

Lonza

Limulus Amebocyte Lysate (LAL)

PYROGENT®-5000

U.S. License No. 1775

カタログ番号: N383

(日本語参考翻訳)

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作られています。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。このテストは *Limulus Amebocyte Lysate (LAL)* 試薬とインキュベーター付の吸光度計および適切なソフトウェアを使用して、光学的にエンドトキシンを検出します。

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」⁸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の確立、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 FDA ガイドラインに従うものです。カイネティック比濁法測定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。¹⁰

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 のウサギを用いたバイロジェン試験の代用とすることができます。⁸

背景

バイロジェント®5000 はグラム陰性細菌エンドトキシンの定量的カイネティック測定方法です。検体は LAL 試薬と混合後、吸光度計に設置され、時間の経過に伴う濁度の変化は自動的に測定されます。濁度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、エンドトキシンの量が多いほど短くなり、エンドトキシンの量が少ない場合は長くなります。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 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 Prendergast⁹ 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。Teller と Kelly⁷ はエンドトキシンによるライセートの活性化は測光的にモニターできることを証明しました。

原理	Endotoxin	
Proenzyme	—————>	Coagulase
	Coagulase	
Coagulogen	—————>	Coagulin

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⁹。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 (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。比濁 LAL 法はゲル化に先立って起こる濁度 (光学密度) の上昇を測定するものです。

キットに含まれる試薬

PYROGENT®-5000 LAL Reagent—2 バイアル (各 50 アッセイ)
LAL Reagent 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) 由来のライセートを含んでいます。

PYROGENT®-5000 LAL Reagent の各バイアルに PYROGENT®-5000 LAL Reconstitution Buffer 5.2 ml を加え、泡が立つのを避けるためバイアルを優しく回して下さい。
注意: 試薬を使用する前に、2分ほどバイアルを置いて泡が全て液の表面に集まるのを待って下さい。

凍結乾燥状態 (溶解前) の PYROGENT®-5000 LAL Reagent は 2~8°C で冷蔵して下さい。25°C 以上の温度や強い光に晒すことは避けて下さい。黄色く変色したものや溶解しないものは廃棄して下さい。溶解後の Pyrogent®-5000 LAL Reagent は 2~8°C で 8 時間安定です。

PYROGENT®-5000 LAL Reconstitution Buffer—2 バイアル
PYROGENT®-5000 LAL Reagent を溶解する際には必ずこの緩衝液を使用して下さい。必ず室温に落ち着かせてからご使用下さい。2~8°C で保存して下さい。

E. coli O55:B5 Endotoxin—1 バイアル

バイアルには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 100 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 LAL 試験用水で溶解して下さい。液量はロットごとに異なります。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。冷蔵保存されていた溶液を使用する場合は、使用前に室温に落ち着かせて最低 15 分はボルテックスで強く攪拌して下さい。凍結乾燥状態のエンドトキシンは 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濁法における性能を 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_record.html

キット以外に必要な材料及び装置

1. LAL 試験用水
2. 検体の pH 調整が必要であれば、0.1N 塩酸溶液もしくは 0.1N 水酸化ナトリウム溶液
3. エンドト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)
4. エンドトキシンプリーの個別包装のメスピペット
5. 自動ピペットとエンドトキシン試験用チップ
6. 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、各 LAL 試薬のロットについて、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
7. 8 チャンネルピペッター
8. 試薬リザーバー (ロンザ製品 25-364 か同等のもの)
9. 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)
10. WinKQCL®ソフトウェア
11. 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バ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。

比濁法試験の種類

バイロジェント®5000 によるカイネティック比濁法試験にはインキュベーション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。

リーダーとソフトウェアの操作方法と機能を正しく理解するために、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。

比濁 LAL 法には 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 (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。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 (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」⁸ 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、またバイロジェント®5000 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 (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、比濁法 LAL 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ため、検量線を作成するためのエンドトキシン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。

バイロジェント®5000 は 0.01 EU/ml ~ 100 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。比濁法 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濁法 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ドライン¹¹ 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。⁸

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
10	0.9 ml	100 EU/ml を 0.1 ml
1	0.9 ml	10 EU/ml を 0.1 ml
0.10	0.9 ml	1 EU/ml を 0.1 ml
0.01	0.9 ml	0.1 EU/ml を 0.1 ml

- 100 EU/ml のエンドトキシンストック溶液 0.1 ml を 0.9 ml の LAL 試験用水に加えて 10 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。
- 上記の 10 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 1 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。
- 上記の 1 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 0.1 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。
- 上記の 0.1 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 0.01 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

注意: 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。試験実施中は過剰な振動が生じない場所にリーダーを設置して下さい (例: 遠心分離機、振動台、など)。

バイロジェント®5000 試験の実施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 WinKQCL®ソフトウェアのマニュアルをご参照下さい。

- 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、試験の種類、試薬のロット番号、エンドトキシン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。
- 試験の種類 (Type of Assay) は PYROGENT®-5000 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変更はしないで下さい。

Delta t (seconds)	060
Measurement Filter (nm)	340
Delta mOD	030
Number of Reads	100
- 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。
- WinKQCL®の指示に沿ってテンプレートを実行 ("Run") して下さい。
- 注意深くブランク (LAL 試験用水)、エンドトキシンスタンダード、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。泡が立たないように注意して下さい！

- プレートリーダーに設置して蓋を閉じて下さい。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。
- 37°C ± 1°C で 10 分以上プレートを前加温して下さい。
- 前加温が終わりに近づいたら、必要な量の PYROGENT®-5000 LAL Reagent を PYROGENT®-5000 LAL Reconstitution Buffer (1 バイアルにつき 5.2 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。使用の前に泡が液の表面に上がってくるまで待って下さい。
- 試薬をリザーバーにブールし、リザーバーを穏やかに揺らして攪拌して下さい。
- Kinetic QCL®リーダーを使用する場合は、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。
- 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バイロジェント®5000 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。泡が立つのを極力避けて下さい！
- 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: PYROGENT®-5000 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。

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 340 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 0.03 増加するまでの時間を測定します。この時間が **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 $(r) \geq 0.980$ 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の検体中のエンド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 計算例			
	濃度 (EU/ml)	平均 反応時間	Log[濃度]	Log[平均 反応時間]
スタンダード				
陰性				
コントロール	-----	無反応	-----	-----
S1	0.010	3103	-2.000	3.492
S2	0.100	1484	-1.000	3.171
S3	1.000	808	0.000	2.907
S4	10.000	485	1.000	2.686
S5	100.000	312	2.000	2.494
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.16~18 を参照。

POWERCURVE[™]

もし相関係数の絶対値が $(r) \geq 0.980$ 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 \log_{10} [反応時間] とそれに対応する \log_{10} [エンドキシン濃度] 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。

$$\begin{aligned} & \text{多項 (POWERCURVE) モデル} \\ & Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4 \\ & A = 2.90741 \\ & B = -0.24066 \\ & C = 0.02111 \\ & D = -0.00219 \\ & E = 0.00007 \end{aligned}$$

検量線のパラメーターはレポート上に表示されます。WinKQCL[®] POWERCURVE[™] は各検体の反応時間から対応するエンド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) には使用できません。FDA ガイドラインに準拠する場合、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。比濁法 LAL 試験の場合、この反応阻害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 (又は検体の希釈物) の一部に既知量のエンドキシンスパイクを添加します。添加するエンド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奨めします。もし検体自体が 1.0 EU/ml 以上のエンドキシンを含んでいる場合は、添加されるエンド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、各検体のエンドキシン濃度及び添加されたエンドキシンの回収量は自動的に計算されます。エンド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 (又はその希釈物) 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 (又はその希釈物) に 10 EU/ml のエンドキシン溶液 50 μ l を加えます。この検体 (又はその希釈物) は 0.1 EU/ml のエンド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、96 穴マイクロプレートの各 PPC ウェルに 10 μ l の 1EU/ml エンドキシン溶液を加えて下さい。それらのウェルに 0.1 ml の検体 (又はその希釈物) を加えて下さい。これで各ウェルは 0.1 EU/ml のエンドキシンを含んでいることになります。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 (又はその希釈物) 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 (又はその希釈物) がこの比濁法 LAL 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	エンドキシンの回収量
1/10	0.015 阻害あり
1/20	0.042 阻害あり
1/40	0.110 阻害なし

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倍率が決定されたら、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異なります。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こと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るかもしれません。

濁度のある検体

濁度の高い検体についてはエンドキシン試験前に濁度を取り除く必要があるかもしれません。検体の遠心分離、フィルター、希釈などにより濁度を取り除くことができるかもしれません。

保存されている検量線の使用

WinQCL[®] に保存されている、既存の検量線を使用してエンドキシン濃度を測定することもできます。既存の検量線を作成する際に使用したものと同一ロットナンバーの PYROGENT[®]-5000 LAL 試薬、LAL 試験用水、エンドキシンならびにマイクロプレートリーダーのパラメーターを使用すれば、既存の検量線を使用することができます。

もし、既存の検量線を使用する場合は、スタンダードコントロールを Log ベースの最高と最低エンドキシンス

タンダード濃度の中間点でアッセイしてください。測定されたエンドトキシン濃度は実際値の±25%でなければいけません。

例: 検量線が 0.01~100EU/ml の場合、スタンダードコントロールを 1.0EU/ml でアッセイします。

Log 100	=	2.0
Log 0.01	=	-2.0
Log average	=	0.0
Antilog 0.0	=	1.0

検量線が 1~0.01EU/ml の場合、スタンダードコントロールを 0.1EU/ml でアッセイします。

Log 1.0	=	0.0000
Log 0.01	=	-2.0000
Log average	=	-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 は比濁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濁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 PYROGENT®-5000 を用いて FDA エンドトキシン標準品 (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 100 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 0.01~100 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、標準化が連続的ではばらつきが少ない比濁法 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のでご注意ください。

参考文献

1. Bang, F.B. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 98:325 (1956).
2. Levin, J. and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265 (1964).
3. Levin, J. and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337(1964).
4. 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).
5. Solum, N.O. Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. Thromb. Diath. Haemorrh. 23:170 (1970).
6. 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).
7. Teller, J.D. and K.M. Kelly. A turbidimetric *Limulus* amoebocyte assay for the quantitative determination of Gram negative bacterial endotoxin. In Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (*Limulidae*), Cohen, E., Ed., A.R. Liss, Inc., New York, N.Y. p.423 (1979).
8. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, "Guideline on Validation of the *Limulus* Amoebocyte Lysate Test As An End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices" (1987).
9. 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).
10. Chapter <85> Bacterial Endotoxins. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.
11. 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

この製品の構成品は 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>