

Lonza

Limulus Amebocyte Lysate (LAL)
PYROGENT® Single Test Vials
カタログ番号: N189-06

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、生物学的製剤、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。本製品は臨床検体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試験する検体で溶解し、インキュベーションします。検体中にエンドトキシンが存在すればゲル化します。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 (United States Food and Drug Administration) 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) 薬剤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

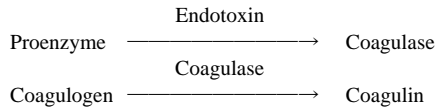
*In Vitro*検査のみの製品です。ヒトのエンドトキシン血症の*In Vitro*診断には使用しないで下さい。LAL試験はFDAによるヒト及び動物の非経口薬、生物製剤、医療機器の最終製品試験のガイドラインに沿って使用された場合、USPのウサギを用いたピロジェン試験の代用とすることができます¹⁰。

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血液中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) 水抽出成分のライセートを抽出しました。

Solum^{5,6}及びYoung、Levin、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。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、シングルテストバイアル(25 バイアル)

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) 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価および2価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で密封されています。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、黄色くなっ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。

キット以外に必要な材料及び装置

- 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凝固しないもの
- エンドトキシンプリーのピペット、0.25 ml、1.0 ml、5.0 ml
- エンドトキシンプリーのガラス試験管 (検体希釈用、ロンザ製品 N207 もしくは同等のもの)
- エンドトキシン標準品
- 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)
- 試験管立て
- タイマー
- 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、エンドト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ピ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プリーですが、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。^{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。

試薬の調整

注意: シングルテストの試薬は、必ず検体で溶解した直後にインキュベーションして下さい。

- 陽性コントロールの調整
 - エンドトキシン標準品をラベルの指示に従ってエンドトキシン試験用水で溶解して下さい。
 - 溶解したエンドトキシン標準品のバイアルを最低15分間ボルテックスにかけるか、製品情報の指示に従って扱って下さい。
 - エンドトキシン試験用水で1 EU/mlに希釈して下さい。希釈の過程で、次のステップに進む前に、各バイアルを必ず60秒間ボルテックスして下さい。
 - 1 EU/mlのエンドトキシン溶液を用いて、以下の例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。

表示感度 0.06 EU/ml ライセート試薬の希釈系列 (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

- エンドトキシン試験用水は陰性コントロールとして使用できます。
- 0.25 ml のコントロール溶液あるいは検体を凍結乾燥状態のライセートに直接加えて溶解し、そのバイアルで試験をします。

試験方法と解釈の仕方

ライセート試薬が入ったバイアルはそのまま試験管となります。使用前に、バイアルを硬い表面で軽く叩き、内容物を底に集めて下さい。ゴムのキャップを外すときは、微生物やエンドトキシンが混入しないように注意深く扱って下さい。

検体 0.25 ml をライセート試薬のバイアルに加え、内容物が溶解するまでバイアルを傾けたり回したりしながら混合して下さい。

陰性コントロールとして、エンドトキシン試験用水 0.25 ml をライセート試薬に加えて上記のように混合して下さい。

各ライセート試薬のバイアルのラベルには、ゲル化に必要な最小限の濃度が表記されています。(N189-06の場合は0.06 EU/mlです。)表示感度の2倍濃度の陽性コントロール (N189-06の場合は0.125 EU/ml) 0.25 ml をライセート試薬に加えて、上記のように混合して下さい。(以下の製品による阻害の項参照)

ライセート試薬を溶解した後、速やかに各バイアルを37°C (±1°C) で60 (±2) 分間インキュベーションして下さい。各バイアルのインキュベーション時間は37°C (±1°C) の非循環型ウォーターバスまたはヒートブロックに入れられた時点から正確に60 (±2) 分間として下さい。

インキュベーション終了後、各バイアルを注意深く180度転倒して下さい。検体バイアルをコントロールのバイアルと比較して下さい。

- 陽性反応では硬いゲルが形成され、バイアルを反転してもゲルは一瞬試験管の底に残ります。陽性コントロール及び陽性検体ではこの結果が得られる筈です。
- 陰性反応ではバイアルを反転してもゲルの塊の形成が観察されません。陰性コントロールではこの結果が得られる筈です。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せん。
- 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の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検出限界をまたぐ 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って決定されます。

感度 0.06 EU/ml のライセート試薬 (N189-06) の例
 エンドキシン希釈系列 (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幾何平均エンドポイント濃度から算出されます。各エンドポイント濃度を log₁₀ に換算して全 log₁₀ 値を平均し、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します。

系列	エンドポイント (EU/ml)	log ₁₀ (エンドポイント)
1	0.06	-1.222
2	0.06	-1.222
3	0.03	-1.532
4	0.06	-1.222

平均値 = -1.298

Antilog₁₀(平均値) = Antilog₁₀(-1.298)
 = 10^{-1.298} = 0.05 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キシン濃度の測定

未知の溶液のエンドキシン濃度を測定するためには、2 倍希釈系列を作成し、エンドポイントを求めて下さい。上記のように幾何平均希釈を求め、ライセート試薬の表示感度をかけて下さい。

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	+	+	+	+	-	-

エンドポイント希釈倍率	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

Antilog₁₀(平均値) = Antilog₁₀(-1.054) = 10^{-1.054}
 = 0.088 = 1/11.3

エンドキシン濃度 = 0.06 EU/ml x 11.3 = 0.68 EU/ml

製品による阻害

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 価陽イオンが必要条件となります。時として、検体が最適な反応条件に影響を及ぼし、ライセート試薬の感度を下げることがあります。LAL テストを阻害する検体による陰性結果は、必ずしもエンド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、各検体のタイプの阻害について調べておく必要があります。一方はエンドキシン試験用水でエンドキシンの 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キシンの 2 倍希釈系列を作成します。それぞれの系列を通常の手順で検定して、各シリーズの検出限界の希釈を計算して下さい。もし検出限界の平均値がライセート試薬のラベルに記載されている値の 0.5 ~ 2 倍の範囲であれば、製品は LAL 反応を阻害しないと云えます。

		エンドキシン希釈系列 (EU/ml)				
		0.25	0.125	0.06	0.03	0.15
エンドキシン	1)	+	+	+	-	-
試験水による希釈	2)	+	+	+	-	-
	3)	+	+	+	+	-
	4)	+	+	+	-	-
		検出限界 = 0.05 EU/ml				

製品 A による	1)	+	+	-	-	-
希釈	2)	+	+	+	-	-
	3)	+	+	+	-	-
	4)	+	+	+	-	-
		検出限界 = 0.072 EU/ml 阻害なし				

製品 B による	1)	+	-	-	-	-
希釈	2)	+	-	-	-	-
	3)	+	-	-	-	-
	4)	+	-	-	-	-
		検出限界 = 0.25 EU/ml 阻害あり				

製品による LAL 阻害を克服する最も簡単な方法は希釈です。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 倍濃度になるようにエンドキシンを加えて下さい。各液を通常の手順で検定して下さい。陽性反応を得た液が、阻害反応を克服した希釈倍率となります。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れ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. 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 <85> Bacterial Endotoxins. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.

特許

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

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>