

Lonza

Limulus Amebocyte Lysate (LAL)
PYROGENT® Plus
カタログ番号: N283-06

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* エンドトキシン検査に使用できるように設計されています。本製品は臨床検査中のエンドト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。Limulus Amebocyte Lysate (LAL) テストはグラム陰性細菌のエンドトキシンを定性的に検出します。キット中のライセート試薬をエンドトキシン試験用水で溶解し、等量の検体と混合します。インキュベーション後、エンドトキシンが存在すれば検体はゲル化します。エンドトキシンが存在しなければゲル化は起こりません。

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テストの妥当性確認のためのガイドライン」¹⁰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する、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) ルーティンテスト手順の作成、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のガイドラインに従うものです。ゲル化測定における同様の必要条件は米国薬局方で公表され定期的に更新されています¹¹。

警告

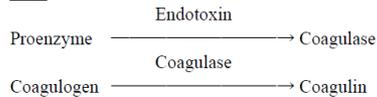
In Vitro 検査のみに使用してください。ヒトのエンドトキシン血症の *In Vitro* 診断には使用しないで下さい。LAL 試験はFDAによるヒト及び動物の非経口薬、生物製剤、医療機器の最終製品試験のガイドラインに沿って使用された場合、USPのウサギを用いたパイロジェン試験の代用とすることができます。¹⁰

背景

エンドトキシン検出におけるLALの使用は、アメリカカブトガニ (*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ブ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。カブ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) 水抽出成分のライセートを調整しました。Solum^{5,6} と Young、Levin と Prendergast⁷ 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。

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⁷。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り決定されます。活性化された酵素 (coagulase) は同じくLAL中に存在する凝固タンパク (coagulogen) の特定の結合を加水分解します。加水分解された coagulin は互いに結びついてゲル状の塊を形成します。

キットに含まれる試薬と保存条件

Limulus Amebocyte Lysate (LAL)、凍結乾燥品

アメリカカブトガニ *Limulus polyphemus* の体内を循環するアメーバ細胞 (amebocyte) から調整され、FDA のエンドトキシン標準品 (Reference Standard Endotoxin, RSE) に基づく濃度の (EU/ml) を検出するために標準化されたものです。

緩衝化された1個および2個の陽イオンを含みます。ライセートは凍結乾燥され真空条件下で密封され、エンドトキシン試験用水で溶解されます。使用の直前まで溶解しないで下さい。

凍結乾燥された (未溶解の) LAL は 2~8°C で冷蔵保存してください。25°C 以上の温度にライセートを晒さないよう注意して下さい。25°C 以上の温度や強い光に長時間晒されたライセートは黄色くならたり解けなくなったりするかもしれません。そのようなライセートは廃棄して下さい。

溶解されたライセートは 2~8°C で 24 時間保存可能です。-10°C 以下でより長期の保存が可能です。凍結・融解は一回のみ可能です。保存期間中ライセートが光に晒されないように注意して下さい。溶解後 4 週間以内にご使用下さい。

E. coli Control Standard Endotoxin O55:B5 (CSE)、X ng/vial、凍結乾燥品

E. coli O55:B5 株から精製されたエンドトキシンの凍結乾燥調製品です。下記の指示に従って調整すると、現行の FDA のエンドトキシン標準品 (RSE) とキットの LAL 試薬のロットに基づいて決定された力価を有する Control Standard Endotoxin (CSE) となります。適切な RSE/CSE 比とそれに基づく CSE 力価は Certificate of Analysis (COA、試験成績表) に記載されています。

このインサートに明記された手順に従い指定されたライセートのロットを使用するならば、品質管理の全ての見地においてこの CSE 調製品は FDA による RSE の代用品として容認されます。

溶解前は 2~8°C で保存して下さい。エンドトキシン試験用水 5.0 ml で溶解して下さい。力価 (EU/ml) は RSE/CSE 比から以下のように計算されます。

力価 (EU/ml) = RSE/CSE 比 (EU/ng) × X ng/vial ÷ 5.0 ml/vial

溶解後は 2~8°C で 4 週間まで保存できます。1.0 EU/ml の溶液は必要分だけ調製してください。希釈されたエンドトキシンは、1 日以上保存及び使用しないでください。検体の調整の項目をご参照ください。

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

警告: 発熱活性があります。人体には投与しないで下さい。

キットの構成

Limulus Amebocyte Lysate (LAL 試薬) -- 4 バイアル (各 16 回分、1.8ml 溶解用)

E. coli Control Standard Endotoxin (CSE) -- 1 バイアル

キット以外に必要な材料及び装置

1. エンドトキシン 試験用水。ライセート試薬と 37°C ± 1°C で 24 時間インキュベーションしてもゲル化しないもの
2. エンドトキシンフリーのピペット、0.1ml、1.0 ml、5.0 ml、10.0 ml
3. エンドトキシンフリーのガラス試験管、10 mm x 75 mm (滅菌処理については下記の「検体の採取及び調整」を参照) (ゲル化試験用、ロンザ製品 N201、N205 か同等のもの)
4. エンドトキシンフリーのガラス希釈用試験管、13x100mm (ロンザ製品 N207 検体希釈用)
5. 検体の pH 調整が必要であれば、エンドトキシン試験用水で調整した 0.1N 塩酸もしくは 0.1N 水酸化ナトリウム溶液
6. ヒートブロックあるいは非循環型のウォーターバス (37°C ± 1°C)
7. 試験管立て
8. タイマー
9. 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トキシンフ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、エンドトキシンフリーになります。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トキシンフリーですが、通常使用する前に試験して下さい。

エンドトキシンフ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。^{8,9} 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ト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 LAL 試薬を溶解する希釈液の容器が既に開封されていたり、またはロンザ社以外の製品である場合は、希釈液のみのエンドトキシン汚染試験を実施する必要があります。

試薬の調整

使用前に試薬を常温に戻してください。

1. LAL 試薬の調整

- 注意: 仕様直前まで溶解しないで下さい
- A. 16 次用バイアルに 1.8 ml のエンドトキシン試験用水を加えて溶解して下さい。穏やかにただし十分に最低 30 秒間バイアルを回して下さい。泡が立つのでバイアルを振らないで下さい。
 - B. 溶解した LAL 試薬は 2~8°C で感度を失わずに 24 時間保存可能です。溶解した LAL 試薬は使用に便利に量に小分けし、-10°C で最長 4 週間保存可能です。凍結した試薬は使用の直前に解凍して下さい。凍結・溶解は一回のみ可能です。

2. CSE の調整

- A. 10ng の CSE バイアルを 5.0 ml のエンドトキシン試験用水で溶解して下さい。
- B. 溶解した CSE のバイアルを最低 15 分はボルテックスして下さい。
- C. 試験成績表に記載されている値に基づいて、濃度が 1 EU/ml になるようエンドトキシン試験用水で希釈して下さい。試験成績表に記載されている CSE 力価を X EU/ml とすると、1/X に希釈することになります。0.1 ml のエンドトキシン原液を希釈する場合、0.1(X-1) ml のエンドトキシン試験用水で希釈します。X = 21 EU/ml の例: 0.1 ml のエンドトキシン原液を、0.1(21-1) = 2.0 ml のエンドトキシン試験用水で希釈し、次のステップに進む前に最低 60 秒間ボルテックスして下さい。

- D. 1 EU/ml のエンドトキシン溶液を用いて、LAL 試薬の表示感度をまたぐ 2 倍希釈系列を、以下のように調整して下さい。各希釈は次のステップに進む前に最低 60 秒以上ボルテックスして下さい。

感度 0.06 EU/ml の LAL 試薬の希釈系列

(W:エンドトキシン試験用水)

番号	W量(ml)	水に加える量	エンドトキシン濃度
1	1.0	1 EU/ml を 1.0ml	0.5 EU/ml
2	1.0	1 番を 1.0 ml	0.25 EU/ml
3	1.0	2 番を 1.0 ml	0.125 EU/ml
4	1.0	3 番を 1.0 ml	0.06 EU/ml
5	1.0	4 番を 1.0 ml	0.03 EU/ml
6	1.0	5 番を 1.0 ml	0.015 EU/ml

試験方法と解釈の仕方

各アッセイにはライセートの感度をまたいだ CSE の 2 倍希釈系列、検体の希釈、陰性コントロールとしてのエンドトキシン試験用水が必要です。微生物またはエンドトキシンによる汚染を避けるために注意しながら、CSE、検体、またはエンドトキシン試験用水を、0.10 ml ずつ 10 mm x 75 mm の試験管に分注して下さい。

溶解した LAL 試薬を 0.10 ml ずつ、プランクから始めて濃度の低い方から高い方へと、各試験管に加えて下さい。LAL 試薬を加え、直ちに内容物を十分に混合し、37°C ± 1°C のヒートブロックあるいは非循環型のウォーターバスに設置して下さい。この手順はエンドトキシンの各希釈について行って下さい。未知の検体は CSE と一緒にアッセイして下さい。検体のアッセイは単一濃度で Yes/No 試験として行うこともできますし、希釈系列を作成して定量的に行うこともできます。インキュベーション時間は試験管が 37°C ± 1°C に置かれた時点から数えて下さい。試験管をヒートブロックあるいはウォーターバスから、結果を読むために指定された時間の前に取り除いたり動かしたりしないで下さい。60 (±2) 分のインキュベーションの後、注意深く試験管を取り出し、穏やかに 180 度転倒して下さい。

- 陽性反応では堅固なゲルが形成され、試験管を穏やかに反転してもゲルは一瞬試験管の底に残ります。
- 陰性反応では試験管を反転しても固形ゲルの形成が観察されません。濁度や粘度に上昇が見られる場合もあります。これは陰性と見なされます。
- 各検体の陽性、陰性結果を記録して下さい。

ライセート試薬ラベルに表記された感度の確認

ライセート試薬の各バイアルのラベルには FDA のエンドトキシン標準品 (Reference Standard Endotoxin, RSE) によるライセートの感度が Endotoxin Units の単位で表記されています。

初期の社内検証の一部として、活性が既知の標準

エンドトキシンを用いて各ユーザーでライセート試薬の感度を再度確認して下さい。

以下のようにライセート試薬の表示感度をまたぐ 2 倍希釈系列を調整して下さい。陰性コントロールであるエンドトキシン試験用水も含め、4 系列の希釈液を用意して下さい。1 時間のインキュベーションの後、陰性、陽性の結果を記録して下さい。エンドポイント濃度の希釈は陽性結果を得た最後の希釈により決定されます。

アッセイ結果:ゲル化試験法 感度 0.06 EU/ml のライセート試薬の例 エンドトキシン希釈系列 (EU/ml)

系列	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	H ₂ O	エンドポイント
1	+	+	+	-	-	-	0.06
2	+	+	+	-	-	-	0.06
3	+	+	+	+	-	-	0.03
4	+	+	+	-	-	-	0.06

ライセート試薬の感度はエンドポイント濃度の幾何平均から算出されます。各エンドポイント濃度を log₁₀ に換算し、平均します。ライセート試薬の感度は平均 log₁₀ 値を antilog₁₀ 値に換算したものととなります。

系列	エンドポイント (EU/ml)	log ₁₀ (エンドポイント値)
1	0.06	-1.222
2	0.06	-1.222
3	0.03	-1.523
4	0.06	-1.222

$$\text{平均値} = -1.298$$

$$\text{Antilog}_{10}(\text{平均値}) = \text{Antilog}_{10}(-1.298) \\ = 10^{-1.298} = 0.050 \text{ EU/ml}$$

計算によって得られた感度がラベル表示感度の 0.5 ~ 2 倍の範囲以内でなければなりません。

未知の検体中のエンドトキシン濃度の測定

未知の検体中のエンドトキシン濃度を測定するためには、2 倍希釈系列を作成し、エンドポイント濃度を求めて下さい。上記のように幾何平均濃度を求め、ライセート試薬の感度にかけて下さい。

未知の件対中のエンドトキシン濃度の検出 LAL 感度が 0.06 EU/ml の場合 希釈倍率

系列	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-

検出限界希釈倍率	Log ₁₀ (エンドポイント希釈)
1/8 (0.125)	Log ₁₀ 0.125 = -0.903
1/16 (0.0625)	Log ₁₀ 0.0625 = -1.204
	平均値 = -1.054
	Antilog ₁₀ (平均値) = Antilog ₁₀ (-1.054) = 10 ^{-1.054} = 0.088 = 1/11.3

$$\text{エンドトキシン濃度} = \text{試薬の感度} \times \text{エンドポイント希釈} \\ = 0.06 \text{ EU/ml} \times 11.3 = 0.68 \text{ EU/ml}$$

製品による LAL 反応の阻害

LAL 反応は酵素を介するものであり、最適の pH 範囲及び特定の塩と 2 価陽イオンが必要となります。時として、検体が最適な反応条件に影響を及ぼし、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。

あらかじめ、各タイプの検体の阻害について調べておく必要があります。一方はエンドトキシン試験用水でエンドトキシンの 2 倍希釈系列を作成し、もう一方で検体を希釈液として同様のエンドトキシンの 2 倍希釈系列を作成します。それぞれの系列を同時に通常の手順でアッセイして下さい。インキュベーションが終わった後、陽性、陰性の結果を記録し、各希釈系列のエンドポイント濃度の幾何平均を計算して下さい。もしエンドポイント濃度の幾何平均がライセート試薬のラベルに表記されている値の 0.5 ~ 2 倍の範囲であれば、製品は LAL 反応を阻害しないと言えます。以下の例をご参考下さい。

製品による反応阻害のテスト

$$\text{ライセート表示感度} = 0.06 \text{ EU/ml} \\ \text{エンドトキシン希釈系列 (EU/ml)}$$

	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
エンドトキシン 1)	+	+	+	-	-
水による希釈 2)	+	+	+	-	-
3)	+	+	+	+	-
4)	+	+	+	-	-
幾何平均エンドポイント	= 0.050 EU/ml				

製品 A による 1)	+	+	-	-	-
希釈 2)	+	+	+	-	-
3)	+	+	+	-	-
4)	+	+	+	-	-
幾何平均エンドポイント	= 0.072 EU/ml				
阻害なし					

製品 B による 1)	+	-	-	-	-
希釈 2)	+	-	-	-	-
3)	+	-	-	-	-
4)	+	-	-	-	-
幾何平均エンドポイント	= 0.25 EU/ml				
阻害あり					

製品による LAL 試験の阻害を克服する最も簡単な方法は希釈です。サンプル中のエンドトキシン濃度を計算する際には希釈倍率を考慮に入れる必要があります。阻害を示さない希釈倍率を見つけるために、まず製品の希釈系列を作成し、それぞれライセート試薬の感度の 2 倍の濃度になるようにエンドトキシンを加えて下さい。各液を通常の手順でアッセイして下さい。陽性反応は、阻害反応が克服されたことを示します。極端に酸性、あるいはアルカリ性の製品は pH を調整する必要があるかもしれません。

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ませんのでご注意ください。

参考文献

- Bang, F.B. (1956) Bull. Johns Hopkins Hosp. 98:325-351.
- Levin, J. and F.B. Bang (1964) Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337.
- Levin, J. and F.B. Bang (1964) Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
- Levin, J. and F.B. Bang (1968) Thrombos. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
- Solum, N.O. (1970) Thrombos. Diath. Haemorrh. 23:170-181.
- Solum, N.O. (1973) Throm. Res. 2:55-70.
- Young, N.S.J., J. Levin and R.A. Prendergast (1972) J. Clin. Investig. 51:1790-1797.
- Nachum, R., A. Lipsey and S.E. Siegel (1973) N. Eng. J. Med. 289:931-934.
- Cooper, J.F., H.D. Hochstein and E.B. Seligman, Jr. (1972) Bull. Parent. Drug Assoc. 26:153-162.
- U.S. Department of Health and Human Services, Public Health 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).
- Chapter <8> Bacterial Endotoxins. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.

特許

この製品の構成品は U.S. Patent 4322217 で保護されています。

商標

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) 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