



## コントロール（試験対照）

コントロールは試験の有効性を保証するために必要です。FDA (1) ならびに USP (2)、EP (3)、JP (4) により推奨手順が詳述されています。

### 1. エンドトキシンコントロール

- エンドトキシン標準品希釈系列**。試験毎にエンドキシンの保存溶液から希釈液のセットを用時調製します。希釈した濃度での安定性を確かめていない場合は、以前に調製し、保存した希釈液を使用しないでください。エンドキシン濃度が必要な範囲になるように、一定の割合で希釈します。エンドポイント法には 2 倍希釈をお勧めします。カインेटィック法にはより大きい希釈倍率を用いることができます。標準品の希釈系列におけるエンドキシンの最小濃度は、その試験の検出限界となり、λ と呼ばれます（注意：Pyrochrome® で可能なエンドポイント法とカインेटィック法の検出限度はそれぞれ 0.005 EU/mL と 0.001 EU/mL です）。必要な範囲の標準品の濃度に希釈するには、精度が最大となるよう適切なピペット分注量でできるだけ希釈回数を減らします。ガラス製や適切なプラスチック製試験管中で、または直接マイクロプレート中で希釈することができます。Pyrochrome® を用いて検出できるエンドキシンの最大濃度は方法に依存します。Pyrochrome® を使用する際の推奨加温時間を手引として参照してください。

- 標準品の希釈系列（上記 a 参照）が陽性製品コントロール（下記 c 参照）と同じ方法で調製されていない場合、**陽性コントロール**（エンドトキシン標準品の濃度を一点）を加える必要があります。陽性コントロールのエンドキシン濃度は、検量線の中点にある標準品の濃度とします。標準品の希釈系列が 0.005、0.05、0.5、5、50 EU/mL から成る場合、陽性コントロールとして適切な濃度は 0.5 EU/mL です。陽性コントロールは、水を用いて陽性製品コントロールと同じ方法で調製する必要があります。標準品の希釈系列が試験に含まれていない場合、エンドトキシン濃度の算出に以前の（保存されている）検量線のパラメーターを用いる事が適切であることを確かめるために、陽性コントロールを試験に加える必要があります。詳しくは FDA ガイドライン (1) の「Routine Testing of Drugs by the LAL Test」の項を参照してください。
- 陽性製品コントロール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もしくは検体の希釈液から成ります。試験検体に加えるエンドキシンの濃度は、陽性コントロールのエンドトキシン濃度と同じでなければなりません。陽性製品コントロールに用いる適切なエンドトキシン濃度を選択するには、上記 b 項を参照してください。加えたエンドトキシンは「スパイク」と呼ばれる事が多あります。

### 2. 陰性コントロール

各試験に LRW 陰性コントロールを加える必要があります。

### 検体の調製 - 試験用希釈の決定

試験対象の検体の種類に対して以前に確立された試験プロトコールがある場合は、測定に必要な希釈を行い、「試験の実施」の指示に従って試験を行ってください。試験対象の検体の種類に対してプロトコールが確立されていない場合、検体の 10 倍希釈系列を作成します。試験対象製品の最大有効希釈倍数の 10 倍を超えないようにしてください。（最大有効希釈倍数（MVD）と最小有効濃度（MVC）の解説と計算は、下記の「試験の制限」もしくは FDA ガイドライン (1) を参照してください。）各検体の陽性製品コントロールとともに全検体の適切な希釈液を調製します。

## 試験の実施

良好な結果を得るには、一貫した手法が必要となります。コントロールと検体の試験は全て、少なくとも二重測定する必要があります。試験の準備段階での汚染を防止するように注意してください。装置類は適切に校正し、加温温度が均一であることを確認します。

- 必要に応じて試験装置類を準備します。自動化システムでは、通常、試料の情報入力、試験パラメーターの設定、37℃に設定したインキュベーターの電源を入れることなどがあります。

- Pyrochrome® を加えた際に適切な比になるように反応容器に適量の試料（陰性コントロール、エンドトキシン標準品、検体、陽性製品コントロール）を加えます（下記 3 参照）。マイクロプレートリーダーで行う試験。ライセートと試料の比を 1：1 にします。性能を最大化するには、いずれの方法（カインेटィック法、エンドポイント法、ジアソカップリング法）を用いる場合でも、0.05 mL の試料を使用します。また、カインेटィック法やエンドポイント法では 0.1 mL を使用することもできますが、感度を最高にするため、もしくは検量線が広範囲（3 Log 範囲以上）である場合には 0.05 mL を使用することをお勧めします。

Pyros Kinetix® Flex チューブリーダーで行う試験。ライセートと試料の比を 1：1 もしくは 1：4 にします。Pyrochrome® LAL 試薬と試料の比が 1：1 で行う試験には 0.1 mL の試料が必要です。Pyrochrome® LAL 試薬と試料の比が 1：4 で Pyros Kinetix® Flex チューブリーダーで試験を行う場合、0.2 mL の試料が必要です。

- 用いる方法に適切な量の Pyrochrome® を加え、混和します。適切に混和されていない場合、良好な試験結果が得られない原因となります。大半のプレートリーダーには振とう機能が付いています。

- マイクロプレートには、ライセートと試料の比を 1：1 にし、試料の量と等量の Pyrochrome® を加えます（上記 2 参照。一般的には 0.05 mL を使用）。Pyrochrome® を出来るだけ素早く全試料に加え、5～30 秒間攪拌します。プレートをインキュベーターブロックにのせる（エンドポイント法）か、もしくは温度制御機能付きマイクロプレートリーダー（カインेटィック法）の中に入れます。

- 個々の反応管やキュベットを用いる場合、加える Pyrochrome® の量は、試料と等量（Pyros Kinetix® Flex チューブリーダーでは 0.1 mL）もしくは試料の 4 分の 1 になります（Pyros Kinetix® Flex チューブリーダーでは 0.05 mL）。重要：各チューブの反応時間は同一でなければいけません。Pyros Kinetix® Flex チューブリーダーの場合、機器挿入時に反応管が検出され、時間計測が始まります。各反応容器に順番に Pyrochrome® を加え、約 2 秒間攪拌し、インキュベーター（エンドポイント法）もしくはチューブリーダー（カインेटィック法）に反応用容器を入れます。

マイクロプレートを用いるか反応用チューブを用いるかに関係なく、Pyrochrome® を加えるには連続ピペッターが便利です。

試薬を取り扱う際には、Pyrochrome® のバイアルの汚染に注意してください。

### 4. 測定

- カインेटィック法では、最小濃度のエンドトキシン標準品が onset OD405 に達するまでにかかる時間より有意に長い時間、全試料が加温されるまで試験を行います。自動化試験システムでは通常、事前にセットされた時間を過ぎると試験を終了します。推奨される標準的な加温時間については、お問い合わせください。

- エンドポイント法では、正確に加温時間を測定し、インキュベーターからマイクロプレートもしくは反応用管を取り出し、50% 酢酸を加えて（酢酸の終濃度が 10% 以上になる量。試料と Pyrochrome® の量が 0.05 mL の場合は 0.025 mL を加えます）反応を止め、分光光度計またはマイクロプレートリーダーを必要に応じて用い 405 nm で吸光度 (OD) を測定します。各試料の加温時間が同じ (± 30 秒以内) になるように試験の準備をして、測定を行います。加温時間は必要なエンドキシンの濃度範囲に依存し、Pyrochrome® のロットが異なると加温時間も異なる可能性があります。適切な加温時間を決めるために予備試験が必要となる場合があります。推奨される標準的な加温時間を参照してください。

- ジアソカップリングを用いたエンドポイント法では、インキュベーターから反応管もしくはマイクロプレートを取り出し、0.05 mL の塩酸で溶解した亜硝酸ナトリウム (溶液 1) を添加して反応を止め、プレートを攪拌します。次いで各ウェルに 0.05 mL の溶液 2（スルファミン酸アンモニウム）を別のピペットチップで加え、攪拌します。最後に各ウェルに 0.05 mL の溶液 3（NEDA）を別のピペットチップで加え、攪拌します。ただちに赤紫色の発色が見られます。540～550 nm で吸光度を測定します。各試料の加温時間が同じ (± 30 秒以内) になるように試験の準備をして、測定を行います。加温時間は必要なエンドキシンの濃度範囲に依存し、Pyrochrome® のロットが異なると加温時間も異なる可能性があります。

適切な加温時間を決めるために予備試験が必要となる場合があります。

## 結果

### 1. 予備計算

カインेटィック法では、データ補正後、試料の吸光度が特定のしきい値である吸光度（通常 0.03 OD ユニット）に達するまでの時間を計測します。吸光度は、最初の測定値をゼロ OD ユニットとした表示する必要があります。マイクロプレートリーダーの多くは、この計算を行うために必要なソフトウェアパッケージを搭載しています。OD 値に達するまでにかかる時間を onset time と呼びます。

### 2. 検量線の作成

- カインेटィック法には、onset time の対数をエンドトキシン標準品の濃度の対数に対して回帰させ検量線を作成します。回帰直線の方程式により検量線を作成します。検量線の相関係数の絶対値が 0.980 以上であれば（下記の「判定」の 2 項参照）、エンドキシン濃度を算出するために二次多項式（二次方程式）からなる回帰式を用いることができます。

- エンドポイント法では、測定した吸光度をエンドトキシン標準品の濃度に対してプロットし、検量線を作成します。

### 3. エンドトキシン濃度の算出

直線 Y = aX + b を X = (Y - b) / a に変換した方程式を用いて、全検体（標準品やコントロールを含む）中のエンドキシン濃度を算出します。

式中：

Y = onset time の対数（カインेटィック法）もしくは吸光度（エンドポイント法）

X：カインेटィック法では、X = エンドトキシン濃度の対数（エンドトキシン濃度を計算するためには X の逆対数を求める必要があります）

エンドポイント法では、X = エンドトキシン濃度

a = 直線の傾き

b = Y 切片

元の希釈していない試料の濃度を求めるには、検量線から算出されたエンドキシン濃度に試料の希釈倍数を掛けます。

これらの計算は一般的にエンドキシン試験ソフトウェアで行います。

## 判定

- 試験が有効であるためには、陰性コントロールのエンドトキシン濃度（検量線を外挿して概算します）がエンドトキシン標準品の最低濃度より有意に低くなければなりません。
- 試験に含める検量線の相関係数が絶対値で 0.980 以上でなければなりません。
- 陽性コントロールのエンドトキシン濃度の測定値の平均は（保存検量線を検証するためには、表示された濃度の ± 25% 以内でなければなりません。従って、陽性コントロールが 0.125 EU/mL であった場合、濃度の測定値は 0.09375 ～ 0.15625 EU/mL の間でなければなりません。

- エンドキシンの濃度は、エンドトキシン標準品の最小濃度から最大濃度までの範囲に限って報告することができます。この濃度の範囲から外れた検体の結果は、最小濃度以下（検出不能）または最高濃度以上として報告する必要があります。エンドポイント法では、有効なエンドトキシン濃度は、検量線の直線部分にある OD 値からのみ計算できます。

- 検体が LAL やエンドキシンの反応を有意に妨害していないことを証明するには、陽性製品コントロールのエンドトキシン濃度の測定値が、加えたエンドキシン「スパイク」の表示濃度の 50～200% 以内でなければなりません。これらの限度値内にスパイクが収まるかを決める前に、検体（スパイクのない）のエンドトキシン濃度を引き算します。例えば、有意な妨害がないと考えるには、0.125 EU/mL の陽性製品コントロール（スパイクのない検体のエンドトキシンを引き算した後）において、エンドキシン濃度の測定値が 0.0625 ～ 0.25 EU/mL (0.125 EU/mL の 50～200%) の範囲内でなければなりません。スパイクのない検体のエンドトキシン濃度の測定値が 0.028 EU/mL で陽性製品コントロールが 0.163 EU/mL であった場合、スパイクによるエンドキシン濃度は 0.163-0.028=0.135 EU/mL になります。これは上記の範囲内に入り、他の条件を満たしているとすれば、この試料の試験は有効となります。

## 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。最小有効濃度（MVC）以上の検体濃度で試験の有効性が確認出来ない場合（1、2）、LAL 試薬を使用する細菌エンドトキシン試験を USP 発熱性物質試験の代用にはできません。MVC は以下の式で算出されます。

MVC
=



(
λ
)
(
検体投与量
)


(
エンドトキシン許容量
)




{\displaystyle MVC = {\frac {(\lambda )(検体投与量)}{(エンドトキシン許容量)}}}

式中の単位は、λ が EU/mL、検体投与量が体重 1 kg あたりのユニット、エンドトキシン許容量が EU/kg です。

最大有効希釈倍数（MVD）は MVC を含む検体の希釈倍率です（1）。最初の検体濃度を MVC で割り算して計算します。

エンドトキシン許容量は、脊髄腔内投与の薬剤では 0.2 EU/kg、非経口的に投与される他の全製品では 5 EU/kg です。医療機器の限度は、USP (18) に記載された方法で調製される抽出液もしくは洗浄液量 1 mL 当たりで表されます。脳脊髄液と接触しない機器では、許容量はデバイスあたり 20 EU、脳脊髄液と接触するものではデバイス当たり 2.15 EU です。FDA ガイドライン (1) によると、液状デバイスの許容量は薬剤と同じです。

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類）の中には試験前に変性（例えば熱処理）させていない場合、偽陽性の原因となるものがあります。動物の血清、アルブミンや血漿などの黄色を呈する物質は、pNA に基づく比色法を妨害することがあります。この場合にはジアソカップリング法（Associates of Cape Cod, Inc.、カタログ番号 CD060）を使用してください。試料中の過度の濁度が試験を妨害することがあります。

## 予測値

検体中のエンドトキシンは、検量線を作成するために用いたエンドトキシン標準品の濃度の範囲内で定量することができます。阻害や促進を排除するために検体を希釈する必要がある場合、検出出来るエンドキシンの最小量は希釈に応じて増加します。生物学的原料由来の物質は、生化学的に精製した後も測定できるレベルのエンドトキシンを含んでいる可能性があります。蒸留、逆浸透、限外濾過等により得られた水は、精製工程が正しく稼働し、作られた後に汚染されていないれば、検出できる量以下のエンドトキシンしか含んでいない可能性があります。

## 文献

- Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
- Bacterial Endotoxins Test, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia (current revision), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.
- Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.
- Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.
- Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
- Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol. Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
- Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
- Levin, J., and F. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
- Levin, J. and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
- Nakamura, S., T. Morita, S. Iwanaga, M. Niwa, and K. Takahashi. 1977. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes. J. Biochem. 81:1567-1569.
- Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
- Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231. Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.
- Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125- 136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5. 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.
- Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419.
- Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.
- Sweet, B. H. and J. F. Huxsoll. Depyrogenation by Dry Heat, ch. 12, p.101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7. 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
- Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

弊社の経験豊かなスタッフが、LAL 試験に関する実用面や理論面についてご相談に応じます。Pyrochrome® の使用についてのご質問がある場合は電話でお問い合わせください。製品仕様にとくわない弊社製品は全て交換いたします。返品前にカスタマーサービスにご連絡ください。