し、試験の設定を確認して下さい。

Endotoxin Concentration Unitage	EU
Time Between Reads (hh:mm:ss)	01:00:00
Excitation Filter (nm)	380:20
Emission Filter (nm)	440:30
Reads per Well	4
Delay before reading (millisec.)	150
Optic Position	bottom
Wells to use: Pre-defined	(D6,7; E6,7; F6,7)
Sensitivity (select by checking)	30, 35, 40, 45, 50, 55
- 1 EU/ml のエンドキシン溶液を 100 μl ずつ D6、7; E6、7; F6、7 のウェルに加えて下さい。
- プレートにカバーをして 37°C ± 1°C で 10 分間予備加熱して下さい。
- rFC 酵素溶液、rFC アッセイバッファー、蛍光性基質を 1:4:5 の比率で混合して反応液を調整して下さい。感度試験には 100 μl + 400 μl + 500 μl で十分です。開封後未使用の試薬は冷蔵して下さい。汚染されない限り、開封された試薬のバイアルは冷蔵保存下で 4 週間有効です。適切なアッセイの評価範囲において、試薬は正常に作用します。
注意:試薬を混合する時、順序を一定にしてください。まずバッファーと基質を最初に混ぜ、酵素を最後に加えて下さい。十分に、ただし穏やかに混合して下さい。ボルテックスにはかけないで下さい。
注意:混合後の反応液の保存はできません。

7. ソフトウェアの指示に従い 100 μl の反応液をエンドキシン検体が入ったウェルに加えて下さい。「OK」をクリックして試験を開始して下さい。
注意:試験中はプレートの蓋をしなさいで下さい。

8. 試験が終了すると試験結果の概要と計算された感度が表示されます。直線相関を用いて、 $\log \Delta \text{RFU} = 3.5$ に相当する感度値が一番近い整数にまとめられます。この設定を最小値として使用すればアッセイは成功するはずです。「Analyst」と「Reviewer」の両者が電子署名をし、レポートを印刷して下さい。

決定された感度設定: _____

キットのロット番号: _____

エンドキシンスタンダードの調整

未知の検体中のエンドキシン濃度を計算するためには、各 PyroGene®試験は有効な検量線に照会されなければなりません。

PyroGene®はかなり広い濃度範囲のエンドキシン値を決定することが可能であるため、検量線を作成する際に使用するエンドキシンスタンダードの濃度を調節して定量範囲を調節することができます。最低 3 濃度のスタンダードが必要です。

PyroGene®アッセイは 0.01 ~ 10 EU/ml の範囲で直線性を示すように最適化されていますが、ユーザーが特定の製品試験の必要条件により検量線を短くすることもできます。

E. coli Endotoxin, O55:B5 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キシンの PyroGene®における性能を現行の Reference Standard Endotoxin (RSE, エンドキシン標準品)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_record.html

キットに含まれる *E. coli* Endotoxin, O55:B5 は 20 EU/ml の原液になるように LAL 試験用水で溶解して下さい。バイアルの各溶解液量は Certificate of Analysis (COA, 試験成績表)に記載されており、溶解時の濃度が 20 EU/ml になるように計算されていますので、そ

の指定された液量の LAL 試験用水で溶解して下さい。ボルテックスの高スピードで最低 15 分間は強く攪拌して下さい。保存した溶解液を後日使用する場合、使用前に溶液を室温に戻して 15 分間強く攪拌して下さい。

以下の表は、キットに含まれるエンドキシンから希釈系列を作成する案を示したものです。

エンドキシン濃度 (EU/ml)	LAL 試験用水の液量	LAL 試験用水に加入するエンドキシンスタンダードの量
10	0.5 ml	20 EU/ml を 0.5 ml
1	0.9 ml	10 EU/ml を 0.1 ml
0.1	0.9 ml	1 EU/ml を 0.1 ml
0.01	0.9 ml	0.1 EU/ml を 0.1 ml

- 20 EU/ml のエンドキシン原液 0.5 ml を 0.5 ml の LAL 試験用水に加えて 10 EU/ml のエンドキシン溶液を調整して下さい。次のステップに進む前に最低 1 分間は強くボルテックスして下さい。
- 10 EU/ml のエンドキシン溶液 0.1 ml を 0.9 ml の LAL 試験用水に加えて 1 EU/ml のエンドキシン溶液を調整して下さい。次のステップに進む前に最低 1 分間は強くボルテックスして下さい。
- 1 EU/ml のエンドキシン溶液 0.1 ml を 0.9 ml の LAL 試験用水に加えて 0.1 EU/ml のエンドキシン溶液を調整して下さい。次のステップに進む前に最低 1 分間は強くボルテックスして下さい。
- 0.1 EU/ml のエンドキシン溶液 0.1 ml を 0.9 ml の LAL 試験用水に加えて 0.01 EU/ml のエンドキシン溶液を調整して下さい。次のステップに進む前に最低 1 分間は強くボルテックスして下さい。

試験手順(詳細に関しては、英語添付文書参照)

試薬は室温に戻してからご使用ください。

一般的試験手順

- PyroGene®エンドキシンアッセイは 96 ウェルのマイクロプレートを使用します。ブランク、エンドキシンスタンダード、検体をそれぞれ 100 μl ずつ適切なウェルに加えて下さい。通常 N=2 か N=3 で実施されます。
- エンドキシンのスパイクを加える場合、1 EU/ml 溶液を 10 μl ずつ PPC (Positive Product Control) のウェルに加えて下さい。

- 37°C ± 1°C で最低 10 分間プレートを前加熱して下さい。
- プレートを前加熱している間に、rFC 酵素溶液、rFC アッセイバッファー、蛍光性基質を 1:4:5 の比率で混合して反応溶液を調整して下さい。
- 注意深く上記の反応溶液を 100 μl ずつ各ウェルに加えて下さい。
- T=0 で蛍光度を讀取って下さい。
- 反応プレートを 37°C ± 1°C で 1 時間インキュベートし、T=60min で蛍光度を讀み取ってください。
- T=60min と T=0 の差をブランクで補正して下さい(ΔRFU)。
- 補正された ΔRFU の log 値をエンドキシン濃度の log 値に対して直線回帰のグラフになるようプロットして下さい。
- 検量線に従って検体のエンドキシン濃度を計算して下さい。

FLx808™と WinKQCL®ソフトウェアを使用する場合

このアッセイには蛍光リーダー FLx808™ と WinKQCL®ソフトウェアを使用することができます。リーダーの電源を入れてソフトウェアを立ち上げて下さい。ソフトウェアでは、「Templates」→「New」で rFC アッセイのテンプレートを作成して下さい。複数のタイプのアッセイをプログラムすることができます。詳しくはソフトウェアのユーザーマニュアルを参照して下さい。以下の例は Initial Qualification Assay (初期品質確認) の設定を述べたものです。

- Name: テンプレート名を入力して下さい。テンプレート名は英数字で最大 20 文字までですが、同じ名前前のテンプレートを作成することはできません。
- Analyst: 分析者の ID は自動的に入力され、変更はできません。
- Test Type: ▼をクリックしてプルダウンし、「Initial Qualification Assay」をクリックして選択して下さい。
- Type of Assay: PyroGene®のボタンを選択して下さい。
- Parameters: 「Parameters」をクリックすれば、テンプレートのパラメーター値を確認あるいは変更することができます。

Lot Number: 「Lot No./Exp Dates」のボタンを選択して、適切な情報を入力して下さい。

6. Standards: ▲▼のボタンをクリックしてスタンダードの数を選択して下さい。最低 3 濃度、最高 12 濃度のスタンダードを入力することができます。PyroGene®アッセイでは通常 4 濃度のスタンダードを使用します。

7. Standards Setup: 「Standards Setup」をクリックして検量線の濃度と単位を入力して下さい。

8. Layout: ブランク、スタンダード、検体の配置を定義して下さい。N 数は 2～6 の間で選択して下さい。「Standard Layout Dialog Box」の画面の入力を終了したら「OK」をクリックして下さい。

9. テンプレートを保存して下さい。テンプレートのリストから実行するテンプレートを選択して「Run」をクリックして下さい。詳しくはソフトウェアのユーザーマニュアルを参照して下さい。

10. ブランクと検体を加えたマイクロプレートをリーダーにセットし、37°C±1°Cで最低 10 分間プレートを前加温して下さい。

11. 上述の 10 分間の前加温中に、rFC 酵素溶液、rFC アッセイバッファー、蛍光性基質を1:4:5 の比率で混合して反応溶液を調整して下さい。アッセイに十分でしかもできるだけ余らない量の反応溶液を調整するためには、反応溶液を加えるウェルの数に 4 を加えたウェル数をもとに、それぞれの試薬の必要量を求めて下さい。試薬を混合する前にまずそれぞれ室温で安定させて下さい。試薬を混合する時、まずバッファーと基質を最初に混ぜ、酵素を最後に加えて下さい。十分に、ただし穏やかに混合して下さい。ボルテックスにはかけないで下さい。
注意: 混合後の反応液の保存はできません。

ウェルの数に応じて必要な試薬の量(μl)
(少量の余剰を想定し、4ウェル分余計に調整)

ウェルの数	rFC 酵素溶液	rFCアッセイ	蛍光性基質	
合計		バッファー		
6	100	400	500	1000
12	160	640	800	1600
24	280	1120	1400	2800
36	400	1600	2000	4000
42	460	1840	2300	4600
48	520	2080	2600	5200
54	580	2320	2900	5800
60	640	2560	3200	6400
66	700	2800	3500	7000
72	760	3040	3800	7600
78	820	3280	4100	8200
84	880	3520	4400	8800
90	940	3760	4700	9400
96	1000	4000	5000	10000

12. 前加温の最後にソフトウェアが出す指示に従い、8 チャンネルピペッターを使って反応溶液をウェルに 100 μl ずつ加えて下さい。

13. 直ちに「OK」をクリックして下さい。ソフトウェアが直ちに T=0 で Read One を読み取り、一時間後に Read Two を読み取ります。

14. アッセイ完了後、データは自動的にハードドライブに保存されます。

PyroGene®アッセイの種類

インキュベーターつき蛍光マイクロプレートリーダーと WinKQCL®ソフトウェアは PyroGene®アッセイに不可欠なものです。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ので、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。

PyroGene®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)

一般試験とは未知の検体中のエンドトキシン濃度を既知の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 (INH/ENH)

PyroGene®反応は酵素反応であるため、最適な pH 範囲特定の塩および 2 価正イオンの条件を必要とします。時として検体があるような最適な条件を変えてしまい、rFC がエンドトキシンに反応しないことがあります。PyroGene®試験を阻害する検体の陰性結果は必ずしもエンドトキシンが存在しないというわけではありません。

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。各希釈は陽性コントロール (PPC) が必要です。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、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 PyroGene®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米国薬局方や日本薬局方等の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 の希釈系列一列と CSE の希釈系列一列以上が必要です。WinKQCL®ソフトウェアが自動的に平均的な活性値を EU/ng もしくは 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 (INI.QUAL)

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」¹² 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 LAL アッセイの検証の一部として義務付けられているものであり、試薬の新しいロット毎に実施されるべきものです。PyroGene®試験は LAL 試験から進化したものであるため、ロンザでは同様のアプローチを用いることをお勧めします。

初期品質確認試験はエンドトキシン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(ΔRFU) 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 ΔRFU 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。

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 濃度以上のエンドトキシン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。

*更なるデータの解析には「その他の技術上の留意点」をご覧ください。

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。PyroGene®試験の場合、この阻害反応は低い ΔRFU を示し、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、原液のまま適切に希釈して、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 0.1 EU/ml になるように検体に加えることをお勧めします。もし検体自体が 0.1 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 1.0 EU/ml になるように加えることをお勧めします。スパイク溶液を添加された検体 (PPC) 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の 50~200% 以内でなければなりません。¹³

スパイク溶液が添加された検体(あるいはその希釈物)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 の検体に 10 EU/ml のエンドトキシン溶液 50 μl 加えます。この検体(あるいはその希釈物)は 0.1 EU/ml のエンドトキシンを含んでいます。使用の前に 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、1 EU/ml のエンドトキシン溶液 10 μl 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 0.1 ml 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 0.1 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(あるいはその希釈物) 0.1 ml を加えて下さい。それらのウェルに 1 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 0.1 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(あるいはその希釈物)がこの酵素反応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

0.1 EU/ml エンドトキシンでスパイクした場合

検体の希釈	エンドトキシン値(EU/ml)			スパイク回収量	検体阻害	エンドトキシン
	＋スパイク	－スパイク	差			
1/10	0.075	0.100	0.025	25%	阻害あり	N/A
1/20	0.044	0.088	0.044	44%	阻害あり	N/A
1/40	0.025	0.105	0.080	80%	阻害なし	1 EU/ml

はじめに検体を 10 倍単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。

参考文献

1. Levin, J. and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265 (1964).
2. Levin, J. and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337 (1964).
3. 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).
4. Iwanaga S. The *Limulus* clotting reaction. *Curr. Opin. Immunol.* 5:74 (1993).
5. Nakamura T., Morita T., Iwanaga S. Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in *Limulus* hemocytes. *Eur. J. Biochem.* 154:511 (1986).
6. Muta T., Miyata T., Misumi Y. et. al. *Limulus* Factor C: an endotoxin-sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains. *J. Biol. Chem.* 266:6554 (1991).

7. Tokunaga F., Nakajima H., Iwanaga S. Further studies on lipopolysaccharide-sensitive serine protease zymogen (factor C): its isolation from *Limulus polyphemus* hemocytes and identification as an intracellular zymogen activated by alpha-chymotrypsin, not by trypsin. *J. Biochem.* 109:150 (1991).
8. Morita, T. et al. A new (1-3) beta-D glucan mediated coagulation pathway found in *Limulus* amebocytes. *FEBS Letts.* 129:318 (1981).
9. Ding J. L., Navas M.A. A., Ho B. Two forms of Factor C for the amebocytes of *Carcinoscorpius rotundicauda*: purification and characterization. *Biochem. Biophys. Acta* 1202:149 (1993).
10. Ding J.L., Navas M.A.A., Ho B. Molecular cloning and sequence analysis of Factor C cDNA from the Singapore horseshoe crab, *Carcinoscorpius rotundicauda*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4:90 (1995).
11. Ding J.L., and Ho B. New era in pyrogen testing. *Trends in Biotechnology* 19:277 (2001).
12. U.S. Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, "Guideline on the 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).
13. Chapter <85> Bacterial Endotoxins. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.

特許情報

PyroGene[®]の様々な構成成分は以下の特許によって保護されています。

US 4,745,051; US 4,879,236; US 5,716,834; US 5,712,144; Australia 581,174; Canada 1,222,213; Colombia 24,556; Denmark 172,401; EP 127,839; Ireland 58,011; Israel 71,906; Japan 2,129,487 & 2,644,447; Korea 51,077; Mexico 164,250; Norway 173,944; New Zealand 208,259; Philippines 25,395; South Africa 843,914; Spain 532,825; Taiwan 50,740.

その他にも審理中の特許があります。

その他の技術上の留意点

スパイクの回収率の向上

異なる方法でデータを処理することにより(例えば POWRCURVE[™]を使用した多項式の検量線を使用するなど)、PPC 回収率の計算を向上することができます。

検量線濃度範囲の短縮

検量線の濃度範囲を 0.01~1 EU/ml あるいは 0.1~10 EU/ml に短くすると、全長の 0.01~10 EU/ml よりも優れた直線性を示します。

分散剤を使用した阻害の克服

パイロスバース(ロンザ製品 N188)、B-G-blocker(ロンザ製品番号 N190)、分散剤は PyroGene[®]にはお使いいただけません。

商標情報

FLx800[™]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のです。

2008 年(平成 20 年)10 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>