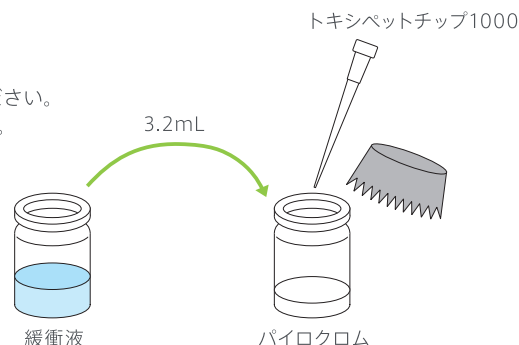


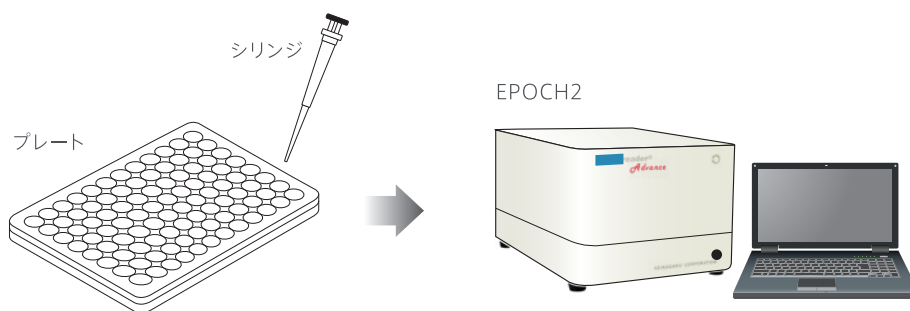
1-3 ライセート試液の調製

- (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

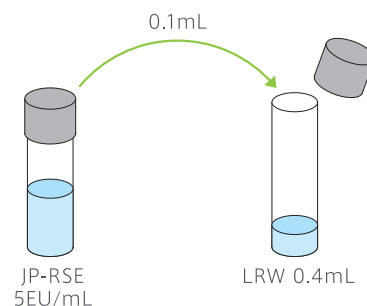
例：10倍希釈試料溶液を測定に用いる場合は、試料原液を5倍希釈します。

- (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。

2-3 試料添加用エンドトキシン標準溶液の調製

検量線の中点濃度（または中点付近濃度）のエンドトキシンの2倍濃度溶液（1 EU/mL）を調製します。検量線用に調製したエンドトキシン標準溶液から試料添加用エンドトキシン標準溶液を調製します。

- (1) 試験管にLRW 0.4mLを入れる。
- (2) 2-1 で調製した5EU/mLエンドトキシン標準溶液を試験管ミキサーで1分間攪拌後、0.1mLを(1)の試験管に加え、1分間攪拌する。



2-4 各試料のプレートへの分注

A, B, CおよびD液をマイクロプレート上で調製します。

- (1) LRW (D液) および 2-1 で調製したエンドトキシン標準溶液 5濃度 (C液 : 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/mL) の各0.05mL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)。
 - (2) A液 : 所定のウェル (T1) にLRWを0.025mLずつ分注する。
 - (3) B液 : 所定のウェル (Tr1) に 2-3 で調製した1 EU/mL試料添加用エンドトキシン標準溶液を0.025mLずつ分注する。
 - (4) A, B液 : 2-2 で調製した2倍濃度試料溶液を所定のウェル (T1, Tr1) に0.025mLずつ分注する。
 - (5) 必要に応じて、プレートミキサーで1分間攪拌する。
- ・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。
 - ・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（反応干渉因子試験）

Method: 反応干渉因子試験 Reagent: Pyrochrome User ID: akka

Step 1: 試験計画 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: CKGXXXX
 LAL 試薬: Glucashield Buffer ロット番号: XXXXXXXX
 溶媒: JP-RSE ロット番号: N-ENXXXXX

測定パラメーター
 測定番号: 684 測定機器番号: EPOCH2 測定者 ID: akka
 ミキシング時間: 60 sec ミキシング強度: 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: 反応干渉因子試験 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
 計算範囲: 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

分注機: NG
 測定値: NG
 濃度:

Blk: LRW (D液)
 St1~St5: エンドトキシン標準溶液 (C液)
 T1: 試料溶液 (A液)
 Tr1: 検量線の中点濃度（または中点付近濃度）のエンドトキシン添加試料溶液 (B液)

※試料溶液原液で測定する場合

その原液に中点濃度（または中点付近濃度）になるようにエンドトキシンを添加しますが、あらかじめ試験管内で、中点濃度の100倍濃度のエンドトキシン標準溶液を試料溶液原液で10倍希釈を2回行うなどして調製します。それを所定のB液のウェルに0.05mL分注し、試料溶液原液を所定のA液のウェルに0.05mL分注します。

2-5 ライセート試液の調製

- (1) 1 検量線の信頼性確認試験: 1-3 ライセート試液の調製に従い、ライセート試液を調製する。

2-6 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。

2-7 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。

2-8 判定

- (1) 試験の有効性を確認する。

以下の2つの条件に適合するとき、反応干渉因子試験は有効である。

- ・ C液：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。
- ・ D液：検出限界未満である。

(本操作法：反応時間法における限度値は反応時間 (Ta) がND (検出されず) である)

- 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、相関係数 r を確認する。
- ② **分析結果** をクリックし、D液の反応時間 (Ta) がND (検出されず) であることを確認する。

- (2) エンドトキシン回収率を算出し、試験の判定を行う。

- ① B液で測定されたエンドトキシン濃度とA液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算する。
- ② 添加エンドトキシンの回収率が50～200%の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定する (回収率が50～200%の範囲にあるとき「適合」)。