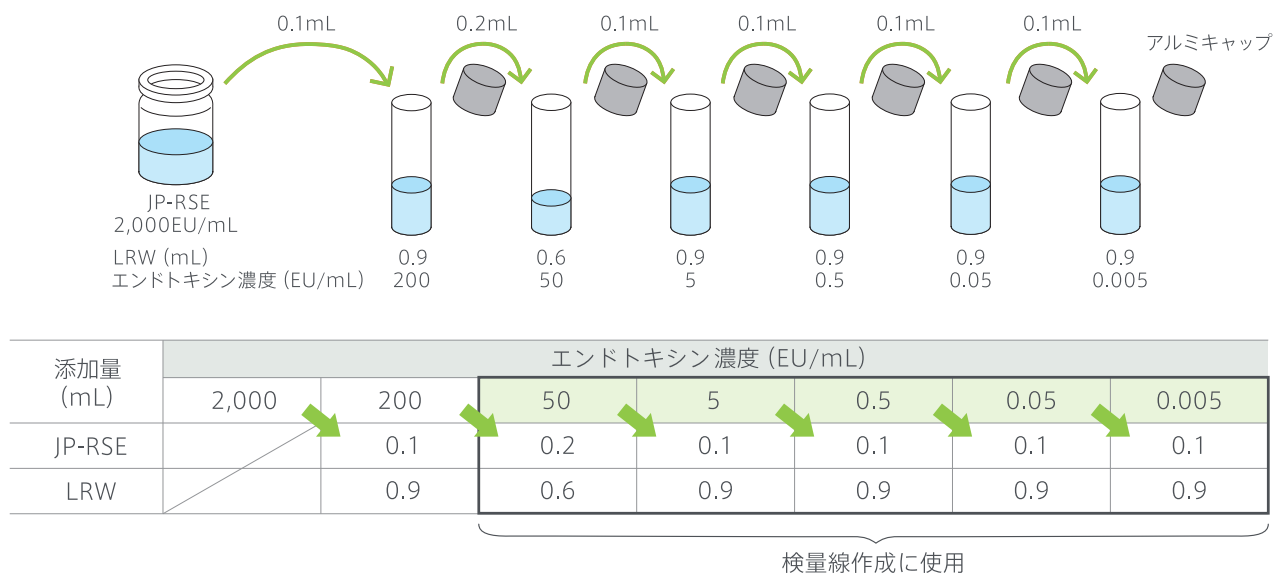


■ 予備試験

1 検量線の信頼性確認試験

1-1 エンドトキシン標準溶液の調製

- (1) エンドトキシン標準原液 (2,000 EU/mL) (p.7 参照) を試験管ミキサーで3分間攪拌する。
- (2) LRW を用いて10倍希釈を1回行い、200 EU/mL を調製後、4倍希釈し、50 EU/mL を調製する。
- (3) さらに、10倍段階希釈を4回繰り返し、エンドトキシン標準溶液 5 濃度 (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/mL) を調製する。
・ 段階希釈では各1分間試験管ミキサーで攪拌してください。



1-2 各試料のプレートへの分注

- (1) LRW および 1-1 で調製したエンドトキシン標準溶液 5 濃度 (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/mL) の各0.05 mL ずつをプレートの所定のウェルに分注する (ウェルパターン例参照)。
・ 調製後のエンドトキシン標準溶液は使用直前に10秒間攪拌してください。
・ 陰性対照として同時にLRWを測定することをおすすめします。
・ 試料の分注後、ただちにプレートに蓋をかぶせてください。

ウェルパターン例：予備試験 (検量線の信頼性確認試験)

Method: 検量線の信頼性確認 Reagent: Pyrochrome User ID: skka

Step 1: 検量線調製 Step 2: パラメーター確認

Plate 1 Plate 2 Plate 3 Plate 4 Plate 5

ロット番号: Pyrochrome ロット番号: CHGXXXX
 溶解液: Glucashield Buffer ロット番号: XXXXXXXX
 標準品: JP-RSE ロット番号: N-ENXXXX

測定パラメーター
 測定番号: 664 測定機器番号: EPOCH2 測定者 ID: skka
 ミキシング時間: 60 sec ミキシング速度: 10
 測定温度: 37 °C 測定時間: 01:00:00
 主波長: 405 nm 対照波長: nm
 試験の種類: 検量線の信頼性確認 測定速度単位: EU/mL

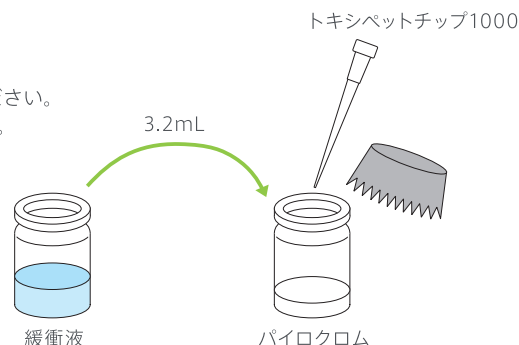
計算パラメーター
 モード: 反応時間法 閾値: 0.03 反応速度法: エンドポイント法
 計算時間: 00:00:00 ~ 01:00:00
 標準品: 種類: 一次式 スケール: Log(x) - Log(y) 実数(x) - 実数(y)
 移動平均: 5
 スライス上部 [%]: 0

製剤情報
 標準品濃度 (EU/mL)
 STD1: 0.005
 STD2: 0.05
 STD3: 0.5
 STD4: 5
 STD5: 50

Blk: LRW
 St1~St5: エンドトキシン標準溶液

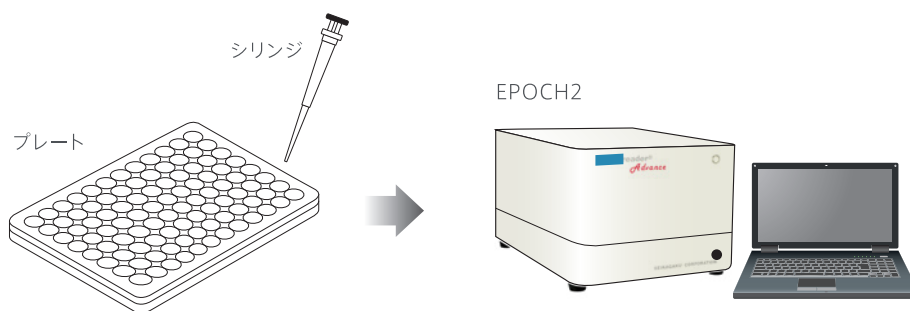
1-3 ライセート試液の調製

- (1) パイロクロムのバイアルを軽く叩いて、飛散した粉末を底に落とす。
- (2) ピンセットを使って栓を無菌的に持ち上げ、真空状態を解除する。栓は廃棄する。
- (3) パイロクロム添付の溶解用緩衝液3.2mLをトキシベットチップ1000で加え、バイアルの口にアルミ箔をかぶせる。
- (4) 手でゆっくり円を描くように間欠的に攪拌する。
 - ・ 溶解用緩衝液の吸引・吐出はゆっくりと行ってください。
 - ・ 試験管ミキサーは泡立ちの原因になりますので、使用しないでください。
 - ・ 凍結乾燥粉末が完全に溶解するまで少なくとも5分程度かかります。
 - ・ 調製後は2～8℃で保存し、8時間以内に使用してください。



1-4 ライセート試液の添加および測定

- (1) 完全に溶解したライセート試液 0.05mLをシリンジで所定のウェルに添加する。
- (2) プレートに蓋をかぶせ、マイクロプレートリーダーEPOCH2にセットする。
- (3) **測定開始** ボタンをクリックすると、直ちに1分間攪拌され、あらかじめ設定した測定条件で自動的に測定が開始される。
 - ・ ENDOMEASUREソフトウェア, Type-Mの設定条件については、p.1をご参照ください。



1-5 データ解析

- (1) 測定終了後、ファイルは自動的に保存される。
 - ・ ENDOMEASUREソフトウェア, Type-Mであらかじめ設定した解析条件で、自動解析されます。

1-6 判定

- (1) **結果管理** 画面にて、**測定データ** – **検量線情報** をクリックし、作成した検量線の相関係数 r を求め、その絶対値 $|r|$ が0.980以上であることを確認する。

2 反応干渉因子試験

2-1 エンドトキシン標準溶液の調製

- (1) 検量線の信頼性確認試験：1-1 エンドトキシン標準溶液の調製に従い、エンドトキシン標準溶液 5濃度 (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/mL) を調製する。

2-2 2倍濃度試料溶液の調製

例：10倍希釈試料溶液を測定に用いる場合は、試料原液を5倍希釈します。

- (1) エンドスピーシーES-50Mセットを用いたカイネティック比色法（反応速度法）：2-2 2倍濃度試料溶液の調製（別冊参照）に従い、2倍濃度試料溶液を調製する。