

遺伝子組換えLAL試薬
PyroSmart NextGen™
取扱説明書

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
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA

PH002641-JA rev3

2021年9月

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ネテ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(1,2,3)。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>(4,5)に記載されています。代替え試験法は、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。公定書未取載品(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で吸収を示し黄色を呈するパラ-ニトロアニリン(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 ± 1°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。

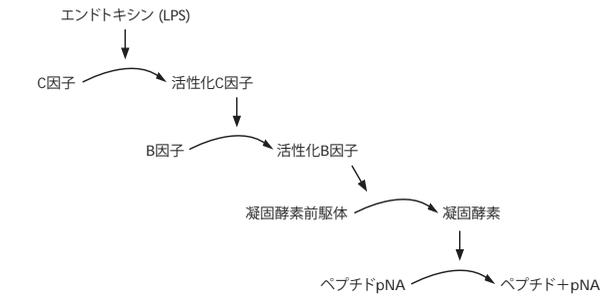


図1：エンドトキシンによるC因子活性化に始まり、pNAの遊離により吸光度が増すカスケード機構

表1: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	-

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。

凍結乾燥試薬	2〜8°Cで保存してください。使用前に少なくとも30分間置いて室温の平衡状態にしてください。
溶解緩衝液	2〜8°Cで保存してください。使用前に少なくとも30分間置いて室温の平衡状態にしてください。
溶解後の試薬	室温:溶解後3〜20分以内に使用してください。

1. 吸光測定マイクロプレートリーダーを用いたPYROSMART NEXTGEN™の操作

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。

両種類の測定方法のソフトウェアの設定は、表3に要約してあります。

	反応時間法	反応速度法
振盪	10秒	10秒
測定	カイネティック法、吸光度	カイネティック法、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	Onset OD = 0.03 または 閾値mOD = 30	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1のとおりです。PyroSmart NextGen™に含まれないその他の必要な材料と装置等は、表4のとおりです。

表4:PyroSmart NextGen™に含まれない、マイクロプレートリーダーアッセイに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マイクロプレートリーダー	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® Pro、あるいは同等品
エンドトキシン標準品 (CSE)++	PyroSmart NextGen™を用いてCRSE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ない	例 ACC TB240-5、TB013-5、TB16C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
リピートピペット、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®コンピチップ 2.5mLまたは同等品
ボ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のロットが違うと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。

反応時間法		
CSE(またはRSE)濃度 (EU/mL)	LAL試薬用水量	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)	LAL試薬用水量	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。添加するエンドキシンは、標準曲線の中点の濃度となりますようにします。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

- 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。
- ソフトウェアを適切な設定にセットアップします(表3を参照)。
- 適切なコントロールおよび検体を調製します。

- 図2のとおりに試験測定の前準備を行います。試験手順については、以下に詳述してあります。

- 測定します。

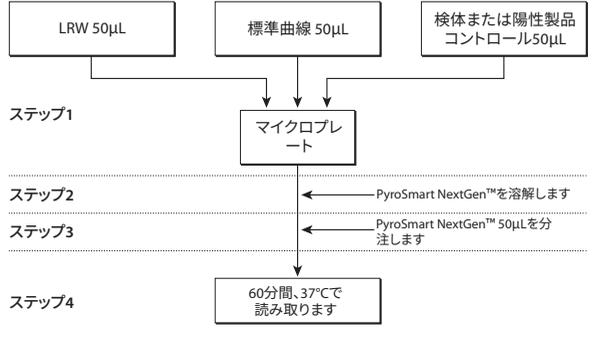


図2:マイクロプレートリーダーアッセイの試験手順の概要

ステップ1:検体を移します

50µL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

試薬と溶解緩衝液の両方を室温の平衡状態になるまでそのままにしてください。試薬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。2.8mL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。バイアルを最初の1分間、軽く振り混ぜたら、次の2分間はそっとしておきます(使用前の合計3分間で溶解させます)。泡立過ぎて感度が下がらないようにするため、使用前に繰り返し攪拌しないでください。必要以上に泡立てる場合は、10分間そっとしておくか、手動ピペットを使って分注し、泡を避けてください。試薬は必ず、溶解後20分以内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。溶解した試薬を滅菌済みコンピチップに充填し、50µL定量を一度に1回ずつ分注するように設定します。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°に傾けて試薬を分注してください。電子ピペットを使用する場合は、5以下の分注速度か泡を避けるのにお勧めです。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PyroSmartNextGen™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。

2. PYROSMART NEXTGEN™のPYROS®KINETIX FLEXチューブリーダーを用いた操作

測定方法

PyroSmart NextGen™では、エンドトキシン濃度の定量に**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)を使用できます。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。

チューブリーダーソフトウェアの設定は、使用するソフトウェアの種類に応じて表6または図3に説明しています。

	一般設定
測定	カイネティック法、吸光度
波長	405nm
測定間隔	10秒
測定時間	80分
データ補正	閾値(mOD) = 20
ベースライン調整	オン、125〜325秒

Pyros® eXpressの個別の設定:

*Name	Instrument	Tube	*ADC Zero Start (s)	*ADC Zero End (s)
PyroSmart NextGen - Tube Reader	Tube Reader	▼	30	90
Read Interval (s)	Primary Wavelength (nm)	Reference Wavelength (nm)	*OD Threshold (mOD)	*OD LR Window (s)
10	405		20	30
Assay Type			*OD Zero Start (s)	*OD Zero End (s)
<input checked="" type="radio"/> Onset <input type="radio"/> Vmean <input type="radio"/> Vmax			120	170
Reagent	**Maximum Test Time (s)	Standard Curve	Unit	<input checked="" type="checkbox"/> Log Concentrations <input checked="" type="checkbox"/> Log Predictor
PyroSmart NextGen	4800	▼	EU/mL	
*Default Standard Concentrations	*Default PPC Concentration	Negative Control		
<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 0.1 <input type="checkbox"/> 0.01 <input type="checkbox"/> 0.001	0.1	▼		
<input type="checkbox"/> 10 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 0.1 <input type="checkbox"/> 0.01 <input type="checkbox"/> 0.001	0.1	10		

図3：Pyros® eXpressソフトウェアのPyroSmart NextGen™アッセイの設定

試薬および器具、装置など

PyroSmart NextGen™に同梱される材料は、表1のとおりです。PyroSmart NextGen™に含まれないその他の必要な材料と装置等は、表7のとおりです。

表7：PyroSmart NextGen™に含まれない、チューブリーダーアッセイに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+
温度制御機能付きチューブリーダー	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	Pyros® Kinetix Flex
チューブリーダーソフトウェア	反応時間ごとのデータ解析が可能	Pyros® eXpressまたはPyros® EQS
エンドキシン標準品 (CSE)++	PyroSmart NextGen™を用いてCRSE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)	妨害するエンドキシンを含まない	例 ACC WP050Cまたは同等品
8×75mm 脱パイロジェン処理済み反応管	ホウケイ酸、妨害するエンドキシンを含まない	例 ACC TK100-10または同等品
脱パイロジェンガラス希釈用試験管	妨害するエンドキシンを含まない	例 ACC TB240-5、TB013-5、TB16C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
リピートピペット、対応するシリンスパレル付き	定量自動分注	例 Eppendorf Xstream®リピーター+BioPur® コンピチップ 2.5mLまたは同等品
ボ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、検出されるエンドキシンは含まれません。	American National Can™
チューブラック	任意	任意
反応管用チューブラック	PK Flexに同梱	

+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のロットが違くと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、必要なエンドキシンの濃度範囲を求めます。例えば、表8をご覧ください。

表8：標準曲線の範囲および設定の例

CSE (またはRSE) 濃度 (EU/mL)	LAL試薬用水量	CSE (またはRSE) 溶液 (EU/mL)
50	-	-
1	4,900μL	50 EU/mLを100μL
0.1	900μL	1 EU/mLを100μL
0.01	900μL	0.1 EU/mLを100μL
0.001	900μL	0.01 EU/mLを100μL

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。添加するエンドキシンは、標準曲線の中点の濃度となるようにします。例えば、標準曲線が1～0.001 EU/mLの場合は、200μLの検体に1 EU/mLの20μLを添加して最終濃度を0.1 EU/mLとします。

試験手順

- チューブリーダーをオンにして、37°Cの平衡状態にします。
- 使用する個別のソフトウェアに適したソフトウェアの設定にセットアップします (Pyros® EQSは表6を、Pyros® eXpress) は図3を参照)。
- 適切なコントロールおよび検体を調製します。
- 図4のとおりに試験測定の準備を行います。試験の準備については、以下に詳述してあります。
- 測定します。

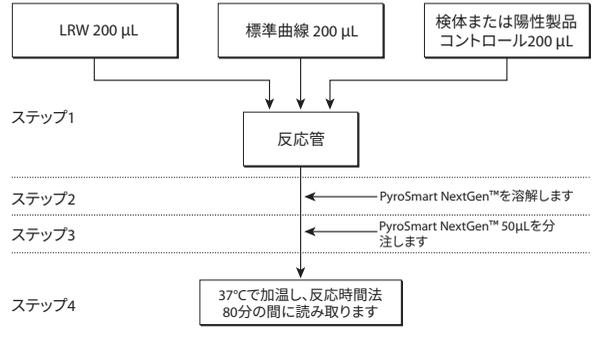


図4：チューブリーダーアッセイの試験手順の概要

ステップ1: 検体を移します
200μLの検体 (陰性コントロール×2、エンド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)を適切な反応管にソフトウェアの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
試薬と溶解緩衝液の両方を室温の平衡状態になるまでそのままにしてください。試薬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。バイアルを最初の1分間、軽く振り混ぜたら、次の2分間はそっとしておきます (使用前の合計3分間で溶解させます)。泡立過ぎて感度が下がらないようにするため、使用前に繰り返し攪拌しないでください。必要以上に泡立てる場合は、10分間そっとしておくか、手動ピペットを使って分注し、泡を避けてください。試薬は必ず、溶解後20分以内に使用してください。

ステップ3: 反応管にPyroSmart NextGen™を分注します
溶解した試薬を滅菌済みコンピチップに充填し、50μL定量を一度に1回ずつ分注するように設定します。ピペットを反応管に対して45°度に傾けて (この時、反応管の内側の壁面に触れないようにしてください)、陰性コントロールの最初のレブリケートに試薬50μLを分注してください。反応管を1秒間ボルテックスしたらすぐに、チューブリーダーの1番目のウェルに入れます。残りの陰性コントロールの反応管も同様に繰り返します。次に標準曲線を作成します。一度に反応管1本ずつ最低濃度から最高濃度に進みます。その後、検体に進みます。

ステップ4: 測定します
測定は各反応管が挿入されると自動的に開始されます。測定は完了するまで実行します。

全アッセイの分析測定の有効性基準

測定が有効になるためには、表9に記載する基準を満たさなければなりません。

表9：標準曲線の範囲および全アッセイの設定の例

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のよりも大きくなければなりません。 反応速度法 (プレートリーダー法のみに適用):陰性コントロールのVmeanは、標準品の最低濃度のものよりも低くなければなりません。1.0 mAbs/min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。

エンドキシン濃度の算出
標準品に対して以下のように変換した直線式を用いて、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。

- 反応時間法:**
エンドキシン濃度の対数 = (Onset Timeの対数 – Y切片) / 傾き
- 反応速度法 (プレートリーダー法のみに適用):**
エンドキシン濃度 = (Vmean – Y切片) / 傾き

反応時間法には、多項式回帰も使用できます。

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、エンドキシンに結合、あるいはエンド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、薬局方の要求事項 (6,7,8または9)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:

- 擬陽性を引き起こする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, 3)、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

- 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。
- Guidelines on the Endotoxins Test <1085>, United States Pharmacopeia (最新改訂版), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Endotoxin Measurement Test Using Recombinant Proteins, Japanese Pharmacopeia, 18th Edition, Tokyo, Japan.

- Validation of Alternative Microbiological Methods <1223>, United States Pharmacopeia (最新改訂版), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

- Validation of Compendial Procedures <1225>, United States Pharmacopeia (最新改訂版), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

- Bacterial Endotoxins Test <85>, United States Pharmacopeia (最新改訂版), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

- Bacterial Endotoxins, European Pharmacopeia 2.4.16 (最新改訂版), European Pharmacopeia Commission, Strasbourg, France.

- Bacterial Endotoxins Test 4.01, Japanese Pharmacopeia (最新改訂版), Tokyo, Japan.

- 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)