

<p><i>Limulus</i> Amebocyte Lysate</p>	
PYROCHROME[®]	
製造業者:	電話: +1 (508) 540-3444 無料通話: +1 (888) 395-2221 ファックス: +1 (508) 540-8680 テクニカルサービス: +1 (800) 848-3248 カスタマーサービス: +1 (800) 525-8378
	
PN000856ja rev4	2019年10月

カプトガニ血球抽出成分 PYROCHROME[®] 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

カプトガニ血球抽出成分 (LAL) テストは、米国食品医薬品局 (FDA) のガイドライン (1) に準じて適用される場合、 (1) 「ヒト用注射剤 (生物学的製剤など)、動物用注射剤のエンドポイントテスト」に使用することが可能です。LAL 試験は、これらの製造に用いる水等の原材料中のエンドトキシンの定量や製造工程におけるエンドトキシン値のモニタリングに推奨されています。USP 細菌エンドトキシン試験法 (2) は、特定の USP モノグラフ類に参考として引用されている公式の LAL 試験法であると共に、欧州薬局方 (EP) 及び日本薬局方 (JP) の当該試験法(3,4) とも調和されています。

試験の概要

カプトガニ血球抽出成分は、カプトガニである *Limulus polyphemus* の血球 (amebocyte) の水溶性抽出物です。エンドトキシンの存在下で、LAL 中の複数の凝固因子がタンパク質分解カスケードにより活性化され、Pyrochrome[®] LAL 中に存在する無色の合成ペプチド基質を分解します。この反応により、黄色を呈し 405 nm に吸収を持つパラニトロアニリン (pNA) が遊離します。Pyrochrome[®]を等量の検体に加え、反応混液を 37℃で加温することで LAL 試験を行います。検体中のエンドトキシン濃度が高いほど、pNA は速く産生されます。Pyrochrome[®]では、エンドトキシンを 2 つの方法で定量することができます (5) 。カイネティック法では、405 nm で特定の吸光度に達するまでの時間 (onset time) を測定します。エンドトキシンの濃度が高いほど、onset time は短くなります。この測定には、制御された温度 (通常 37℃) で多数の検体を加温し、一定の間隔で吸光度を測定するための装置が必要となります。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プロットして検量線を作成し、この検量線を検体中のエンドトキシンの濃度を算出するために使用します。一方、エンドポイント-比色法においては、一定の時間加温した後、遊離した pNA の量を測定します。測定した吸光度を既知のエンドトキシン標準品の濃度に対してプロットした検量線を用いて、検体中のエンドトキシン濃度を算出します。

Pyrochrome[®]による試験法は、迅速で特異性が高く、簡便に行える上に高感度です。検出限度は使用方法と使用装置類によって違いがありますが、最高感度は 1 mL 当たり 0.001 エンドトキシユニット (EU) となります。検量線での線形回歸分析にて判定基準がすべて満たされていれば、多項式回歸による検量線の作成も可能です。

経緯と生物学的原理

Howell がカプトガニの血液凝固について報告したのは 1885 年のことでした (6) 。1950 年代、米国マサチューセッツ州ウッズホールにある Marine Biological Laboratory で、Bang はグラム陰性細菌がカプトガニの血液を凝固させることを発見しました (7) 。Levin と Bang は後に、この反応は酵素反応によるもので、これらの酵素は、血球細胞中の顆粒に局在していることを明らかにしました (8,9) 。両氏はさらに、エンドトキシンもしくはリポ多糖と呼ばれる細菌細胞壁に特徴的な構成成分により凝固が開始されることを明らかにしました (10) 。現在では、この反応は段階的な酵素活性化反応のカスケードから成り、coagulogen と呼ばれるタンパク質の切断で反応が終了すると考えられています。coagulogen の切断産物 (coagulin) は不溶性であり、イオン性相互作用により重合します。十分な量の coagulin が形成されると混濁が見られ、その後にゲル化が起こります。この相互作用がカプトガニ血球抽出成分 (LAL) 試験と呼ばれるエンドトキシン測定の基本となっています。1977 年、日本人研究者らにより、エンドキシンで活性化された LAL は、coagulogen に類似したアミノ酸切断部位と発色団であるパラニトロアニドを有する小さな発色性ペプチドも切断することが見出されました (11) 。この切断により黄色を呈し 405 nm で光を吸収する pNA が遊離します。LAL 試験にこの発色を取り入れる中で、LAL に発色性基質を加える際、coagulogen 濃度を下げ、反応干渉を最小限に抑えています。従って、エンドトキシン

を発色性 LAL 試薬に加えると、濁度やゲル化より先に発色が見られます。LAL 試験の全種類 (ゲル化、比濁法、比色法) において、存在するエンドトキシンの量が増加すると、エンドポイント (ゲル化、濁度、色) の発現が速くなります。LAL 試験の種類、反応、適用に関するさらに詳しい情報は文献中から入手することができます (12, 13, 14) 。

試薬

Pyrochrome[®]は (3.2 mL 用) パイアルに凍結乾燥状態で充填されています。Pyrochrome[®]には *Limulus polyphemus* の水溶性血球抽出物、安定化剤、塩類、緩衝液、発色基質が含まれています。

Pyrochrome[®]には特定の感度の表示はありません。ある試験の感度 (λ と表記) は、検量線を作成するために用いたエンドトキシンの最低濃度になります。Pyrochrome[®]の最高感度 λ は、カイネティック測定法では 0.001 EU/mL、エンドポイント測定法では 0.005 EU/mL です。Pyrochrome[®]は in vitro の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診断用には使用できません。Pyrochrome[®]の毒性は測定されていません。しかし、LAL が長時間もしくは繰り返し皮膚に触れると、I 型アレルギー反応を起こすことがあります (15) 。従って Pyrochrome[®] の取扱いには注意が必要です。

調製手順 :

- Pyrochrome[®]のパイアルを軽く叩いて、飛散した粉末を底に落とします。灰色の栓を持ち上げ、真空状態を解除します。パイアルの口の部分を汚染しないようにしてください。栓をはずし、廃棄します。ゴム栓に針を刺しての注入やゴム栓の再使用は避けてください。LAL の粉末が少量、栓に残ってても、試験には影響がありません。
- Pyrochrome[®]を 3.2 mL の Pyrochrome[®] 緩衝液もしくは Glucashield[®] 緩衝液 (Associates of Cape Cod, Inc.から別売) を添加して溶解します。マイクロブローダーで測定する際に、0.001 EU/mL の感度を得るためには、Glucashield[®]を用いてPyrochrome[®]を調製する必要があります。チューブリーダー (試験管用吸光度計) で測定する際には、Pyrochrome[®]調製用緩衝液もしくはGlucashield[®]緩衝液どちらを使用してもこの感度を得ることができます。凍結乾燥粉末 (ペレット) が溶けるまでに数分かかるので、使用前に少なくとも5分間は放置してください。液が均一になるようにパイアルを振り混ぜます。しかし、泡立て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。使用しない時はパイアルをParafilm M[®]で被い、冷所 (2~8℃) で保存します。Pyrochrome[®]は調製後8時間以内に使用してください。

保存条件

凍結乾燥した Pyrochrome[®]は比較的安定で、適切に保存された場合、ラベルに表示された有効期限までは活性が完全に保持されます。2~8℃で本製品を保存してください。温度が 37℃を超えるると凍結乾燥した Pyrochrome[®]が急速に劣化し、感度が下がり、製品に明らかな質変が認められるようになります。温度が上がらないように、Pyrochrome[®]は断熱容器に入れて発送されます。溶解前の Pyrochrome[®]は光に不安定ですので、暗所で保存してください。

Pyrochrome[®]の溶解液は通常、透明でやや乳白色を呈しています。ロットによっては、均一な濁りがわずかに見られることがあります。微細な繊維や糸状の物質があっても、汚染ではなく活性に影響はありませんが、羊毛栓の塊が見られたり、黄色に変色した場合は劣化の現れですので、その際は試薬を使用しないでください。調製した Pyrochrome[®]は凍結乾燥品に比べ不安定です。調製後のパイアルの保存時間は 2~8℃8 時間以内となります。最高の感度を得るためには調製直後の試薬を用いることが必要になることもあります。溶解後の Pyrochrome[®]は凍結できません。

検体の採取と調製

検体はエンドトキシンフリーの容器に無菌的に採取します。容器表面へのエンドトキシンの吸着を最小限度に抑えるために、再利用し、脱バイロジェン処理したガラス製品や使い捨てポリスチレンまたはポリエチレンテレフタレート (PET) 製プラスチック製品をお勧めします。プラスチック製の容器の中には、エンドトキシンが検出されるものがあります。また、プラスチック製の製品の中には、製品から抽出される物質が試験を妨害するものもあります。器具が試験に使用できるかどうかを調べる必要があり、これには器具類の中から無作為に容器を選び、少量の LAL 試薬用水 (LRW) を使い室温で一時間洗浄し、その洗浄液を検体として試験を行います。洗浄液に含まれるエンドトキシンの量は使用される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。また、既知量のエンドトキシンを加え、その回収量を測定し、洗浄液が試験を阻害または促進することがないことを確認する必要があります。反応混液 (検体または検体の希釈液を等量の Pyrochrome[®]と混ぜたもの) の pH は 6~8 でなければなりません。検体の pH を HCl、NaOH、または緩衝液 (エンドトキシンが検出されない) で調整します。濃い HCl や NaOH を LRW で適切な濃度に希釈し、試験検体を著しく希釈しない程度の量を pH 調整に使用します。pH 調整の途中で試料中に沈殿物が形成された場合は、pH を調整する前に試料を希釈します (MVD を超えないようにしてください)「試験の制限」参照)。

緩衝液のない生理食塩水や水の pH を調整しようとししないでください。希釈するだけで pH に関する問題が解決することがある事に留意してください。

タンパク質を変性させる物質、イオンをキレートする物質、エンドトキシンを結合する物質、エンドトキシンの疎水性を変化させる物質は、試験を妨害する可能性があります。妨害物質の検出には、既知量のエンドトキシン標準品を検体に加え、回収されるエンドトキシンの量が有意に増加または、減少しているかを調べます (「試験の制限」の項参照)。大半の場合、検体を希釈すると、妨害物質の濃度や活性が減少し、有効な試験結果を得ることができます。適切なコントロール (試験対照) や希釈方法は「試験手順」に説明されています。検体採取後、試験は出来るだけ早く行ってください。試験前に無菌ではない検体を保存または発送する場合は、検体を凍結することを勧めます。検体中に含まれるエンドトキシンの濃度が低いことが予想される場合には、保存中のエンドトキシンの低下を調べる必要があります。

試験手順

Pyrochrome[®]のセットに含まれている試験試薬

- Pyrochrome[®] (上記の「試薬」と「調製手順」参照)。
- Pyrochrome[®]溶解用緩衝液 (カタログ番号C1500に添付)。上述したように Pyrochrome[®]の溶解にこの緩衝液を使用します。
- Glucashield[®]溶解用緩衝液 (カタログ番号CG1500に添付)。上述したように Pyrochrome[®]の溶解にこの緩衝液を使用します。

Pyrochrome[®]別売試薬

- エンドトキシン標準品 (CSE)。(Associates of Cape Cod, Inc., カタログ番号 EC010。) CSE を試験成績書 (CSE の力価が記載されている) に明記された量を用いて添付文書の指示に従って調製します。添付文書の指示に従ってエンドトキシン標準品を使用、保存します。CSE の力価はU.S.参照エンドトキシン標準品 (RSE) に対して測定されておらず、試験成績書に表示されています。USP エンドトキシン標準品 (RSE と同等品) はU.S. Pharmacopeial Convention, Inc.から入手できます。注意：試験成績書とそこに記載されている力価はPyrochrome[®]とCSEのロットの組み合わせに特有のもです。CSEのあるロットでは、違うロットのPyrochrome[®]やPyroteil[®]もしくは他ブランドのLAL試薬を使用して試験を行った場合、力価 (EU/ng) が異なることがあります (1) 。同様に、同じロットのPyrochrome[®]で試験を行った場合でも、CSEのロットが違くと力価が異なることがあります。正しい試験成績書と力価を使用するようにしてください。

検量線を作成するためにエンドトキシン標準品を希釈する場合や陽性コントロール及び陽性製品 (妨害) コントロールにCSEを使用します。

- LAL 試薬用水 (LRW)。LRW の購入には Associates of Cape Cod, Inc.をお勧めします (様々な大きさの梱包形態が利用可能です)。LRW として使用が可能であることが確かめられれば、市販の静菌剤フリーのUSP注射用水 (滅菌WFI) もしくはUSP灌流水を使用することができます。USP滅菌WFIのエンドトキシン限度値は0.25 EU/mLであるため、USP滅菌WFI中にエンドトキシンが検出され、使用には適さない可能性があります。

水がLRWとして使用できることを確かめるために、水を検体として陽性製品コントロールとともに試験を行います (「コントロール (試験対照)」に関するセクションの1.c項参照)。試験済みLRWを標準品の希釈や陽性コントロールの調整に使用します (「コントロール」の1.a項と1.b項参照)。標準品のonset time やエンドポイント測定により検量線を作成します。相関係数は0.980 (絶対値) 以上でなければなりません。試験を行う水のエンドトキシン濃度は、エンドキシンの最低濃度より下の範囲に検量線を外挿して算出し、標準品の最低濃度より有意に低くなければなりません。また、陽性製品コントロールのエンドキシン濃度は、陽性コントロールのエンドトキシン濃度 ±25% の範囲内でなければなりません。

- 50%酢酸 (エンドポイント法用)。氷酢酸を等量の蒸留水または逆浸透 (RO) 水に加えて調製します。(LRW (上記2参照) を使用できますが、その必要はありません。)

器具と装置

- マイクロプレート、96穴、蓋つきマイクロプレート (Associates of Cape Cod, Inc. より入手可能、カタログ番号CA961)。プレートはエンドトキシンやグルカンの混入に関する保証もしくは試験を受けている必要があり、反応阻害や促進の原因とはなりません。使用前にマイクロプレートを調べ、ウェルの底の表面や中に傷や他の光学上の妨害となるものがあった場合は廃棄してください。
- 反応用チューブ。カイネティック法は、8×75 mmの脱バイロジェン処理済みホウケイ酸ガラス培養管 (Associates of Cape Cod, Inc., カタログ番号TK100) を用いてPyros Kinetix[®] Flexのような加温チューブリーダーを用いて実施することができます。エンドポイント法も8×75 mmもしくは10×75 mmの脱バイロジェン処理済みホウケイ酸ガラス培養管 (Associates of Cape Cod, Inc., カタログ番号はそれぞれTK100とTB050) を用いて実施することができます。

- 405 nmもしくはジアソニ化法用には540~550 nmで測定出来る光学リーダー。カイネティック法にはBioTek[®] ELx808[™]もしくはMolecular Devices VersaMax[™]のような温度制御機能付きマイクロプレートリーダー、またはPyros Kinetix[®] Flex チューブリーダー (Associates of Cape Cod, Inc., カタログ番号PKF32、PKF64、PKF96) のようなチューブリーダーを使用してください。エンドポイント法には、マイクロプレートで測定を行うためのマイクロプレートリーダーを使用し、試験を反応用チューブで行う場合には適切なキュベットを用いて分光光度計を使用してください。

- 37±1^o Cを維持できるインキュベーター (エンドポイント法にのみ必要)。マイクロプレート (もしくは適切な場合は反応用チューブ) 用にはドライボックスインキュベーターをお勧めします。(エンドポイント法で反応用チューブを用いる場合はウォーターパスも使用できます。) インキュベーターは温度が均一に分布していなければなりません。

- 希釈液や反応用チューブを立てて、加温するための試験管立て。

- ピペット、ピペットチップのついたマイクロピペット (マイクロプレートを使用する場合はマルチチャンネルピペッターが便利ですが)、またはプラスチック製注射筒がついた連続ピペッター。妨害するエンドトキシンやグルカンのない使い捨てピペットやチップをお勧めします。Associates of Cape Cod, Inc.から妨害するエンドトキシンやグルカンがないことを保証したPyroclear[®]製品が販売されています。

- ボルテックスミキサー。

- Parafilm M[®] (American National Can[™])。裏張りの紙と接触している側は、一般的に検出されるエンドトキシンがありません。

- エンドトキシン標準品や試験検体の希釈を行うのに適した容量の、妨害するエンドトキシン汚染のない試験管。希釈に適した容器については「検体の採取と調製」を参照してください。

- ガラス器具の脱バイロジェン用の250℃以上の温度に加熱できる温風オーブ。一般的に使用される脱バイロジェンサイクルでは、オーブ中の全ての器具類が少なくとも250℃に30分間曝されます (2, 16, 17) 。

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。

- 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。試験毎にエンドト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。エンドトキシン濃度が必要範囲になるように、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。カイネティック法にはより大きい希釈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ト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ネテ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ト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。

b. 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トキシン濃度は、検量線の中点にある標準品の濃度とします。標準品の希釈率が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。

c. 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」と呼ばれる事が多くあります。

- 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事を確認します。

- 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、ジアゾカップリング法）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。カバーを外してプレートを読んてください。

- 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トが便利です。

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。

- 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ト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。

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

- 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。

- 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）、エンドト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。

- エンドトキシン濃度の算出**

直線

Y
=
a
X
+
b

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）中のエンドト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ト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ト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。

- エンドトキシンの濃度は、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やエンドト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、加えたエンドトキシン「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、エンドト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トキシン濃度は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することはできません。MVCは以下の式で算出されます。

M
V
C
=

(
λ
)
(
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。この場合にはジアゾカップリング法（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、検出出来るエンドト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で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ければ、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 Pharmacopeial 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.

- 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, 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。製品仕様にそ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。