

# 遺伝子組換え LAL 試薬

## PyroSmart NextGen™



製造業者: ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED  
 121 Bernard E. Salt Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA  
 電話: (508) 540-3444  
 無料通話: (888) 395-2221  
 ファックス: (508) 540-8680  
 テクニカルサービス: (800) 848-3248  
 カスタマーサービス: (800) 525-8378

PN002641-JA rev2 2021年2月17日

### PyroSmart NextGen™

グラム陰性細菌エンドトキシン(リポ多糖)の検出と定量用のカインेटィック比色組み換え試薬

#### 使用目的

組み換え測定試薬、PyroSmart NextGen™ を用いる試験は、ヒト用注射剤(生物学的製剤を含む)、動物用注射剤、医療機器等の最終製品試験の公定書に記載される標準試験法の代替法として使用することが可能です(1,2)。代替法のバリデーションに関するガイダンスは、USP<1223>および<1225>(3.4)に記載されています。代替試験法は、標準試験法と同等またはそれ以上の性能を有することが認められなければなりません。公定書未収載品(水等の原材料や工程内モニタリングなどに使用する品目)中のエンドトキシンの定量の際には、試験法のバリデーションを行うことなく本組み換え試薬を用いることが可能です。

組み換え測定試薬、PyroSmart NextGen™ を用いる試験は、ヒトのエンドトキシン血症などのヒト疾患の診断を目的として臨床検体中のエンドトキシンを検出するためには使用できません。

#### 測定原理

PyroSmart NextGen™ 試薬は、次の3つの組換えタンパク質で構成されます(C因子、B因子、凝固酵素前駆体)。エンドトキシンの存在下で、組換えC因子が活性化し、その活性化したC因子が組換えB因子、組換え凝固酵素前駆体を次々に活性化していきます。その結果、最終的にPyroSmart NextGen™中の無色の合成発色基質が分解されます。この反応により、405nmで吸収を示す黄色を呈するpナフトロアニリン(pNA)が遊離します(図1)。適切な測定時間中の吸光度の変化を  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  で一定の間隔で連続的に測定します。エンドトキシン濃度が高いほどpNAの遊離速度も増し、結果的に吸光度の変化も速くなります。

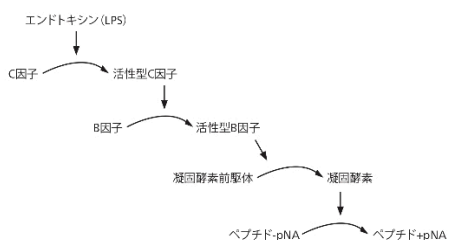


図1 エンドトキシンによるC因子活性化に始まり、pNAの遊離により吸光度が増すカスケード機構

#### 安全上の注意事項

PyroSmart NextGen™の毒性評価はこれまでに行われていません。そのため、PyroSmart NextGen™を取り扱う際は注意が必要です。

#### 貯法・有効期限

有効期限はバイアルと外装に記載してあります。

表1: PyroSmart NextGen™の貯蔵方法

凍結乾燥試薬	2~8°Cで保存してください
溶解緩衝液	2~8°Cで保存してください。測定前に少なくとも30分間、室温に置いてください。
溶解後の試薬	溶解後は直ちに(20分以内)使用してください

#### 測定方法

PyroSmart NextGen™は、エンドトキシン濃度を2つの方法で定量することができます。

- 反応時間法:** 吸光度(OD)の閾値に達するまでの時間(onset time(反応時間)と呼びます)を算出します。エンドトキシン濃度が高いほど、反応時間は短くなります。反応時間の対数(Y軸)を標準品濃度の対数(X軸)に対してプロットして標準曲線を作成し、これをもとに検体中のエンドトキシン濃度を算出します。
- 反応速度法:** 試験中の平均速度(Vmean:mAbs/分)を算出します。エンドトキシン濃度が高いほど、Vmean値は高くなります。Vmean値(Y軸)を標準品濃度(X軸)に対してプロットして標準曲線を作成し、これをもとに検体中のエンドトキシン濃度を算出します。

両測定方法のソフトウェアの設定は、表2に要約してあります。

表2: PyroSmart NextGen™アッセイのソフトウェアの設定

	反応時間法	反応速度法
振盪	10秒	10秒
測定	カインेटィック法、吸光度	カインेटィック法、吸光度
波長	405nm	405/490nm*
測定間隔	30秒**	30秒**

測定時間	60分	30分
データ補正	閾値(Onset OD) = 0.03 OD	Pyros® eXpress: Vmean Gen5™: Mean V SoftMax® Pro : Vmax

\*プレートリーダーの性能によっては405/492nmを適用

\*\*間隔は、プレートリーダーによって異なることがあります

#### 試薬および器具、装置など

PyroSmart NextGen™に同梱される材料は、表3のとおりです。PyroSmart NextGen™に含まれない必要な材料と装置等は、表4のとおりです。

表3: PyroSmart NextGen™に同梱される材料

構成品	バイアル数	備考
PyroSmart NextGen™ 試薬	2	各バイアルを2.8mLの溶解緩衝液で溶解します
PyroSmart NextGen™ 溶解緩衝液	2	-

表4: PyroSmart NextGen™に含まれない必要な材料と装置等

器具と装置の種類	仕様	説明/カタログ番号*
温度制御機能付き吸光測定プレートリーダー	吸光度を測定する間、温度を37°Cに維持することができます	例 BioTek® ELx808™、Molecular Devices リーダーまたは同等品
プレートリーダーソフトウェア	反応時間または反応速度ごとのデータ解析が可能	例 ELx808™には Pyros® eXpress または Gen5™、Molecular Devices リーダーには Softmax® Pros、あるいは同等品
エンドトキシン標準品(CSE)++	PyroSmart NextGen™を用いてRSEに対して検定された10ng/バイアル	例 ACC EC010-5 または同等品
LAL 試薬用水(LRW)	妨害するエンドトキシンを含まない	例 ACC WP050C または同等品
96 ウェルマイクロプレート	非コーティング、未処理の蓋付きマイクロプレート、妨害するエンドトキシンを含まない	例 ACC CA961-10 または同等品
脱パイロジェンガラス希釈用試験管	妨害するエンドトキシンを含まず、試験を妨害しないもの	例 ACC TB240-5、TB013-5、TB016C または同等品
調整可能なシングルチャンネルマイクロピペットセット	5~20µL、20~100µL、100~1000µLの量を分注可能	以下のチップに適合する Gilson、Rainin 従来型または Eppendorf モデル、または同等品
ピペットチップ	妨害するエンドトキシンを含まない、以下の量を分注可能: 5~20µL、20~100µL、100~1000µL	例 ACC PPT25、PPT10 または同等品
リポートピペット、対応するシリンジバレル付き	定量自動分注	例 Eppendorf Xstream® リピーター + BioPur® コンビチップ 2.5mL または同等品
ポルテックスミキサー	任意	任意
タイマー	任意	任意
Parafilm M®	裏紙との接触面には通常、検出されるエンドトキシンは含まれません。	American National Can™
チューブラック	任意	任意
プレート傾斜スタンド	任意	任意

+備考: 地域によっては、入手できない製品もあります。最寄りの供給メーカーにお問い合わせください。

++備考: 試験成績書ならびにそこに表示される力価は、PyroSmart NextGen™とCSEのロットの組み合わせに特有のものです。CSEのあるロットでは、別のロットのPyroSmart NextGen™で試験を行う場合、異なる力価(EU/ng)を示すことがあります。同様に、同じロットで試験を行う場合にも、CSEのロットが違えばPyroSmart NextGen™の力価が異なる場合があります。

#### コントロール

陰性コントロール: 陰性コントロールにはLAL試薬用水(LRW)を使用します。

標準曲線: 段階的な希釈系列の標準曲線系から、必要なエンドトキシンの濃度範囲を求めます。例えば、表5をご覧ください。

表 5: 標準曲線の範囲の例および両測定方法の設定

反応時間法		
CSE(または RSE)濃度 (EU/mL)	LRW 量	CSE(または RSE) 溶液(EU/mL)
50	-	-
5	900μL	50 EU/mL を 100μL
0.5	900μL	5 EU/mL を 100μL
0.05	900μL	0.5 EU/mL を 100μL
0.005	900μL	0.05 EU/mL を 100μL
反応速度法		
CSE(または RSE)濃度 (EU/mL)	LRW 量	CSE(または RSE) 溶液(EU/mL)
0.1	1960μL	5 EU/mL を 40μL
0.05	500μL	0.1 EU/mL を 500μL
0.025	500μL	0.05 EU/mL を 500μL
0.0125	500μL	0.025 EU/mL を 500μL
0.00625	500μL	0.0125 EU/mL を 500μL

**陽性製品コントロール(PPC):** PPC は、阻害や促進のコントロールで、エンドトキシン標準品を加えた検体(または検体の希釈液)から成ります。添加するエンドトキシンは、標準曲線の中間の濃度となるようにします。例えば、標準曲線が 50~0.005 EU/mL の場合は、50μL の検体に 5 EU/mL の 5μL を添加して最終濃度を 0.5 EU/mL とします。標準曲線が 0.1~0.00625 EU/mL の場合は、50μL の検体に 0.5 EU/mL の 5μL を添加して最終濃度を 0.05 EU/mL とします。

**試験手順**

1. プレートリーダーをオンにして、37°C の平衡状態にします。
2. ソフトウェアを適切な設定にセットアップします(表 2 を参照)。
3. 適切なコントロールを調製します。
4. マイクロプレートを図 2 のとおりに準備します。マイクロプレートの準備については、以下に詳述してあります。
5. 測定します。

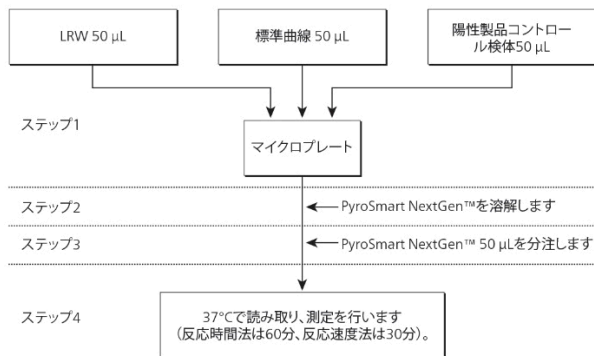


図 2: マイクロプレートの準備

**ステップ 1: 検体を移します**

50 μL の検体(陰性コントロール×2、エンドトキシン標準品希釈系列×2、検体希釈液×2、各検体希釈液に対する PPC×2)を適切なマイクロプレートウェルにソフトウェアのプレートレイアウトのとおりに移します。

**ステップ 2: PyroSmart NextGen™ 組換え LAL 試薬を溶解します**

バイアルを軽く叩いて、飛散した粉末を底に落とします。栓を無菌的に持ち上げ、真空状態を解除します。栓は廃棄します。2.8 mL の PyroSmart NextGen™ 溶解緩衝液を試薬バイアルに移し、パラフィルムを被せます。ペレットは完全に溶けるのに時間がかかるので、使用前に少なくとも 3 分間は放置してください。使用する直前に、液が均一になるようにバイアルを振り混ぜます。ただし、泡立ると感度が下がる原因となることがありますので、激しい攪拌は避けてください。溶解後は 20 分以内に速やかに使用してください。

**ステップ 3: PyroSmart NextGen™ をマイクロプレートに入れます**

プレートの蓋を取り外します。リピーターピペットセットを使用して、50 μL 定量を一度に 1 回ずつ分注します。交差汚染を避けるため、ピペットをウェルの側面に対して 45° 度に傾けて試薬を分注してください。最初に陰性コントロールに加え、次に標準品の最低濃度から最高濃度に進み、最終的に全検体に PyroSmart NextGen™ を加えます。できるだけ早く(30 秒以内)行ってください。プレートの蓋を元に戻します。

**ステップ 4: 測定します**

マイクロプレートをプレートリーダーの中に入れます。プレートの蓋を外してリーダーを閉じます。測定を開始します。

**分析測定の有効性基準**

測定を有効とするためには、表 6 に記載する基準を満たさなければなりません。

表 6: 標準曲線の範囲の例および両測定方法の設定

基準	有効性
陰性コントロール	反応時間法: 陰性コントロールの反応時間は、標準品の最低濃度のもよりも大きくなければなりません。 反応速度法: 陰性コントロールの Vmean は、標準品の最低濃度のもよりも低くなければなりません。1.0 mAbs/分以下でなければなりません。
標準曲線	標準曲線の相関係数(絶対値)は 0.980 以上でなければなりません。
陽性製品コントロール	陽性製品コントロールの回収率は、加えたエンドトキシンの表示濃度の 50~200%以内でなければなりません。

**結果**

本セクションに記述してある計算はいずれも、適切に構成設定されたソフトウェアによって自動的に実行されます。この他のお問い合わせは、テクニカルサービス(techservice@acciusa.com)までお願いします。

**エンドトキシン濃度の算出**

直線  $Y = \text{傾き} \times X + Y \text{ 切片}$  (反応時間法では、 $Y = \text{onset time}$  の対数、 $X = \text{エンドトキシン濃度の対数}$ ) (反応速度法では、 $Y = V_{\text{mean}}$ 、 $X = \text{エンドトキシン濃度}$ ) を以下のように変換した式を用いて、全検体(標準品やコントロールを含む)中のエンドトキシン濃度を算出します。

- 反応時間法: エンドトキシン濃度の対数 = (Onset Time の対数 - Y 切片) / 傾き
- 反応速度法: エンドトキシン濃度 = (Vmean - Y 切片) / 傾き

**添加した検体の PPC 回収率**

PPC 回収率% = (添加した検体の平均濃度 - 添加していない検体の平均濃度) / スパイク表示濃度 × 100%

**添加していない検体のエンドトキシン最終濃度**

希釈していない元の検体の濃度を求めるには、希釈検体中のエンドトキシン濃度に希釈倍数を掛けます。

**試験の制限**

本試験は、試験対象の検体による阻害もしくは促進の程度により制限を受けます。タンパク質を変性させる、イオンをキレートする、エンドトキシンに結合、あるいはエンドトキシンの疎水状態を変える物質は、試験を妨害することがあります。PPC 回収率が 50~200%の範囲を超えると、反応阻害が検出されることがあります。大半の場合、検体を希釈すると、妨害物質の濃度や活性は低下します。検体は LRW で希釈し、USP (5) または USP (8) に従って算出される最大有効希釈倍数を超えないようにしてください。

**その他の妨害物質:**

- 凝陽性を引き起こす各種のセリンプロテアーゼ(例えばトリプシンや活性化血液凝固因子などは、試験前に変性(例えば熱処理)させなければなりません。
- 動物の血清、アルブミンや血漿などの呈色物質
- 過度の濁度

MVD を超えない検体希釈倍数で試験の有効性が確認できない場合(1, 2)、その組換え試薬を用いる試験は代替法として使用できません。

**参考文献**

1. Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, 2012 年 7 月。
2. Guidelines on the Endotoxins Test <1085>, United States Pharmacopeia (最新改訂版), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Validation of Alternative Microbiological Methods <1223>, United States Pharmacopeia (最新改訂版), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
4. Validation of Compendial Procedures <1225>, United States Pharmacopeia (最新改訂版), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
5. Bacterial Endotoxins Test <85>, United States Pharmacopeia (最新改訂版), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
6. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia 2.4.16 (最新改訂版), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.
7. Bacterial Endotoxins Test 4.01, Japanese Pharmacopoeia (最新改訂版), Tokyo, Japan.
8. Medical Devices - Pyrogen and Endotoxins Testing <161>, United States Pharmacopeia (最新改訂版), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

**その他の文献:**

- Genetic engineering approach to develop next-generation reagents for endotoxin quantification. Innate Immunity, 23, 136-146 (2017)
- Mizumura H, Ogura N, Aketagawa J and et al. Application of a Recombinant Three-Factor Chromogenic Reagent for BET filed in the Pharmacopeias. Biol Pharm Bull(2019)42(12)2024-2037
- Muroi M, Ogura N et al.

PyroSmart NextGen™ の使用法等に関するお問い合わせ先: テクニカルサービス (techservice@acciusa.com)