

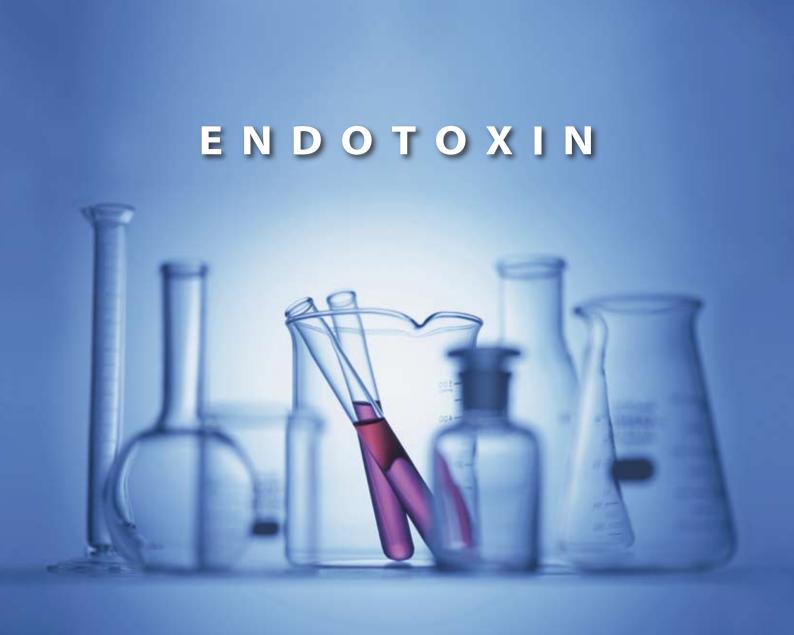
第十六改正日本薬局方における

エンドトキシン試験法

標準操作法







Contents

はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
日本薬局方におけるエンドトキシン試験法:光学的定量法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	3
概要	4
マイクロプレートリーダーを用いたカイネティック比色法 標準操作法	7
Pyrochrome [®] with Glucashield [®] Bufferを用いたカイネティック-比色法 エンドスペシー [®] ES-50Mを用いたカイネティック-比色法1	
チューブリーダーを用いたカイネティック比色法 標準操作法	7
エンドスペシー® ES-24Sを用いたカイネティック-比色法1	8
汎用比色計を用いたエンドポイント比色法 標準操作法	23
PyroColorジアゾカップリング試薬を用いたエンドポイント-比色法2	24
マイクロプレートリーダーを用いたカイネティック-比濁法 標準操作法2	27
パイロテル-Tを用いたカイネティック-比濁法2	28
日本薬局方におけるエンドトキシン試験法:ゲル化法 標準操作法	3
概要3	
パイロテルを用いたゲル化法	8
エンドトキシン試験法における機器の設定条件・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
ウェルリーダーMP-96:設定条件·······4	
Incubating Microplate Readers ELx808™: 設定条件························4 EGリーダーSV-12: 設定条件····································	
参考	
器具について ····································	
エンドトキシン標準原液の調製について4	
最大有効希釈倍数について・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	
付録	6
第十六改正日本薬局方 一般試験法4.01 エンドトキシン試験法(全文)4	6
第十六改正日本薬局方における改正点	0
主な医薬品のエンドトキシン規格値	4

はじめに

日本薬局方(以下、JP)収載のエンドトキシン試験法は、カブトガニの血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用いて、グラム陰性菌由来のエンドトキシンを検出または定量する方法です。エンドトキシン試験法には、エンドトキシンの作用によるライセート試液のゲル形成を指標とするゲル化法および光学的変化を指標とする光学的測定法があります。1988年に注射用水のエンドトキシン試験法として、リムルス試験のうちゲル化法がJP11追補に初めて収載されました。

また、日米欧三薬局方の国際調和の一貫として、エンドトキシン試験法も国際調和作業が進められてきました。エンドトキシン試験法の国際調和は1993年に開始され、1999年に調和合意署名に至り、2000~2001年に各薬局方(JPでは2001年4月の第十四改正)に取り込まれました。しかし、三局方間でいくつかの微妙な相違が認められ、2003年にICH Q4Bが設置され、2004年から見直しが行われ、2009年10月に再度国際調和合意に至りました。欧州薬局方(EP)では2010年1月、米国薬局方(USP)では2010年10月、JPでは2011年3月に告示、施行されました。

以下、第十六改正日本薬局方エンドトキシン試験法に準拠した、当社製品を用いた標準操作法を示します。

■ 第十六改正日本薬局方エンドトキシン試験法の構成

準 備	 器具 溶液の調製 1. エンドトキシン標準原液の調製 2.2. エンドトキシン標準溶液の調製 2.3. 試料溶液の調製 3. 最大有効希釈倍数の求め方
	4. ゲル化法 4.1. 予備試験 4.1.1. ライセート試薬の表示感度確認試験 4.1.2. 反応干渉因子試験 4.2.1. 限度試験法 4.2.1. 操作法
試験方法	4.2.1. 採作点 4.2.2. 判定 4.3. 定量試験法 4.3.1. 操作法 4.3.2. エンドトキシン濃度の算出及び判定 5. 光学的定量法
	5.1. 比濁法 5.2. 比色法 5.3. 予備試験 5.3.1. 検量線の信頼性確認試験 5.3.2. 反応千渉因子試験 5.4. 定量 5.4.1. 操作法 5.4.2. エンドトキシン濃度の算出 5.4.3. 判定

■エンドトキシン試験法に必要な試薬および器具

	比色	ゲル化法				
カイネテ	イック法	エンドポ	イント法	カイネティック法		
マイクロプレート法	試験管法	マイクロプレート法	試験管法	マイクロプレート法	マルチテスト	シングルテスト
●パイロクロム ●エンドスペシー® ES-50M ●エンドスペシー® ES-24S		●パイロクロム ●エンドスペシー [®] ES-50M	●エンドスペシー [®] ES-24S	●パイロテル-T	●パイロテル マルチテスト	●パイロテル シングルテスト
			局方エンドトキシン トキシン試験用水	標準品		
		●パイロカラー DIA150-MP	●パイロカラー DIA60-STV			
●ウェルリーダー ●EGリーダー MP-96 SV-12		●分光光度計 ●恒温槽	●分光光度計 ●恒温槽	●ウェルリーダー MP-96	●ドライブロック	●ドライブロック
●トキシペット プレートLP ●乾熱滅菌 アルミキャップ		●トキシペット プレートLP	●乾熱滅菌アルミキャップ	●トキシペット プレートLP	●反応用乾熱 滅菌試験管	●乾熱滅菌アルミキャップ

その他器具

- ●希釈用乾熱滅菌試験管(アルミキャップ付き)
- ●乾熱滅菌アルミ箔
- ●トキシペットサンプラー100、200または1000
- ●トキシペットチップ200または1000 (エンドトキシン、 β -グルカンフリー:以下チップ)
- トキシペットディスペンサー
- トキシペットディスペンサー用シリンジ (エンドトキシン、 β -グルカンフリー:以下シリンジ)
- ●試験管ミキサー
- ●プレートミキサー(マイクロプレート法)
- ●試験管立て
- ●氷-水浴槽

汚染防止のためのポイント

- ☆各バイアルの開栓はピンセットで行ってください。
- ☆バイアルの開栓後は、乾熱滅菌アルミ箱をご使用ください。
- ☆長時間標準品等を保存する場合はパラフィルムをご使用ください。

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法

光学的定量法



日本薬局方におけるエンドトキシン試験法:光学的定量法

● 概要

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法を実施するに際して、比色法または比濁法の精度と有効性を保証する ため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

▶備試験

■検量線の信頼性確認試験

ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前に、また試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときに行います。

操作法

用いるライセート試薬に規定されているエンドトキシンの濃度範囲で、少なくとも3種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製し、これらの各濃度につき3回以上測定して検量線を作成します。

判定

作成した検量線について、直線回帰分析を行い、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します。

■反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試料溶液について反応を促進または阻害する因子の有無を調べる試験です。 本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行います。

(操作法)

表1に従い、A, B, CおよびD液を調製して、試験を行います。

表1

液	エンドトキシン濃度	被添加液	試験管またはウェルの数
A*1	0	試料溶液	2以上
B*2	検量線の中点濃度*2	試料溶液	2以上
C*3	3濃度以上	エンドトキシン試験用水	各濃度、2以上
D*4	0	エンドトキシン試験用水	2以上

- *1 試料溶液のみ(試料溶液のエンドトキシン濃度測定用). 最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈することができる.
- *2 A液と同倍数で希釈された試料溶液で、検量線の中点または中点付近のエンドトキシン濃度になるように標準エンドトキシンを添加したもの.
- *3 検量線の信頼性確認で用いた各種濃度のエンドトキシン標準溶液(検量線作成用)
- *4 陰性対照. エンドトキシン試験用水のみ.

【最大有効希釈倍数について】

最大有効希釈倍数(試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の 希釈倍数)を次式によって求めます。

最大有効希釈倍数= エンドトキシン規格値 × 試料溶液の濃度 λ

エンドトキシン規格値:

投与量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg)であり、Mは体重1kg当たり1時間以内に投与する注射剤の最大量です。

試料溶液の濃度: 試料溶液の濃度の単位は、

エンドトキシン規格値が

質量当たり(EU/mg)で規定されている場合mg/mL

当量当たり(EU/mEq)で規定されている場合はmEq/mL

生物学的単位当たり(EU/単位)で規定されている場合は単位/mL

容量当たり(EU/mL)で規定されている場合はmL/mLです。

すなわち、エンドトキシン規格値に試料溶液の濃度を乗じることにより、試料溶液1mL当たりのエンドトキシン規格値 (EU/mL) が算出され、これを検量線の最小エンドトキシン濃度 (λ 、EU/mL) で除することにより最大有効希釈倍数が求められます。

回収率の算出方法

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します。

回収率 (%) = $\frac{B液エンドトキシン濃度 - A液エンドトキシン濃度}{B液の添加エンドトキシン濃度} \times 100$

判定

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します。

▶▶ 試験適合要件

- ●C液で作成した検量線の相関係数: |r| ≧0.980
- ●D液:設定されている空試験の限度値を超えないか、または検出限界未満である

■ 定 量

操作法

表1に示すA, B, CおよびD液を調製し、予備試験:反応干渉因子試験に準じて操作します。

エンドトキシン濃度の算出方法

C液で作成した検量線を用い、A液の平均エンドトキシン濃度を算出します。

>> 試験適合要件

- ●C液で作成した検量線の相関係数: |r| ≥0.980
- ●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は50~200%の範囲にある
- ullet D液:設定されている空試験の限度値を超えないか、または検出限界未満である

判定

A液の平均エンドトキシン濃度に基づき、被験試料のエンドトキシンの濃度(EU/mL, EU/mg, EU/mEqまたはEU/単位)を求め、その値が医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被験試料はエンドトキシン試験に適合とします。

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法:光学的定量法

マイクロプレートリーダーを用いたカイネティック-比色法標準操作法

ウェルリーダーMP-96を用いたPyrochrome® with Glucashield® Buffer/エンドスペシー® ES-50Mセットによるカイネティック-比色法の標準操作法を示します。



Pyrochrome® with Glucashield Bufferを用いたカイネティック-比色法(マイクロプレート法)

エンドトキシン標準溶液10倍段階希釈 5濃度 (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/mL) および試料溶液 (10倍希釈液) を用いる測定操作法を示します。

■必要な試薬および器具

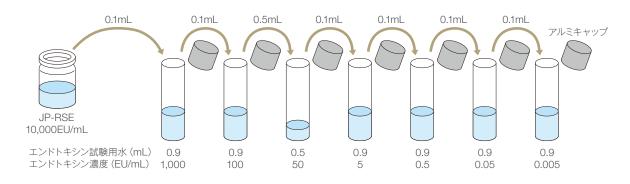
試 薬	●ライセート試薬:Pyrochrome® with Glucashield® Buffer (以下、パイロクロム) ●標準品:日本薬局方エンドトキシン標準品 (以下、JP-RSE) ●エンドトキシン試験用水 (以下、LRW)
器具	 ●トキシペットサンプラー200、トキシペットサンプラー1000 ●トキシペットディスペンサー ●トキシペットチップ200、トキシペットチップ1000 ●トキシペットディスペンサー用シリンジ ●乾熱滅菌試験管(11.6×65mm、アルミキャップ付、以下、試験管) ●乾熱滅菌アルミ箔(以下、アルミ箔) ●試験管ミキサー ●プレートミキサー
測定機器	●ウェルリーダーMP-96

予備試験

1 検量線の信頼性確認

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 (10,000EU/mL) を試験管ミキサーで1分間撹拌する。
- (2) 氷冷下でエンドトキシン試験用水を用いて10倍段階希釈を2回繰り返し、100EU/mLを調製後、2倍希釈し、50EU/mLを 調製する。
- (3) さらに、10倍段階希釈を4回繰り返し、検量線作成用の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。

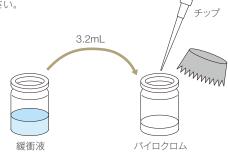


添加量	エンドトキシン濃度 (EU/mL)							
(mL)	10,000	1,000	100	50	5	0.5	0.05	0.005
JP-RSE		0.1	0.1	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1
LRW		0.9	0.9	0.5	0.9	0.9	0.9	0.9

検量線作成に使用

1-2 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) 汚染させないようにゴム栓をピンセットで取り外し、アルミ箔でバイアルの口を軽く覆う。
- (3) パイロクロム添付の溶解用緩衝液の3.2mL (0.8mL×4) をピペットで加え、手でゆっくり円を描くように間欠的に攪拌する。
 - ●パイロクロムはエンドトキシン標準溶液のプレートへの分注前に溶解してください。
 - ●溶解用緩衝液の吸引・吐出はゆっくりと行なってください。
 - ●泡立てないよう、溶液が渦巻くよう攪拌してください。



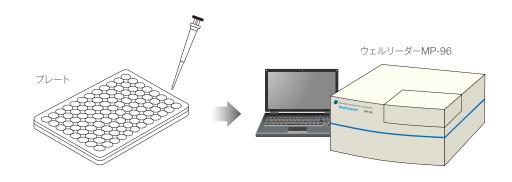
1-3 各試料のプレートへの分注

- (1) エンドトキシン試験用水および1-1で調製した検量線作成用エンドトキシン標準溶液 5濃度 (0.005, 0.05, 0.5, 5, 50 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)。
 - ●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エンドトキシン試験用水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。



1-4 ライセート試液の添加および測定

- (1) ライセート試薬が完全に溶解するよう、手で円を描くよう攪拌する。
- (2) 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。
- (3) プレートに蓋をかぶせ、ウェルリーダーMP-96にセットする。
- (4) <u>測定ボタン</u>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測定が開始される。 ●ウェルリーダーMP-96の条件設定については、p.41をご参照ください。



1-5 データ解析

- (1) 測定終了後は、まず「ファイル(F)」の「名前を付けて保存(A)」を実行し、ファイルを保存する。
 - Reader for Windows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

- 0.980以上であることを確認する。
 - ●作成した検量線 (横軸:エンドトキシン濃度、縦軸:測定値;実数または対数) について、直線回帰分析を行い、相関係数 r を求め、その絶対値 $|r| \ge 0.980$ であれば、検量線の信頼性が確認されたことになります。

2 反応干渉因子試験

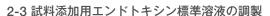
2-1 エンドトキシン標準溶液の調製

(1) 1. 検量線の信頼性確認:1-1エンドトキシン標準溶液の調製に従い、検量線作成用の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。 0.1mL

2-2 2倍濃度試料溶液の調製

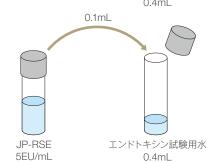
例:10倍希釈試料溶液を測定に用いる場合は、試料原液を5倍希釈します。

- (1) 試験管にエンドトキシン試験用水0.4mLを分注する。
- (2) 被検試料原液は試験管ミキサーで渦ができるよう1分間攪拌後、0.1mL を試験管に分注し、試験管ミキサーで1分間攪拌し、2倍濃度試料溶液と する。



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) 試験管にエンドトキシン試験用水0.4mLを分注する。
- (2) 2-1 エンドトキシン標準溶液の調製で調製した5EU/mLエンドトキシン 標準溶液を1分間攪拌後、0.1mLを試験管に分注し、試験管ミキサーで 1分間攪拌し、試料添加用エンドトキシン標準溶液とする。



2-4 ライセート試液の調製

(1) 1. 検量線の信頼性確認: 1-2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。

2-5 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) エンドトキシン試験用水 (D液) および2-1で調製した検量線作成用エンドトキシン標準溶液 5濃度 (C液: 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50 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(ウェルバターン例参照)。
- (2) A液:所定のウェル(T1)にエンドトキシン試験用水を0.025mLずつに分注する。
- (3) B液: 所定のウェル (Tr1) に2-3で調製した1EU/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。
 - ■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。



※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。

2-6 ライセート試液の添加および測定

- (1) 1-4に従い、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、ウェルリーダーMP-96にセットし、測定を開始する。
- (3) 測定終了後、測定結果を保存する。

2-7 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:ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、または検出限界未満である。
- ① [検量線の表示] ボタンー [検量線の情報] ボタンをクリックし、相関係数 r を確認する。
- ② (計算結果) ボタンをクリックし、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。
 - ①B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。

回収率 (%) =
$$\frac{B液エンドトキシン濃度 - A液エンドトキシン濃度}{B液の添加エンドトキシン濃度} \times 100$$

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」)。

<参考>

米国食品医薬品局 (FDA) のガイドライン (1987) に従うと、試験毎に、B液と同様に、エンドトキシン試験用水に標準エンドトキシンを検量線の中点または中点付近の濃度となるように添加した陽性コントロールを同時に測定し、検量線から求めたエンドトキシン濃度が、添加濃度の75~125%であることを確認することが必要です。

この範囲にない場合は、添加エンドトキシン溶液の調製時の不具合等が疑われます。

定 量

3 定量

3-1 操作方法

- (1) 2. 反応干渉因子試験に従い、エンドトキシン標準溶液、2倍濃度試料溶液、ライセート試液を調製する。
- (2) 同様にA, B, CおよびD液をマイクロプレート上で調製するため、プレートの所定のウェルに分注する。



- (3) 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。
- (4) プレートに蓋をかぶせ、ウェルリーダーMP-96にセットし、測定を開始する。
- (5) 測定終了後、測定結果を保存する。

3-2 判定

(1) 試験の有効性を確認する。

以下のすべての条件に適合するとき、本試験は有効である。

- ●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。
- ●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計算された、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が50~200%の範囲にある。
- ●D液:ライセート試液設定されている空試験の限度値を超えないか、または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である)。
- (2) 試験の判定を行う。
 - ①A液の平均エンドトキシン濃度に基づき、被験試料(希釈しない前の元被験試料)のエンドトキシンの濃度(EU/mL、EU/mg、EU/mEqまたはEU/単位)を算出する。
 - ②その値が医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被験試料はエンドトキシン試験に適合とする。

エンドスペシー®ES-50Mを用いたカイネティック-比色法(マイクロプレート法)

エンドトキシン標準溶液4倍段階希釈 3濃度 (0.1, 0.025, 0.00625 EU/mL) および試料溶液 (10倍希釈液) を用いる測定操作法を示します。

■必要な試薬および器具

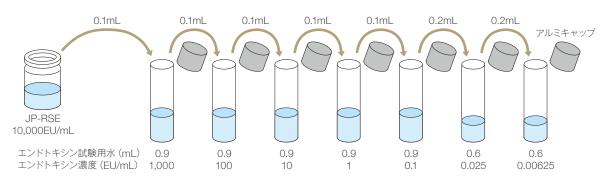
試 薬	●ライセート試薬:エンドスペシー® ES-50Mセット(以下、ES-50M)●標準品:日本薬局方エンドトキシン標準品(以下、JP-RSE)●エンドトキシン試験用水(以下、LRW)
器具	 ●トキシペットサンプラー200、トキシペットサンプラー1000 ●トキシペットディスペンサー ●トキシペットチップ200、トキシペットチップ1000 ●トキシペットディスペンサー用シリンジ ●乾熱滅菌試験管(11.6×65mm、アルミキャップ付、以下、試験管) ●乾熱滅菌アルミ箔(以下、アルミ箔) ●試験管ミキサー ●プレートミキサー
測定機器	●ウェルリーダーMP-96

▶備試験

1 検量線の信頼性確認

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 (10,000EU/mL) を試験管ミキサーで1分間撹拌する。
- (2) 氷冷下でエンドトキシン試験用水を用いて10倍段階希釈を繰り返し、0.1 EU/mLを調製する。
- (3) さらに、4倍段階希釈を2回繰り返し、検量線作成用エンドトキシン標準溶液 3濃度 (0.1, 0.025, 0.00625 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。



添加量			-	エンドトキシン	/濃度 (EU/mL)		
(mL)	10,000	1,000	100	10	1	0.1	0.025	0.00625
JP-RSE		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
LRW		0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.6	0.6
								ز

検量線作成に使用

1-2 各試料のプレートへの分注

- (1) エンドトキシン試験用水および1-1で調製した検量線作成用エンドトキシン標準溶液 3濃度 (0.1, 0.025, 0.00625 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)。
 - ●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エンドトキシン試験用水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。



1-3 ライセート試液の調製

- (1) ES-50Mセットのライセート試薬(④)に添付の緩衝液(③)の全量をシリンジで加え、泡立てないように手で振って溶解する。
 - ●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。
 - ●通常5分以内に溶解します。溶解後、15分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、ウェルリーダーMP-96にセットし、測定を開始する。
- (3) 測定終了後、測定結果を保存する。

1-5 判定

(1) 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) 1.検量線の信頼性確認:1-1エンドトキシン標準溶液の調製に従い、検量線作成用のエンドトキシン標準溶液 3濃度 (0.1, 0.025, 0.00625EU/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) Pyrochrome[®] with Glucashield[®] Bufferを用いたカイネティック-比色法の2-2. 2倍濃度試料溶液の調製に従い、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のうち、0.1EU/mLエンドトキシン標準溶液を試料添加用エンドトキシン標準溶液として使用します。

2-4 ライセート試液の調製

(1) 1. 検量線の信頼性確認:1-2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。

2-5 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) エンドトキシン試験用水 (D液) および2-1で調製した検量線作成用エンドトキシン標準溶液 3濃度 (C液: 0.1, 0.025, 0.00625 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)にエンドトキシン試験用水を0.025mLずつに分注する。
- (3) B液: 所定のウェル (Tr1) に2-3で調製した1EU/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。
 - ●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。



2-6 ライセート試液の添加および測定

- (1) 1-4に従い、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、ウェルリーダーMP-96にセットし、測定を開始する。
- (3) 測定終了後、測定結果を保存する。

2-7 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:ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、または検出限界未満である(本操作法:反応速度法における限度値は吸光度変化率1.00mAbs/minである)。
- (2) エンドトキシン回収率を算出し、試験の判定を行う。
 - ①B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」)。

定 量

3 定量

3-1 操作方法

- (1) 2. 反応干渉因子試験に従い、エンドトキシン標準溶液、2倍濃度試料溶液を調製する。
- (2) A, B, CおよびD液をマイクロプレート上で調製するため、プレートの所定のウェルに分注する。



- (3) 2. 反応干渉因子試験に従い、調製・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。
- (4) プレートに蓋をかぶせ、ウェルリーダーMP-96にセットし、測定を開始する。
- (5) 測定終了後、測定結果を保存する。

3-2 判定

(1) 試験の有効性を確認する。

以下のすべての条件に適合するとき、本試験は有効である。

- ●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。
- ●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計算された、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が50~200%の範囲にある。
- ●D液:ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、または検出限界未満である(本操作法: 反応速度法における限度値は吸光度変化率1.00mAbs/minである)。
- (2) 試験の判定を行う。
 - ①A液の平均エンドトキシン濃度に基づき、被験試料 (希釈しない前の元被験試料) のエンドトキシンの濃度 (EU/mL、 EU/mg、EU/mEqまたはEU/単位) を算出する。
 - ②その値が医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被験試料はエンドトキシン試験に適合とする。

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法:光学的定量法

チューブリーダーを用いた カイネティック-比色法 標準操作法

EGリーダーSV-12を用いたエンドスペシー®ES-24Sセットによる カイネティック-比色法の標準操作法を示します。



エンドスペシー®ES-24Sを用いたカイネティック-比色法(シングルバイアル法)

エンドトキシン標準溶液4倍段階希釈 3濃度 (0.1, 0.025, 0.00625 EU/mL) および試料溶液 (10倍希釈液) を用いる 測定操作法を示します。

■必要な試薬および器具

試 薬	●ライセート試薬:エンドスペシー® ES-24Sセット(以下、ES-24S)●標準品:日本薬局方エンドトキシン標準品●エンドトキシン試験用水
器 具	 ●トキシペットサンプラー200、トキシペットサンプラー1000 ●トキシペットディスペンサー ●トキシペットチップ200、トキシペットチップ1000 ●トキシペットディスペンサー用シリンジ ●乾熱滅菌試験管 (11.6×65mm、アルミキャップ付、以下、試験管) ●乾熱滅菌アルミキャップ (以下、アルミキャップ) ●乾熱滅菌アルミ箔 (以下、アルミ箔) ●試験管ミキサー
測定機器	●EGリーダーSV-12

▶ 予備試験

1 検量線の信頼性確認

1-1 エンドトキシン標準溶液の調製

(1) エンドスペシー®ES-50Mを用いたカイネティック-比色法: 1-1 エンドトキシン標準溶液の調製に従い、検量線作成用エンドトキシン標準溶液 3濃度 (0.1, 0.025, 0.00625 EU/mL) を調製する。

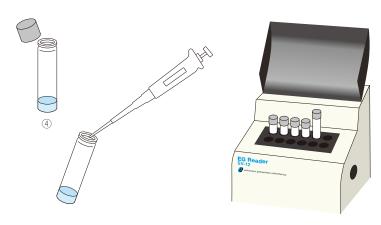
1-2 ライセート試薬の溶解

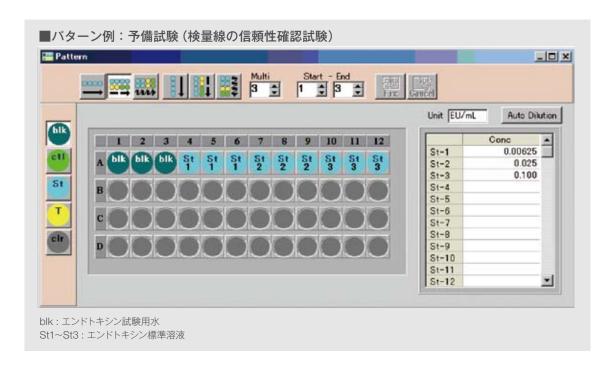
予備試験:検量線の信頼性確認試験 12本

- (1) ES-24Sセットのライセート試薬(④)のバイアル12本を用意する。
- (2) 各バイアルに添付の緩衝液 (③) 0.2 mLをチップ等で加え、アルミキャップで蓋をし、試験管ミキサーで2秒程度攪拌する。
 - ullet ライセート試薬は使用直前に調製し、完全に溶解していることを確認のうえ、速やかに測定を開始してください。

1-3 ライセート試液への添加および測定

- (1) エンドトキシン試験用水および1-1で調製した検量線作成用エンドトキシン標準溶液 3濃度 (0.1, 0.025, 0.00625 EU/mL) の各0.2mLを所定のバイアルに添加し、アルミキャップを被せ、試験管ミキサーで2秒程度攪拌する。
 - ●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。
 - ●陰性対照として同時にエンドトキシン試験用水を測定することをおすすめします。
- (2) 直ちにEGリーダーSV-12にセットすると、あらかじめ設定した測定条件で加温および測定が開始される。
- (3) 測定終了後、測定結果を保存する。





1-4 判定

(1) 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。

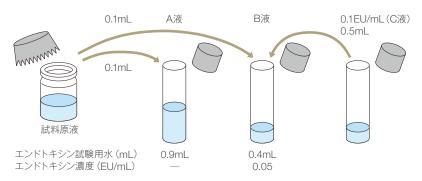
2 反応干渉因子試験

2-1 エンドトキシン標準溶液の調製

(1) 1.検量線の信頼性確認: 1-1エンドトキシン標準溶液の調製に従い、検量線作成用のエンドトキシン標準溶液 3濃度 (0.1, 0.025, 0.00625 EU/mL) を調製する。

2-2 試料溶液 (A液) とエンドトキシン添加試料溶液 (B液) の調製

- (1) 試験管を2本準備し、下図に従い、A液、B液を調製する。
 - ●調製済みの0.1EU/mL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。



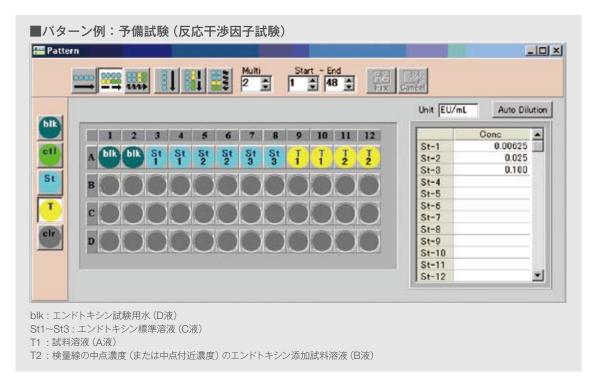
2-3 ライセート試薬の溶解

予備試験: 反応干渉因子試験 12本

- (1) 1-2 ライセート試薬の溶解に従い、ES-24Sセットのライセート試薬(④)のバイアル12本分を溶解する。
 - ●ライセート試薬は使用直前に調製し、完全に溶解していることを確認のうえ、速やかに測定を開始してください。

2-4 ライセート試液への添加および測定

- (1) エンドトキシン試験用水 (D液)、2-1で調製した検量線作成用エンドトキシン標準溶液 3濃度 (C液: 0.1, 0.025, 0.00625 EU/mL) および2-2で調製したA液、B液の各0.2mLを所定のバイアルに添加し、アルミキャップを被せ、試験管ミキサーで 2秒程度攪拌する。
 - ●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。
- (2) 直ちにEGリーダーSV-12にセットすると、あらかじめ設定した測定条件で加温および測定が開始される。
- (3) 測定終了後、測定結果を保存する。



2-5 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。

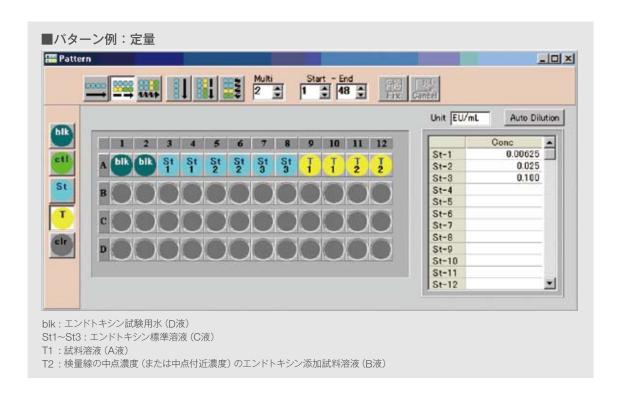
- C液:作成した検量線の相関係数 r を求め、その絶対値 |r| が0.980以上である。
- ●D液: ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、または検出限界未満である(本操作法: 反応速度法における限度値は吸光度変化率3.00mAbs/minである)。
- (2) エンドトキシン回収率を算出し、試験の判定を行う。
 - ①B液で測定されたエンドトキシン濃度とA液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算する。
 - ②添加エンドトキシンの回収率が50~200%の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存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」)。

定 量

3 定量

3-1 操作方法

- (1) 2. 反応干渉因子試験に従い、A, B, CおよびD液を調製する。
- (2) 定量用にES-24Sセットのライセート試薬(④)のバイアル12本分を溶解する。
- (3) 同様に、A, B, CおよびD液の各0.2 mLを所定のバイアルに添加し、アルミキャップを被せ、試験管ミキサーで2秒程度 攪拌する。
- (4) 直ちにEGリーダーSV-12にセットすると、あらかじめ設定した測定条件で加温および測定が開始される。
- (5) 測定終了後、測定結果を保存する。



3-2 判定

(1) 試験の有効性を確認する。

以下のすべての条件に適合するとき、本試験は有効である。

- ●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。
- ●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計算された、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が50~200%の範囲にある。
- ●D液:ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、または検出限界未満である(本操作法: 反応速度法における限度値は吸光度変化率3.00mAbs/minである)。
- (2) 試験の判定を行う。
 - ①A液の平均エンドトキシン濃度に基づき、被験試料(希釈しない前の元被験試料)のエンドトキシンの濃度(EU/mL、EU/mg、EU/mEqまたはEU/単位)を算出する。
 - ②その値が医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被験試料はエンドトキシン試験に適合とする。

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法:光学的定量法

汎用比色計を用いた エンドポイント-比色法 標準操作法

パイロカラージアゾ試薬を使用したエンドポイント-比色法 (マイクロプレート法およびシングルバイアル法)の標準操作法を示します。



PyroColorジアゾカップリング試薬を用いたエンドポイント-比色法(マイクロプレート法)

エンドポイント法は、特別な測定装置を必要とせず、導入の際のイニシャルコストが少なくてすみます。 マイクロプレートを用いたエンドポイント-比色法を行う場合は、カイネティック-比色法 (マイクロプレート法) 標準操作法に準じてください (p.7)。それぞれの標準操作法のライセート試液の溶解後、以下の操作を行ってください。

必要な試薬

試 薬

●ジアゾカップリング試薬: PyroColor Diazo Reagents DIA150-MP

操作方法

1-1 ライセート試液の添加および反応

(1) ライセート試液を所定のウェルに0.05mL添加し、プレートに蓋を被せ、ヒートブロックを使用し、37℃で所定の時間加温する(加温中にジアゾカップリング試薬の調製を行う)。

1-2 ジアゾカップリング試薬の調製

- (1) Sodium nitrite[1]のバイアルにHCI Solution[1A]を全量(4mL)添加し、溶解する(1液)。
- (2) Ammonium sulfamate[2]バイアルに蒸留水を4mL添加し、溶解する(2液)。
- (3) N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride[3]のバイアルにN-Methyl-2-pyrrolidone solution[3A]を全量(4mL)を添加し、溶解する(3液)。



1-3 反応停止

- (1) 加温終了後、マイクロプレートを氷上に置き、直ちに1-2で調製した1液を各ウェルに0.05mLずつ添加し、マイクロプレートを撹拌し、十分に混合する(撹拌には、マイクロプレートミキサーの使用をお勧めします)。
- (2) さらに、2液を0.05mLずつ添加し、同様に撹拌、混合し、次いで3液を0.05mLずつ添加し、同様に撹拌、混合する。 (注) ジアゾカップリング試薬溶液の調製およびステップ1-4の操作は、エンドトキシン、(1→3) - β -D-グルカンフリーの必要はありません。

1-4 吸光度の測定およびデータ解析

(1) 再度混合し、2波長測定可能なマイクロプレートリーダーにセットし、545nm (対照波長630nm)で吸光度を測定する。

1-5 判定

(1) カイネティック-比色法 (マイクロプレート) と同様です。

PyroColorジアゾカップリング試薬を用いたエンドポイント-比色法(シングルバイアル法)

試験管 (シングルバイアル) を用いたエンドポイント-比色法を行う場合は、カイネティック-比色法 (シングルバイアル法) 標準操作法に準じてください (p.17)。それぞれの標準操作法のライセート試液の溶解後、以下の操作を行ってください。

必要な試薬

試 薬

●ジアゾカップリング試薬: PyroColor Diazo Reagents DIA60-STV

操作方法

1-1 ライセート試液の調製

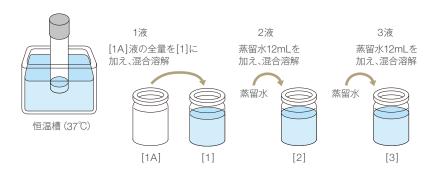
- (1) 必要本数のES-24Sセットのライセート試薬(④)のバイアルを準備し、開封し、アルミキャップで蓋をして氷冷する。
- (2) 各バイアルに添付の緩衝液(③) 0.2mLをチップ等で加え、アルミキャップで蓋をし、試験管ミキサーで2秒程度攪拌する。

1-2 ライセート試液の添加および反応

(1) エンドトキシン試験用水など調製した試料の各0.2mLを所定のバイアルに添加し、アルミキャップを被せ、試験管ミキサーで2秒程度攪拌した後、恒温槽で37℃、30分間加温する(加温中にジアゾカップリング試薬の調製を行う)。

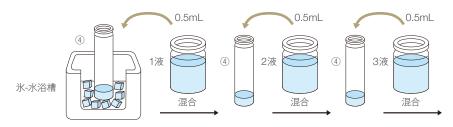
1-3 ジアゾカップリング試薬の調製

- (1) Sodium nitrite [1]のバイアルにHCI Solution [1A] 1バイアルの全量 (12mL) を添加し、溶解する (1液)。
- (2) Ammonium sulfamate [2]のバイアルに蒸留水を12mL添加し、溶解する(2液)。
- (3) N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride[3]のバイアルに蒸留水12mLを添加し、溶解する(3液)。



1-4 反応停止

- (1) 加温終了後、直ちにバイアル(④)を氷ー水浴槽に移し、アルミキャップをすべて取り去り、1液を0.5mLずつ添加し、氷-水浴槽から取り出し、試験管ミキサーで2秒間撹拌し、混合する。
- (2) さらに、2液を0.5mLずつ添加し、同様に撹拌、混合し、次いで3液を0.5mLずつ添加し、同様に撹拌、混合する。



(注) ジアゾカップリング試薬溶液の調製およびステップ1-4の操作は、 エンドトキシン、 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D - \mathcal{J}$ ルカンフリーの必要はありません。

1-5 吸光度の測定およびデータ解析

(1) 蒸留水を対照として、波長545nmで吸光度を測定する(2時間以内)。

1-6 判定

(1) カイネティック-比色法 (シングルバイアル法) と同様です。

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法:光学的定量法

マイクロプレートリーダーを用いたカイネティック-比濁法 標準操作法

ウェルリーダーMP-96を用いたPyrotell®-Tによるカイネティック-比濁法の標準操作法を示します。



パイロテル-Tを用いたカイネティック-比濁法(マイクロプレート法)

エンドトキシン標準溶液4倍段階希釈 3濃度 (0.1, 0.025, 0.00625 EU/mL) および試料溶液 (10倍希釈液) を用いる測定操作法を示します。

■必要な試薬および器具

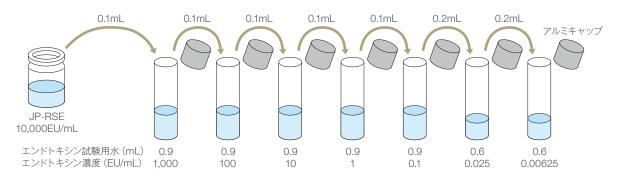
試 薬	●ライセート試薬:パイロテル-T●標準品:日本薬局方エンドトキシン標準品(以下、JP-RSE)●エンドトキシン試験用水(以下、LRW)
器 具	 ●トキシペットサンプラー200、トキシペットサンプラー1000 ●トキシペットディスペンサー ●トキシペットチップ200、トキシペットチップ1000 ●トキシペットディスペンサー用シリンジ ●乾熱滅菌試験管(11.6×65mm、アルミキャップ付、以下、試験管) ●乾熱滅菌アルミ箔(以下、アルミ箔) ●試験管ミキサー ●プレートミキサー
測定機器	●ウェルリーダーMP-96

予備試験

1 検量線の信頼性確認

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 (10,000EU/mL) を試験管ミキサーで1分間撹拌する。
- (2) 氷冷下でエンドトキシン試験用水を用いて10倍段階希釈を繰り返し、0.1EU/mLを調製する。
- (3) さらに、4倍段階希釈を2回繰り返し、検量線作成用エンドトキシン標準溶液 3濃度(0.1, 0.025, 0.00625 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。



添加量	エンドトキシン濃度 (EU/mL)								
(mL)	10,000	1,000	100	10	1	0.1	0.025	0.00625	
JP-RSE		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	
LRW		0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.6	0.6	

検量線作成に使用

1-2 各試料のプレートへの分注

- (1) エンドトキシン試験用水および1-1で調製した検量線作成用のエンドトキシン標準溶液 3濃度(0.1, 0.025, 0.00625 EU/mL) の各0.1mL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エンドトキシン試験用水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。



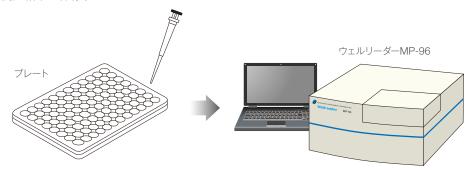
1-3 ライセート試液の調製

- (1) パイロテル-Tのバイアルを軽く叩いて、飛散した粉末を底に落とし、 汚染させないようにゴム栓をピンセットで取り外し、アルミ箔でバイ アルの口を軽く覆う。
- (2) エンドトキシン試験用水5.0mLをピペットで加え、手でゆっくり円を描くように間欠的に攪拌する。
 - ●泡立てないよう、溶液が渦巻くよう攪拌してください。

エンドトキシン試験用水 5mL パイロテル-T

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 0.1mL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、ウェルリーダーMP-96にセットし、測定を開始する。
- (3) 測定終了後、測定結果を保存する。



1-5 判定

(1) 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

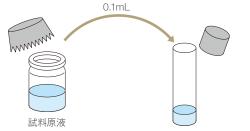
2-1 エンドトキシン標準溶液の調製

(1) 1. 検量線の信頼性確認:1-1エンドトキシン標準溶液の調製に従い、検量線作成用エンドトキシン標準溶液 3濃度(0.1, 0.025, 0.00625 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) Pyrochrome® with Glucashield® Bufferを用いたカイネティック-比色法: 2-2. 2倍濃度試料溶液の調製に従い、2倍濃度試料溶液を調製する。



エンドトキシン試験用水 0.4mL

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のうち、0.1EU/mL エンドトキシン標準溶液を試料添加用のエンドトキシン 標準溶液として使用します。

2-4 ライセート試液の調製

(1) 1. 検量線の信頼性確認: 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。

2-5 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) エンドトキシン試験用水 (D液) および2-1で調製した検量線作成用エンドトキシン標準溶液 3濃度 (C液: 0.1, 0.025, 0.00625 EU/mL) の各0.1mL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)にエンドトキシン試験用水を0.05mLずつに分注する。
- (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0.05mL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0.05mLずつ分注する。
 - ●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。



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0.1mL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、ウェルリーダーMP-96にセットし、測定を開始する。
- (3) 測定終了後、測定結果を保存する。

2-7 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:ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、または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である)。
- (2) エンドトキシン回収率を算出し、試験の判定を行う。
 - ①B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」)。

定 量

3 定量

3-1 操作方法

- (1) 2. 反応干渉因子試験に従い、エンドトキシン標準溶液、2倍濃度試料溶液を調製する。
- (2) A, B, CおよびD液をマイクロプレート上で調製するため、プレートの所定のウェルに分注する。



- (3) 2反応干渉因子試験に従い、調製・溶解したライセート試液 0.1mLをシリンジで所定のウェルに添加する。
- (4) プレートに蓋をかぶせ、ウェルリーダーMP-96にセットし、測定を開始する。
- (5) 測定終了後、測定結果を保存する。

3-2 判定

(1) 試験の有効性を確認する。

以下のすべての条件に適合するとき、本試験は有効である。

- 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。
- ●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計算された、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が50~200%の範囲にある。
- ●D液: ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、または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である)。
- (2) 試験の判定を行う。
 - ①A液の平均エンドトキシン濃度に基づき、被験試料(希釈しない前の元被験試料)のエンドトキシンの濃度(EU/mL、EU/mg、EU/mEqまたはEU/単位)を算出する。
 - ②その値が医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被験試料はエンドトキシン試験に適合とする。

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法

ゲル化法 標準操作法

Pyrotell[®]によるゲル化法の標準操作法を示します。



日本薬局方におけるエンドトキシン試験法: ゲル化法

● 概要

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法を実施するに際して、ゲル化法の精度と有効性を保証するため、 予備試験としてライセート試薬の表示感度確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

▶ 予備試験

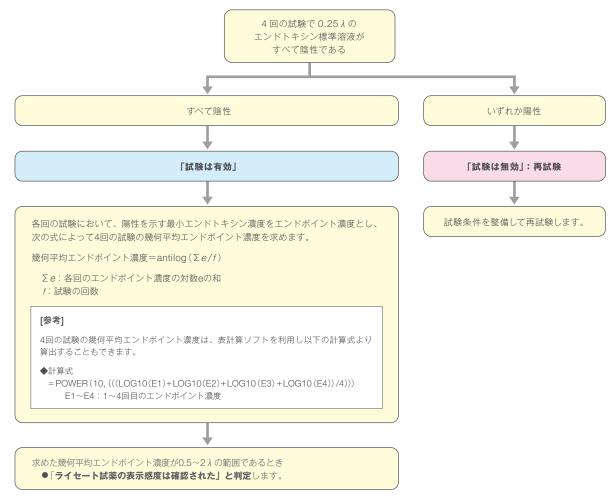
■ライセート試薬の表示感度確認試験

ライセート試薬の各ロットで、使用する前に、また試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときに行います。ライセート試薬の表示感度とは、ライセート試薬に規定されている条件下でのライセート試液の凝固に必要な最小エンドトキシン濃度です。使用する前にその表示感度 λ を確認しなければなりません。

操作法

ライセート試薬の表示感度確認試験は、調製した4種の濃度のエンドトキシン標準溶液 $(2\lambda,1\lambda,0.5\lambda,0.25\lambda)$ を用いて、この4種の液を一組とした試験を4回行います。

判定



●反応干渉因子試験、限度試験法および定量試験法には、その表示感度を用います。

■反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試料溶液について、反応を促進または阻害する因子の有無を調べる試験です。 試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行います。

操作法

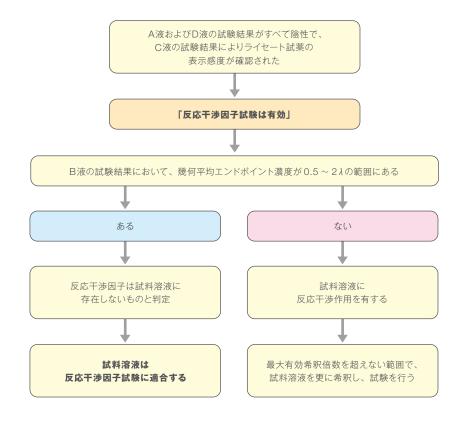
表2に従い、A, B, CおよびD液を調製し、AおよびB液は4回、CおよびD液は2回試験を行います。

表2

液	エンドトキシン濃度/被添加液	希釈液	希釈倍数	エンドトキシン濃度	試験の回数
A*1	0/試料溶液	_	_	_	4
			1	2 λ	
B*2	0.1 /計料添注	試料溶液	2	1 λ	4
8*** 21/ 試称	2λ/試料溶液		4	0.5 λ	
			8	0.25 λ	
			1	2 λ	
C*3	 2λ/エンドトキシン試験用水	エンドトキシン試験用水	2	1 λ	2
	21/エンドドキシン試験用小		4	0.5 λ	
			8	0.25 λ	
D*4	0/エンドトキシン試験用水	_	_	_	2

- *1 陰性対照、試料溶液のみ
- *2 反応干渉因子試験のための、標準エンドトキシンを添加した試料溶液
- *3 ライセート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液
- *4 陰性対照、エンドトキシン試験用水のみ

判定



限度試験法

限度試験法は、試料溶液が各条に規定されたエンドトキシン規格を超えるエンドトキシンを含むか否かを、ライセート試薬の表示感度に基づいてゲル化反応により判定する方法です。

(操作法)

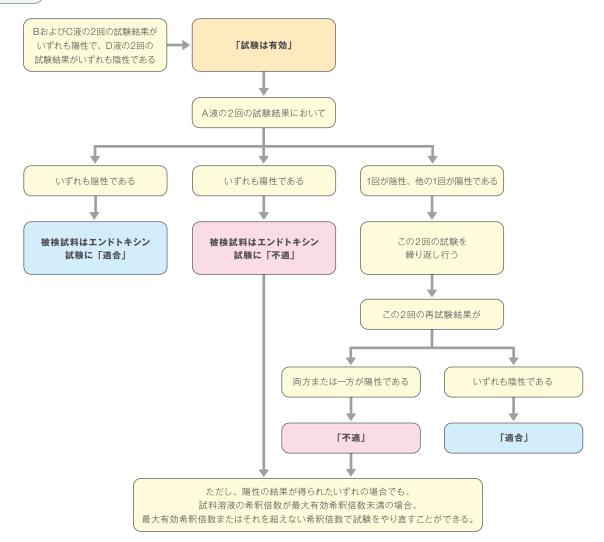
表3に従い、A, B, CおよびD液を調製し、これらの4種の液を一組として試験を2回行います。AおよびB液の試料溶液は、予備試験:反応干渉因子試験に適合する溶液を用います。

表3

液	エンドトキシン濃度/被添加液	試験の回数
A*1	0/試料溶液	2
B*2	2λ/試料溶液	2
C*3	2λ/エンドトキシン試験用水	2
D*4	0/エンドトキシン試験用水	2

- *1 限度試験のための試料溶液、最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈することができる
- *2 陽性対照、A液と同倍数で希釈された試料溶液で、終濃度2λとなるように標準エンドトキシンを添加したもの
- *3 陽性対照、濃度2λのエンドトキシン標準溶液
- *4 陰性対照、エンドトキシン試験用水のみ

判定



定量試験法

定量試験法は、被検試料のエンドトキシン濃度をゲル化反応のエンドポイントを求めることによって測定する方法です。

操作法

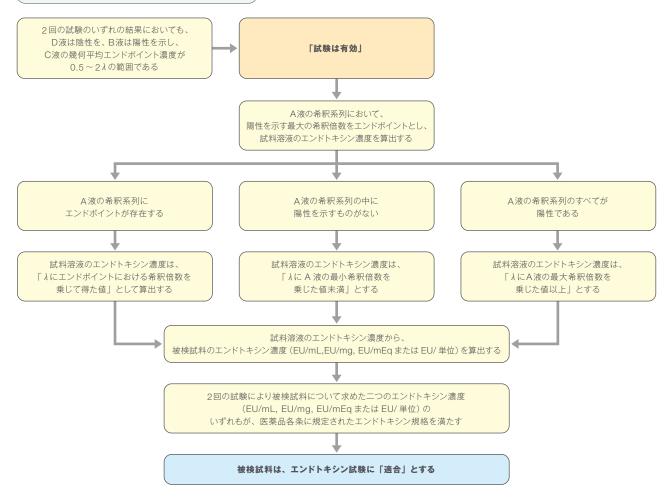
表4に従い、A, B, CおよびD液を調製し、これらの4種の液を一組として試験を2回行います。AおよびB液の試料溶液は、予備試験:反応干渉因子試験に適合する溶液を用います。

表4

液	エンドトキシン濃度/被添加液	希釈液	希釈倍数	エンドトキシン濃度	試験の回数
			1	_	
A*1	0/試料溶液	 エンドトキシン試験用水	2	_	2
A	0/ 試符合仪	エントトインン試験用小	4	_	
			8	_	
B*2	2λ/試料溶液	_	1	2 λ	2
			1	2 λ	
C*3	ロンファンドレナミハ 建設の	エンドトキシン試験用水	2	1 λ	2
0.40	2λ/エンドトキシン試験用水		4	0.5 λ	2
			8	0.25 λ	
D*4	0/エンドトキシン試験用水	_	_	_	2

- *1 定量試験のための試料溶液、段階希釈倍数は、最大有効希釈倍数を超えない範囲で適宜変更することができる
- *2 陽性対照、 Λ 液の最小希釈倍数と同倍数で希釈された試料溶液に、終濃度 2λ となるように標準エンドトキシンを添加したもの
- *3 ライセート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液
- *4 陰性対照、エンドトキシン試験用水のみ

エンドトキシン濃度の算出および判定



パイロテルを用いたゲル化法

λ: 0.03EU/mLのライセート試薬 (パイロテルマルチテストおよびシングルテスト) および試料溶液 (10倍希 釈液) を用いる標準操作法を示します。

■必要な試薬および器具

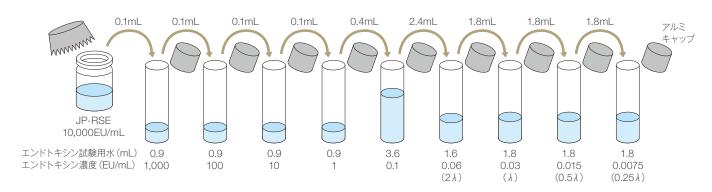
試 薬	●ライセート試薬:パイロテル●標準品:日本薬局方エンドトキシン標準品(以下、JP-RSE)●エンドトキシン試験用水(以下、LRW)
器具	 ●トキシペットサンプラー200、トキシペットサンプラー1000 ●トキシペットディスペンサー ●トキシペットチップ200、トキシペットチップ1000 ●トキシペットディスペンサー用シリンジ ●パイロチューブアルミキャップ付 (パイロテル用: 10×75mm、以下、試験管) ●乾熱滅菌アルミキャップ (以下、アルミキャップ) ●乾熱滅菌アルミ箔 (以下、アルミ箔) ●試験管ミキサー
恒温槽	●サーモアルミバスALB-121

標準操作法

1 標準溶液および試料溶液等の調製

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 (10,000EU/mL) を試験管ミキサーで1分間撹拌する。
- (2) 氷冷下でエンドトキシン試験用水を用いて10倍段階希釈を繰り返し、0.1 EU/mLを調製する。
- (3) さらに、下図のように希釈し、ライセート試薬の表示感度確認試験ならびにC液用のエンドトキシン標準溶液 $[0.06(2\lambda), 0.03(1\lambda), 0.015(0.5\lambda), 0.0075EU/mL(0.25\lambda)]$ 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。

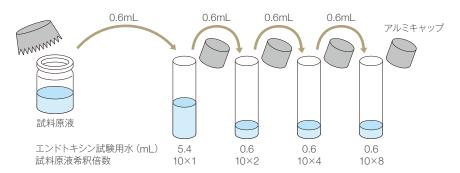


添加量	エンドトキシン濃度 (EU/mL)									
(mL)	10,000	1,000	100	10	1	0.1	0.06(2λ)	0.03(λ)	0.015(0.5λ)	0.0075(0.25λ)
JP-RSE		0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	2.4	1.8	1.8	1.8
LRW		0.9	0.9	0.9	0.9	3.6	1.6	1.8	1.8	1.8
					,					

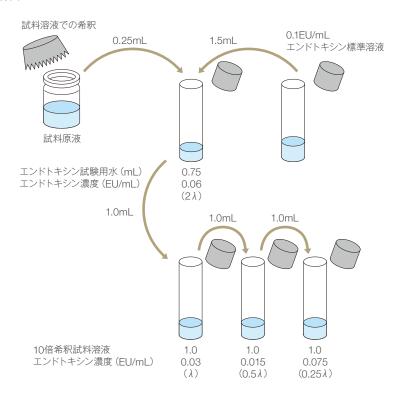
検量線作成に使用

1-2 その他の試料溶液の調製

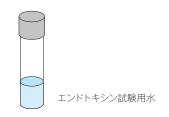
(1) A液の調製



(2) B液の調製



(3) D液の準備



1-3 ライセート試薬の準備

予備試験:ライセート試薬の表示感度確認試験 16本

反応干渉因子試験 30本

 限度試験法:
 8本

 定量試験法:
 20本

(1) 下図に従い、必要本数分のライセート試薬を準備する。



1-4 試料溶液等の添加

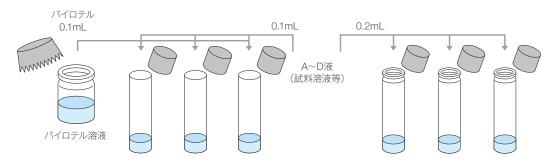
(1) 下図に従い、試料溶液等を添加する。

[マルチテスト]

A~D液の0.1mLずつをチップで分注した後、溶解したパイロテルの0.1mLずつをシリンジ等で添加します。

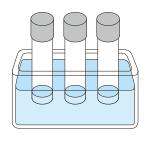
[シングルテスト]

A~D液の0.2mLずつをチップで添加します。



1-5 加温

- (1) アルミキャップで蓋をし、試験管ミキサーで1~2秒間撹拌する。
- (2) ドライブロック恒温槽で37(±1)℃で60(±2)分間静置する。
 - ●加温中は振動を与えないように注意してください。

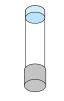


1-6 転倒

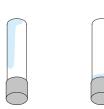
(1) 恒温槽より静かに取り出し、180°転倒する。



1-7 判定 (ゲル化法)







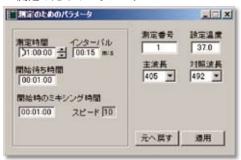
陰性: 180° 転倒するとゲルが落ちる またはゲルが形成されません。

ウェルリーダーMP-96を用いたカイネティック-比色法:設定条件

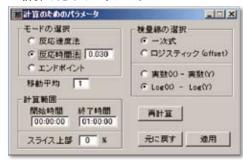
Pyrochrome® with Glucashield® Bufferを用いたカイネティック-比色法

カイネティック-比色法(反応時間法)

1. 測定のためのパラメータ



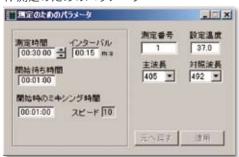
2. 計算のためのパラメータ



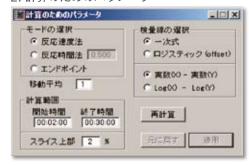
エンドスペシー® ES-50Mセットを用いたカイネティック-比色法

カイネティック-比色法(反応速度法)

1. 測定のためのパラメータ



2. 計算のためのパラメータ

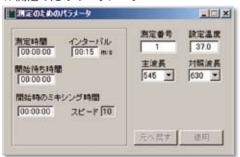


ウェルリーダーMP-96を用いたエンドポイント-比色法:設定条件

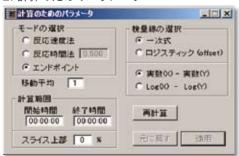
PvroColor® ジアゾ試薬DIA150-MPを用いたエンドポイント-比色法

エンドポイント-比色法

1. 測定のためのパラメータ



2. 計算のためのパラメータ

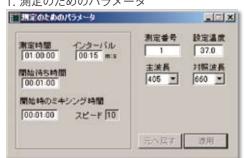


ウェルリーダーMP-96を用いたエンドポイント-比濁法:設定条件

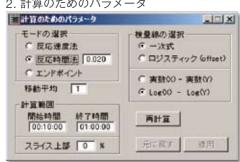
Pyrotell®-Tを用いたカイネティック-比濁法

カイネティック-比濁法(反応時間法)

1. 測定のためのパラメータ



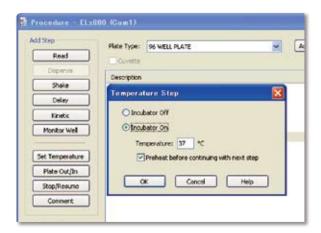
2. 計算のためのパラメータ

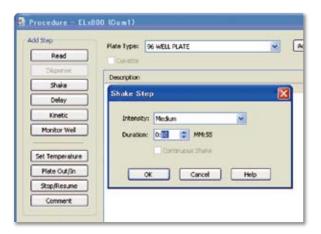


Incubating Microplate Readers ELx808™を用いたカイネティック -比色法:設定条件

Pyrochrome® with Glucashield® Bufferを用いたカイネティック-比色法

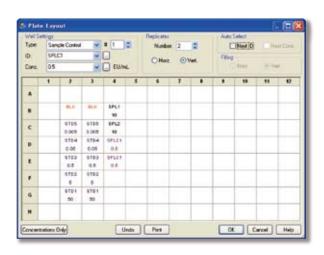
カイネティック-比色法(反応時間法)











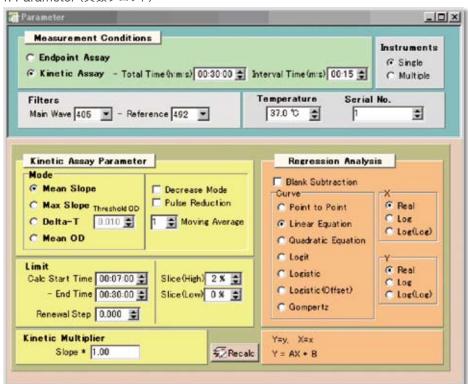


EGリーダーSV-12を用いたカイネティック-比色法:設定条件

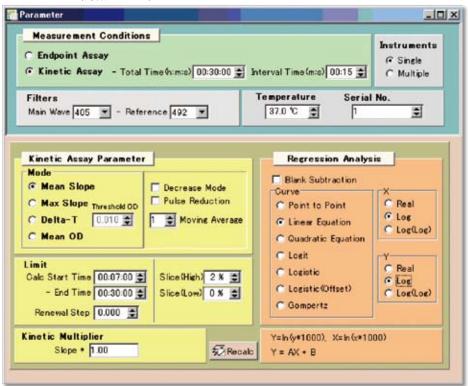
エンドスペシー® ES-24Sセットを用いたカイネティック-比色法

カイネティック-比色法(反応速度法)

1. Parameter (実数プロット)



2. Parameter (対数プロット)



参考

器具について

試験に用いるガラス製および耐熱性の器具は、少なくとも250℃で30分間の乾熱滅菌処理を行ってください。 また、マイクロプレートおよびマイクロピペット用チップなどのプラスチック製品を使用する場合は、エンドトキシンが 検出されないこと、およびエンドトキシン試験に対する干渉作用がないことを確認されたものを使用してください。

■エンドトキシン試験用水について

医薬品各条の「注射用水」もしくは「注射用水(容器入り)」またはその他の水で、エンドトキシン試験に用いるライセート 試薬の検出限界以上の濃度のエンドトキシンを含まず、エンドトキシン試験を行うのに適したものを使用してください。

■エンドトキシン標準原液の調製について

エンドトキシン標準原液は日本薬局方エンドトキシン標準品をエンドトキシン試験用水で溶解して調製します。

【調製方法】

- 1. 日本薬局方標準品エンドトキシン標準品バイアル中の試薬および口を汚染させないように、金属キャップおよびゴム栓をピンセットで取り外す。
- 2. 10,000EU/mLになるよう、添付文書に記載された用量のエンドトキシン試験用水を加える。
- 3. ゴム栓で蓋をし、蓋の周りにパラフィルムを巻き、密封し、試験管ミキサーで5分間攪拌する。
- 4. 調製したエンドトキシン標準原液は、使用まで冷蔵 (2~8℃以下) で保存する (溶解後は14日以内に使用する。直ちに使用しない時は、ゴム栓の上からパラフィルムで固定密封する)。

■最大有効希釈倍数について

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数のことをいいます。

1. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されている場合

試料溶液の濃度: 試料溶液の濃度の単位は、

エンドトキシン規格値が

質量当たり(EU/mg)で規定されている場合はmg/mL

当量当たり(EU/mEq)で規定されている場合はmEq/mL

生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL

容量当たり(EU/mL)で規定されている場合はmL/mL となります。

λ: ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL) 比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)

2. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されていない場合

最大有効希釈倍数 (MVD) =
$$\frac{K/M \times$$
 試料溶液の濃度 λ

エンドトキシン規格値:

注射剤のエンドトキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。

ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり、投与経路による区分に基づき、以下のように設定されます。

投与経路	K (EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内:放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2
その他の投与経路	5.0

また、Mは体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量です。ただし、注射剤が頻回または持続的に投与される場合、Mは1時間以内に投与される注射剤の最大総量です。

- 注1) 質量または単位に基づいて投与する製剤では、主薬の表示量を基準としてエンドトキシン規格値を設定する。
- 注2) 成人の体重1kgあたりの最大投与量を算出するとき、成人の平均体重として60kgを用いる。
- 注3) 体重1kgあたりの小児投与量がその成人投与量よりも多いときは、小児投与量に基づいてエンドトキシン規格値を 設定する。
- λ : ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)

比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)

付録:第十六改正日本薬局方 一般試験法4.01 エンドトキシン試験法(全文)

本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。

エンドトキシン試験法は、カプトガニ (Limulus polyphemus又は Tachypleus tridentatus)の血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用いて、グラム陰性菌由来のエンドトキシンを検出又は定量する方法である。本法には、エンドキシンの作用によるライセート試液のゲル形成を指標とするゲル化法及び光学的変化を指標とする光学的測定法がある。光学的測定法には、ライセート試液のゲル化過程における濁度変化を指標とする比濁法、及び合成基質の加水分解による発色を指標とする比色法がある。

エンドトキシン試験は、ゲル化法、比濁法又は比色法によって行う. ただし、その結果について疑義がある場合又は係争が生じた場合は、別に 規定するもののほか、ゲル化法によって最終の判定を行う.

本法はエンドトキシンによる汚染を避けて行う.

1. 器具

試験に用いるすべてのガラス製及びその他の耐熱性器具は、有効とされている方法により乾熱処理を行う、通例、少なくとも250℃で30分間の乾熱処理を行う。また、マルチウエルブレート及びマイクロビベット用チップなどのプラスチック製品を用いる場合は、エンドトキシンが検出されないこと及びエンドトキシン試験に対する干渉作用のないことが確認されたものを用いる。

2. 溶液の調製

2.1. エンドトキシン標準原液の調製

エンドトキシン標準原液はエンドトキシン標準品をエンドトキシン試験用水で溶解して調製する。エンドトキシン標準品の力価は、世界保健機関のエンドトキシン国際標準品を基準として標定される。なお、エンドトキシン単位はEUで示し、1EUは1エンドトキシン国際単位(IU)に等しい。

2.2. エンドトキシン標準溶液の調製

エンドトキシン標準溶液はエンドトキシン標準原液を十分に振り混ぜた後、 エンドトキシン試験用水で希釈して調製する. エンドトキシン標準溶液 は、エンドトキシンの容器への吸着を避けるため、できるだけ速やかに使用 する

2.3. 試料溶液の調製

別に規定するもののほか、被検試料をエンドトキシン試験用水で溶解又は希釈し、試料溶液とする。ライセート試液と試料溶液の混液のpHが用いるライセート試薬に規定されるpH範囲になるように、試料溶液のpHの調整を必要とする場合もある。通例、試料溶液のpHは、6.0~8.0の範囲にあればよい。pHの調整に用いる試液又は溶液はエンドトキシン試験用水を用いて調製し、エンドトキシンが検出されない容器に保存する。これらの試液又は溶液は、エンドトキシンが検出されないこと、及び反応干渉因子を含まないことが保証されたものでなければならない。

3. 最大有効希釈倍数の求め方

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数である.

最大有効希釈倍数は、次の式によって求める.

最大有効希釈倍数=(エンドトキシン規格値×試料溶液の濃度)/λ

エンドトキシン規格値:注射剤のエンドトキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、K/Mに等しい、なお、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量(EU/kg)であり、Mは体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量である。ただし、注射剤が頻回又は持続的に投与される場合は、Mは1時間以内に投与される注射剤の最大総量とする。

試料溶液の濃度:試料溶液の濃度の単位は、エンドトキシン規格値が質量 当たり(EU/mg)で規定されている場合はmg/mL、当量当たり(EU/mEq)で規定されている場合はmEq/mL、生物学的単位当たり(EU/単位)で規定されている場合は単位/mL、容量当たり(EU/mL)で規定されている場合は mL/mLである.

λ: ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL) であり、比濁 法又は比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL) である。

4. ゲル化法

本法は、エンドトキシンの存在によるライセート試液の凝固反応に基づいて、エンドトキシンを検出又は定量する方法である.

本法の精度と有効性を保証するために、「4.1.予備試験」として「4.1.1.ライセート試薬の表示感度確認試験」及び「4.1.2. 反応干渉因子試験」を行う.

4.1. 予備試験

4.1.1. ライセート試薬の表示感度確認試験

ライセート試薬の表示感度とは、ライセート試薬に規定されている条件下でのライセート試液の凝固に必要な最小エンドトキシン濃度である。ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前にその表示感度 λ を確認しなければならない。

本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う

ライセート試薬の表示感度の確認は、次の方法により行う.

エンドトキシン標準原液をエンドトキシン試験用水で希釈し、 2λ 、 1λ 、 0.5λ 及び 0.25λ 04種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製する.

ライセート試液及びそれと等しい量,通例,0.1mLのエンドトキシン標準溶液を試験管にとり,混和する.単回試験用の凍結乾燥ライセート試薬を用いる場合は、その容器にエンドトキシン標準溶液を直接加え、ライセート試薬を溶解する.

これらの試験管又は容器を通例、37±1℃に保ち、振動を避けて60±2分間静置した後、穏やかに約180°転倒し、内容物を観察する。流出しない堅固なゲルが形成されているとき、陽性とする。ゲルを形成しないか、又は形成したゲルが流出するとき、陰性とする。

調製した4種の濃度のエンドトキシン標準溶液を用いて、この4種の液を一組とした試験を4回行う。

各回の試験において、濃度0.25 λ のエンドトキシン標準溶液がすべて 陰性を示すとき、試験は有効である. 試験が有効でないときは、試験条件 を整備して再試験を行う.

各回の試験において、陽性を示す最小エンドトキシン濃度をエンドポイント濃度とし、次の式によって4回の試験の幾何平均エンドポイント濃度を求める

幾何平均エンドポイント濃度=antilog (Σe/f)

Σe : 各回のエンドポイント濃度の対数eの和

f:試験の回数

求めた幾何平均エンドポイント濃度が0.5~2λの範囲にあるとき、ライセート試薬の表示感度は確認されたと判定し、以下の試験にはその表示感度を用いる

4.1.2. 反応干渉因子試験

本試験は、試料溶液について、反応を促進又は阻害する因子の有無を 調べる試験である。

表4.01-1に従い、A、B、C及びD夜を調製し、A及びB液は4回、C及びD液は2回試験する. 反応温度、反応時間及びゲル化判定法は、4.1.1.に従う.

B液及びC液の幾何平均エンドポイント濃度は、4.1.1.の計算式を準用して乗れる

本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更 があるときにも行う。

A及びD液の試験結果がすべて陰性で、C液の試験結果によりライセート 試薬の表示感度が確認されたとき、反応干渉因子試験は有効とする.

B液の試験結果において幾何平均エンドポイント濃度が0.5~2 λ 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ものと判定し、試料溶液は反応干渉因子試験に適合とする、幾何平均エンドポイント濃度がこの

範囲にないとき、試料溶液は反応干渉作用を有する、試料溶液に反応干渉作用が認められるとき、最大有効希釈倍数を超えない範囲で試料溶液を更に希釈し、試験を行う、より高感度のライセート試薬を用いることにより、被検試料の最大有効希釈倍数をより大きくすることができる。なお、試料溶液から反応干渉作用を除くために、試料溶液又は希釈した試料溶液につき、適切な処理(ろ過、反応干渉因子の中和、透析又は加熱処理など)を施すことができる。ただし、処理によりエンドトキシンが損失しないことを保証するために、エンドトキシンを添加した試料溶液に当該の処理を施すことにより、上記の試験に適合する結果が得られることを確認する。

表4.01-1

液	エンドトキシン濃度 /被添加液	希釈液	希釈 倍数	エンドトキシン 濃度	試験の 回数
A*1	0/試料溶液	_	_	_	4
B*2	2 λ / 試料溶液	試料溶液	1 2 4 8	2 λ 1 λ 0.5 λ 0.25 λ	4
C*3	2 λ / エンドトキシン 試験用水	エンドトキシン試験用水	1 2 4 8	2 λ 1 λ 0.5 λ 0.25 λ	2
D*4	0/エンドトキシン 試験用水	_	_	_	2

- *1 陰性対照. 試料溶液のみ.
- *2 反応干渉因子試験のための、標準エンドトキシンを添加した試料溶液、
- *3 ライセート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液.
- *4 陰性対照. エンドトキシン試験用水のみ.

4.2. 限度試験法

本法は、被検試料が各条に規定されたエンドトキシン規格を超える エンドトキシンを含むか否かを、ライセート試薬の表示感度に基づいて ゲル化反応により判定する方法である.

4.2.1. 操作法

表4.01-2に従い、A、B、C及びD液を調製し、これらの4種の液を一組として試験を2回行う。A及びB液の試料溶液は、4.1.2.に適合する溶液を用いる。

反応温度, 反応時間及びゲル化判定は, 4.1.1.に準じる.

表4.01-2

液	エンドトキシン濃度/被添加液	試験の回数
A*1	0/試料溶液	2
B*2	2λ/試料溶液	2
C*3	2λ/エンドトキシン試験用水	2
D*4	0/エンドトキシン試験用水	2

- *1 限度試験のための試料溶液. 最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈することができる.
- *2 陽性対照 A液と同倍数で希釈された試料溶液で、終濃度2λとなるように標準エンドトキシンを添加したもの.
- *3 陽性対照. 濃度2λのエンドトキシン標準溶液.
- *4 陰性対照. エンドトキシン試験用水のみ

4.2.2. 判定

B及びC液の2回の試験結果がいずれも陽性で、D液の2回の試験結果がいずれも陰性のとき、試験は有効とする.

A液の2回の試験結果がいずれも陰性のとき、被検試料はエンドトキシン試験に適合とし、いずれも陽性のとき、不適とする.

A液の2回の試験結果において、1回が陰性で他の1回が陽性のとき、 この2回の試験を繰り返し行う、その2回の試験結果がいずれも陰性のとき、被検試料はエンドトキシン試験に適合とする。両方又は一方が陽性の場合は不適とする。

ただし、陽性の結果が得られたいずれの場合でも、試料溶液の希釈倍数が最大有効希釈倍数未満の場合、最大有効希釈倍数又はそれを超えない 希釈倍数で試験をやり直すことができる。

4.3 定量試験法

本法は、被検試料のエンドトキシン濃度をゲル化反応のエンドポイントを求めることにより測定する方法である.

4.3.1. 操作法

表4.01-3に従い、A、B、C及びD液を調製する.これらの4種の液を一組として試験を2回行う。A及びB液の試料溶液は、4.1.2.に適合する溶液を用いる。

試験の操作条件は4.1.1.に準じる.

表4.01-3

液	エンドトキシン濃度 /被添加液	希釈液	希釈 倍数	エンドトキシン 濃度	試験の 回数
A*1	0/試料溶液	エンドトキシン試験用水	1 2 4 8	- - - -	2
B*2	2λ/試料溶液	_	1	2λ	2
C*3	2 λ / エンドトキシン 試験用水	エンドトキシン試験用水	1 2 4 8	2 λ 1 λ 0.5 λ 0.25 λ	2
D*4	0/エンドトキシン 試験用水	_	_	_	2

- *1 定量試験のための試料溶液、段階希釈倍数は、最大有効希釈倍数を超えない範囲で適宜変更することができる。
- *2 陽性対照. A液の最小希釈倍数と同倍数で希釈された試料溶液に、終濃度2λとなるように標準エンドトキシンを添加したもの.
- *3 ライヤート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液
- *4 陰性対照. エンドトキシン試験用水のみ.

4.3.2. エンドトキシン濃度の算出及び判定

2回の試験のいずれの結果においても、D液は陰性を、B液は陽性を示し、C液の幾何平均エンドポイント濃度が $0.5\sim2\lambda$ の範囲にあるとき、試験は有効とする。

A液の希釈系列において、陽性を示す最大の希釈倍数をエンドポイントとし、 λ にエンドポイントにおける希釈倍数を乗じて得た値を試料溶液のエンドトキシン濃度とする.

A液の希釈系列の中に陽性を示すものがないとき、試料溶液のエンドトキシン濃度は λ にA液の最小希釈倍数を乗じた値未満とする.

A液の希釈系列のすべてが陽性のとき、試料溶液のエンドトキシン濃度は、 λ にA液の最大希釈倍数を乗じた値以上とする.

試料溶液のエンドトキシン濃度から、被検試料のエンドトキシン濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq又はEU/単位)を算出する.

2回の試験により被検試料について求めた二つのエンドトキシン濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq又はEU/単位) のいずれもが、医薬品各条に 規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被検試料はエンドトキシン 試験に適合とする.

5. 光学的定量法

5.1. 比濁法

本法は、ライセート試液のゲル化に伴う濁度の変化を測定することにより、被検試料のエンドトキシン濃度を測定する方法である。エンドポイントー比濁法とカイネティックー比濁法がある。

エンドボイントー比濁法は、エンドトキシン濃度と一定反応時間後に おける反応液の濁度との間の用量反応関係に基づく方法である.

カイネティックー比濁法は、エンドトキシン濃度と反応液があらかじめ 設定された濁度に達するのに要した時間又は濁度の経時変化率との間の 用量反応関係に基づく方法である.

試験は、通例、37±1℃で行い、濁度は吸光度又は透過率で示される.

5.2. 比色法

本法は、エンドトキシンのライセート試液との反応により、発色合成 基質から游離される発色基の量を吸光度又は透過率で測定することにより、 エンドトキシンを定量する方法である. エンドポイントー比色法とカイネティックー比色法がある.

エンドポイントー比色法は、エンドトキシン濃度と一定反応時間後に おける発色基の遊離量との間の用量反応関係に基づく方法である.

カイネティックー比色法は、エンドトキシン濃度と反応液があらかじめ 設定された吸光度又は透過率に達するのに要する時間又は発色の経時変化 率との間の用量反応関係に基づく方法である。

試験は,通例,37±1℃で行う.

5.3. 予備試験

比濁法又は比色法の精度と有効性を保証するために、「5.3.1.検量線の 信頼性確認試験|及び「5.3.2.反応干渉因子試験|を行う。

5.3.1. 検量線の信頼性確認試験

ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前にその検量線の信頼性を 確認しなければならない。

本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更 があるときにも行う.

用いるライセート試薬に規定されているエンドトキシンの濃度範囲内で、少なくとも3種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製し、これらの各濃度の溶液につき、3回以上測定して検量線を作成する。エンドトキシン標準溶液とライセート試液の容量比、反応時間、反応温度、pHなどの操作条件は用いるライセート試薬の至適条件に従う。

検量線の濃度範囲を2桁より大きくするとき、1桁大きくするごとに用いる エンドトキシン標準溶液の濃度を1濃度ずつ追加する。

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以上であるとき、検量線の信頼性は確認されたと判定する。

検量線の信頼性が確認されなかったときは、試験条件を整備して再試験 を行う。

5.3.2. 反応干渉因子試験

表4.01-4に従い、A、B、C及びD液を調製して、試験を行う、ライセート 試液の採取量、ライセート試液に対する試料溶液の容量比、反応時間などの 操作条件は、用いるライセート試薬の至適条件に従う。

本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

表4.01-4

液	エンドトキシン濃度	被添加液	試験管又はウェルの数
A*1	0	試料溶液	2以上
B*2	検量線の中点濃度*2	試料溶液	2以上
C*3	3濃度以上	エンドトキシン試験用水	各濃度,2以上
D*4	0	エンドトキシン試験用水	2以上

- *1 試料溶液のみ(試料溶液のエンドトキシン濃度測定用). 最大有効希釈倍数を超えない 範囲で希釈することができる.
- *2 A液と同倍数で希釈された試料溶液で、検量線の中点又は中点付近のエンドトキシン 濃度になるように標準エンドトキシンを添加したもの.
- *3 5.3.1.で用いた各種濃度のエンドトキシン標準溶液(検量線作成用)
- *4 陰性対照. エンドトキシン試験用水のみ.

本試験は次の二つの条件に適合するとき、有効である.

- 1. C液で作成した検量線の相関係数の絶対値は0.980以上である.
- 2. D液の測定結果は、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、又はエンドトキシンの検出限界未満である.

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.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し.反応干渉因子試験に適合とする.

エンドトキシンの回収率が規定の範囲にないとき、試料溶液は反応干渉作用を有する. 試料溶液に反応干渉作用が認められるとき、最大有効希釈倍数を超えない範囲で試料溶液を更に希釈し、試験を行う. なお、試料溶液又は最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈した試料溶液から反応干渉

因子を除くために、適切な処理(ろ過、反応干渉医子の中和、透析又は加熱処理など)を施すことができる。ただし、処理によりエンドトキシンが損失しないことを保証するために、エンドトキシンを添加した試料溶液に当該の処理を施すことにより、上記の試験に適合する結果が得られることを確認する。

5.4. 定量

5.4.1. 操作法

表4.01-4に示すA, B, C及びD液を調製し、5.3.2.に準じて操作する.

5.4.2. エンドトキシン濃度の算出

C液で作成した検量線を用い、A液の平均エンドトキシン濃度を算出する. 本試験は次のすべての条件に適合するとき、有効である.

- 1. C液で作成した検量線の相関係数の絶対値は0.980以上である。
- 2. 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とき、その回収率は50~200%の範囲に ある。
- 3. D液の結果が、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、又はエンドトキシンの検出限界未満である.

5.4.3. 判定

A液の平均エンドトキシン濃度に基づき、被検試料のエンドトキシンの 濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq又はEU/単位)を求め、その値が医薬品 各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被検試料はエンド トキシン試験に適合とする。

付録:第十六改正日本薬局方における改正点

第十六改正日本薬局方エンドトキシン試験における改正点

前述のとおり、三極薬局方検討会議 (PDG) の再調和テキストに基づき、第十六改正にて「4.01エンドトキシン試験法」が施行されました。

今回の改正の要点は、「国際調和テキストへの整合」、「的確かつ簡潔な記載を原則とし、調和テキストに準拠して解説的な文章を追加し、より理解しやすい記載」で、全般的に記載整備を行ったもので、試験法の本質は変更ありません。以下に、変更点を記載します。

<改正点>

(以下、赤字:削除箇所、青字:変更箇所)

章節番号の付与

1. 器具
2. 溶液の調製
2.1. エンドトキシン標準原液の調製
2.2. エンドトキシン標準溶液の調製
2.3. 試料溶液の調製
3. 最大有効希釈倍率の求め方
4. ゲル化法
4.1. 予備試験
4.1.1. ライセート試薬の表示感度確認試験
4.1.2. 反応干渉因子試験
4.2. 限度試験法
4.2.1. 操作法
4.2.2. 判定
4.3. 定量試験法
4.3.1. 操作法
4.3.2. エンドトキシン濃度の算出および判定
5. 光学的定量法
5.1. 比濁法
5.2. 比色法
5.3. 予備試験
5.3.1. 検量線の信頼性確認試験
5.3.2. 反応干涉因子試験
5.4. 定量
5.4.1. 操作法
5.4.2. エンドトキシン濃度の算出
5.4.3. 判定

日局の先行/独自記載箇所がなくなる

「◆ ◆」の箇所;序文+7箇所

国際調和により、独自記載シンボルを示す必要がなくなった箇所。

序文

第十五改正

本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。なお、 三薬局方で調和されていない部分は「◆ ◆」で囲むことにより示す。



第十六改正

本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である

2. 溶液の調製、2.1. エンドトキシン標準原液の調製

マークが外れるとともに、エンドトキシン標準品が世界保健機関の標準品で標定され、力価が国際的に統一されました。

第十五改正	第十五改正第一追補
◆エンドトキシン標準原液はエンドトキシン10000標準品又はエンドトキシン1000標準品をエンドトキシン試験用水で溶解して調製する.◆	◆エンドトキシン標準原液はエンドトキシン標準品をエンドトキシン 試験用水で溶解して調製する.◆



第十六改正

エンドトキシン標準原液はエンドトキシン標準品をエンドトキシン試験用水で溶解して調製する。エンドトキシン標準品の力価は、世界保健機関のエンドトキシン国際標準品を基準として標定される。

2. 溶液の調製、2.3. 試料溶液の調製

医薬品容器試験に関する記載が削除されました。

第十五改正

◆医薬品容器の試験では、別に規定する方法に従い、試料溶液を調製する.◆



第十六改正

削除

3. 最大有効希釈倍率の求め方

試料溶液の濃度の単位の1つとして記載されている「当量当たり(EU/mEq)」が 国際調和されました。

第十五改正

試料溶液の濃度の単位は、エンドトキシン規格値が質量当たり (EU/mg) で規定されている場合はmg/mL. ◆当量当たり (EU/mEq) で規定されている場合はmEq/mL. ◆ (中略) である.



第十六改正

試料溶液の濃度の単位は、エンドトキシン規格値が質量当たり (EU/mg) で規定されている場合はmg/mL、当量当たり (EU/mEq) で規定されている場合はmEq/mL、(中略) である.

5. 光学的定量法、5.3. 予備試験、5.3.1. 検量線の信頼性確認試験

第十五改正

◆本試験は、ライセート試薬の各ロットにつき行う. ◆



第十六改正

ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前にその検量線の信頼性を確認 しなければならない。

5 光学的定量法、53 予備試験、532 反応干渉因子試験

第十五改正

- ◆本試験は次の条件に適合しないとき、無効である。
- 1. C液で作成した検量線の相関係数の絶対値は0.980以上である.
- 2. D液の測定結果は、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、又はエンドトキシンの検出限界未満である。◆



第十六改正

本試験は次の二つの条件に適合するとき、有効である.

- 1. C液で作成した検量線の相関係数の絶対値は0.980以上である.
- 2. D液の測定結果は、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超 えないか、又はエンドトキシンの検出限界未満である.

5. 光学的定量法、5.3. 予備試験、5.3.2. 反応干涉因子試験

第十五改正

◆エンドトキシンの回収率が規定の範囲にないとき、試料溶液は反応干渉作用を有する. 試料溶液に反応干渉作用が認められるとき、最大有効希釈倍数を超えない範囲で試料溶液を更に希釈し、試験を行う. なお、試料溶液又は最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈した試料溶液から反応干渉因子を除くために、ろ過、反応干渉因子の中和、透析又は加熱処理などを施すことができる。◆



第十六改正

エンドトキシンの回収率が規定の範囲にないとき、試料溶液は反応干渉作用を有する. 試料溶液に反応干渉作用が認められるとき、最大有効希釈倍数を超えない範囲で試料溶液を更に希釈し、試験を行う. なお、試料溶液又は最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈した試料溶液から反応干渉因子を除くために、適切な処理(ろ過、反応干渉因子の中和、透析又は加熱処理など)を施すことができる

5. 光学的定量法、5.4. 予備試験、5.4.2. エンドトキシン濃度の算出

第十五改正

3. D液の結果が、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、◆又はエンドトキシンの検出限界未満である.◆



第十六改正

3. D液の結果が、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、又はエンドトキシンの検出限界未満である.

国際調和テキストの改正への対応

エンドトキシン規格値の設定式 「K/M」

「M」の定義がより詳細に記述され、単回投与、繰り返し投与、連続投与にも対応。

第十五改正

Mは体重1kg当たり1時間内に投与する注射剤の最大量である.



第十六改正

Mは体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量である。ただし、注射薬が頻回又は持続的に投与される場合は、Mは1時間以内に投与される注射剤の最大総量とする。

4. ゲル化法、4.3. 定量試験法、

4.3.2. エンドトキシン濃度の算出および判定

判定方法が一部修正され、第十五改正では2回試験の平均濃度で判定していたが、第十六改正では各回の評価結果で判定することとなりました。

第十五改正

A液の2回の試験結果より、幾何平均エンドトキシン濃度を求める。幾何平均エンドトキシン濃度は、(1)予備試験(j)ライセート試薬の表示感度確認試験の計算式を準用して求める。(中略)A液の平均エンドトキシン濃度から、被検試料のエンドトキシンの濃度(EU/mL,EU/mg,EU/mEq又はEU/単位)を算出する。

被検試料のエンドトキシンの濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq又はEU/単位)が、医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被検試料はエンドトキシン試験に適合する.



第十六改正

試料溶液のエンドトキシン濃度から、被検試料のエンドトキシン濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq又はEU/単位)を算出する.

2回の試験により被検試料について求めた二つのエンドトキシン濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq又はEU/単位) のいずれもが、医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被検試料はエンドトキシン試験に適合とする.

5. 光学的定量法、5.3. 予備試験、5.3.2. 反応干涉因子試験

試験条件の追記があり、反応干渉因子除去処理の妥当性の検証が求められるようになりました。

第十五改正

なお、試料溶液又は最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈した試料溶液から反応干渉因子を除くために、ろ過、反応干渉因子の中和、透析又は加熱処理などを施すことができる。



第十六改正

なお、試料溶液又は最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈した試料溶液から反応干渉因子を除くために、適切な処理(ろ過、反応干渉因子の中和、透析又は加熱処理など)を施すことができる。ただし、処理によりエンドトキシンが損失しないことを保証するために、エンドトキシンを添加した試料溶液に当該の処理を施すことにより、上記の試験に適合する結果が得られることを確認する。

記載の整備

試験薬構成表

試験薬各液の注釈が詳しく記載され、より分かりやすく記載されています。

4. ゲル化法、4.1 予備試験、4.1.2. 反応干渉因子試験、表4.01-1

液	エンドトキシン濃度 /被添加液	希釈液	希釈 倍数	エンドトキシン 濃度	試験の 回数
A*1	0/試料溶液	_	_	_	4
B*2	2) / 試料溶液	試料溶液	1 2 4 8	2 λ 1 λ 0.5 λ 0.25 λ	4
C*3	2 λ / エンドトキシン 試験用水	エンドトキシン試験用水	1 2 4 8	2 λ 1 λ 0.5 λ 0.25 λ	2
D*4	0/エンドトキシン 試験用水	_	_	-	2

- *1 陰性対照. 試料溶液のみ.
- *2 反応干渉因子試験のための、標準エンドトキシンを添加した試料溶液.
- *3 ライセート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液.
- *4 陰性対照. エンドトキシン試験用水のみ.

4 ゲル化法、4 2 限度試験法、4 2 1 操作法、表4 01-2

液	エンドトキシン濃度/被添加液	試験の回数
A*1	0/試料溶液	2
B*2	2λ/試料溶液	2
C*3	2 λ / エンドトキシン試験用水	2
D*4	0/エンドトキシン試験用水	2

- *1 限度試験のための試料溶液、最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈することができる。
- *2 陽性対照、A液と同倍数で希釈された試料溶液で、終濃度21となるように標準エンドトキシンを添加したもの。
- *3 陽性対照. 濃度2λのエンドトキシン標準溶液.
- *4 陰性対照. エンドトキシン試験用水のみ.

4. ゲル化法、4.3 定量試験法、4.3.1. 操作方法、表4.01-3

液	エンドトキシン濃度 /被添加液	希釈液	希釈 倍数	エンドトキシン 濃度	試験の 回数
A*1	0/試料溶液	エンドトキシン試験用水	1 2 4 8	- - - -	2
B*2	2λ/試料溶液	_	1	2λ	2
C*3	2 λ / エンドトキシン 試験用水	エンドトキシン試験用水	1 2 4 8	2 λ 1 λ 0.5 λ 0.25 λ	2
D*4	0/エンドトキシン 試験用水	-	_	_	2

- *1 定量試験のための試料溶液、段階希釈倍数は、最大有効希釈倍数を超えない範囲で適宜 変更することができる。
- *2 陰性対照. A液の最小希釈倍数と同倍数で希釈された試料溶液に、終濃度2 λ となるように標準エンドトキシンを添加したもの.
- *3 ライセート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液.
- *4 陰性対照. エンドトキシン試験用水のみ.

5. 光学的定量法、5.3. 予備試験、5.3.2. 反応干涉因子試験、表4.01-4

液	エンドトキシン濃度	被添加液	試験管又はウェルの数
A*1	0	試料溶液	2以上
B*2	検量線の中点濃度*2	試料溶液	2以上
C*3	3濃度以上	エンドトキシン試験用水	各濃度,2以上
D*4	0	エンドトキシン試験用水	2以上

- *1 試料のみ(試料溶液のエンドトキシン濃度測定用). 最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈することができる.
- *2 A液と同倍数で希釈された試料溶液で、検量線の中点又は中点付近のエンドトキシン 濃度になるように標準エンドトキシンを添加したもの。
- *3 5.3.1. で用いた各濃度のエンドトキシン標準溶液(検量線作成用).
- *4 陰性対照. エンドトキシン試験用水のみ.

2. 溶液の調製、2.3. 試料溶液の調製

pH調整試液の事前確認が必要となりました。

第十五改正

pHの調整に用いる試液又は溶液はエンドトキシン試験用水を用いて調製し、エンドトキシンが検出されない容器に保存する.



第十六改正

pHの調整に用いる試液又は溶液はエンドトキシン試験用水を用いて調製し、エンドトキシンが検出されない容器に保存する。これらの試液又は溶液は、エンドトキシンが検出されないこと、及び反応干渉因子を含まないことが保証されたものでなければならない。

4. ゲル化法、4.1. 予備試験、4.1.1. ライセート試薬の表示感度確認試験

求めた幾何平均エンドポイント濃度が λ ではなく、 $0.5\sim2\lambda$ の範囲の場合でも、あくまで使用している試薬の表示感度が λ である。すなわち、試薬の表示感度が0.05EU/mLの場合には、 λ は0.05EU/mLとして試験する。

第十五改正

求めた幾何平均エンドトキシン濃度が0.5~2 λ の範囲にあるとき、ライセート試薬の表示感度は確認されたことになる。



第十六改正

求めた幾何平均エンドトキシン濃度が0.5~2 λ の範囲にあるとき,ライセート試薬の表示感度は確認されたと判定し,以下の試験にはその表示感度を用いる.

5. 光学的定量法、5.3. 予備試験、5.3.1. 検量線の信頼性確認試験

ライセート試薬は、ロット毎、使用する前に信頼性確認試験を実施する 必要があります。

第十五改正

◆本試験は、ライセート試薬の各ロットにつき<mark>行う.</mark> ◆ (中略)

作成した検量線の相関係数 r を求めるとき、その絶対値 |r| が0.980以上であることを確認する。



第十六改正

ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前にその検量線の信頼性を確認 しなければならない.(中略)

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以上であるとき、検量線の信頼性は確認されたと判定する.

5. 光学的定量法、5.4. 定量、5.4.2. エンドトキシン濃度の算出

第十五改正

ただし、次のすべての条件に適合しないとき、試験は無効である。



第十六改正

本試験は次のすべての条件に適合するとき、有効である.

・日局の「医薬品の試験に用いる水」の記載変更に伴う変更

「9.41. 試薬・試液;エンドトキシン試験用水」

通則20日局の「医薬品の試験に用いる水」の記載に変更があり、それに 伴う記載の変更

第十五改正

(医薬品各条, 「注射用水」又はその他の方法により製造した水で, エンドトキシン試験に用いるライセート試薬の検出限界で反応を示さないもの.)



第十六改正

医薬品各条の「注射用水」若しくは「注射用水 (容器入り)」又はその他の水で、エンドトキシン試験に用いるライセート試薬の検出限界以上の濃度のエンドトキシンを含まず、エンドトキシン試験を行うのに適したもの.

参考;通則20の変更

第十五改正

医薬品の試験に用いる水は、別に規定するもののほか、「精製水」とする.



第十六改正

医薬品等の試験に用いる水は、試験を妨害する物質を含まないなど、試験を行うのに適した水とする。

付録:主な医薬品のエンドトキシン規格値

一般名称	規 格 値	一般名称	規 格 値
アシクロビル注射液	0.5EU/mg	輸血用クエン酸ナトリウム注射液	5.6EU/mL
アスコルビン酸注射液	0.15EU/mg	クリンダマイシンリン酸エステル注射液	0.1EU/mg (力価)
注射用アズトレオナム	0.10EU/mg (力価)	クロルフェニラミンマレイン酸塩注射液	8.8EU/mg
アトロピン硫酸塩注射液	75EU/mg	シアノコバラミン注射液	0.30EU/μg
アミカシン硫酸塩注射液	0.50EU/mg (力価)	ジゴキシン注射液	200EU/mg
注射用アミカシン硫酸塩	0.50EU/mg (力価)	ジモルホラミン注射液*1	5.0EU/mg
アミノフィリン注射液	0.6EU/mg	注射用水	0.25EU/mL
注射用アムホテリシンB	3.0EU/mg (力価)	注射用水 (容器入り)	0.25EU/mL
L-アルギニン塩酸塩注射液	0.50EU/mL	スキサメトニウム塩化物注射液	2.0EU/mg
アルプロスタジル注射液	10EU/mL	注射用スキサメトニウム塩化物	1.5EU/mg
アルベカシン硫酸塩注射液	0.50EU/mg (力価)	注射用ストレプトマイシン硫酸塩	0.10EU/mg (力価)
アレンドロン酸ナトリウム注射液	119EU/mg	血清性性腺刺激ホルモン	0.1EU/単位
注射用アンビシリンナトリウム	0.075EU/mg (力価)	注射用血清性性腺刺激ホルモン	0.1EU/単位
イオタラム酸ナトリウム注射液	3.4EU/mL	ヒト下垂体性性腺刺激ホルモン*2	0.66EU/単位
イセパマイシン硫酸塩注射液	0.50EU/mg (力価)	ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン	0.03EU/単位
イソニアジド注射液	0.50EU/mg	注射用ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン	0.03EU/単位
イダルビシン塩酸塩	8.9EU/mg (力価)	生理食塩液	0.50EU/mL
注射用イダルビシン塩酸塩	8.9EU/mg (力価)	セファゾリンナトリウム水和物	0.10EU/mg (力価)
注射用イミペネム・シラスタチンナトリウム	0.25EU/mg (力価)	注射用セファゾリンナトリウム	0.05EU/mg (力価)
インジゴカルミン注射液	7.5EU/mg	セフェピム塩酸塩水和物	0.04EU/mg (力価)
ヒトインスリン(遺伝子組換え)	10EU/mg	注射用セフェビム塩酸塩	0.06EU/mg (力価)
エドロホニウム塩化物注射液	15EU/mg	セフォゾブラン塩酸塩	0.05EU/mg (力価)
エフェドリン塩酸塩注射液	7.5EU/mg	注射用セフォゾブラン塩酸塩	0.05EU/mg (力価)
エルゴメトリンマレイン酸塩注射液	1500EU/mg	注射用セフォチアム塩酸塩	0.125EU/mg (力価)
塩化カルシウム注射液	0.30EU/mg	注射用セフタジジム	0.067EU/mg (力価)
10%塩化ナトリウム注射液	3.6EU/mL	セフピロム硫酸塩	0.10EU/mg (力価)
オキシトシン注射液	10EU/単位	注射用セフメタゾールナトリウム	0.06EU/mg (力価)
注射用オザグレルナトリウム	3.7EU/mg	セルモロイキン(遺伝子組換え)	100EU/mL
果糖注射液	0.50EU/mL	タゾバクタム	0.04EU/mg (力価)
キシリトール注射液	0.50EU/mL	炭酸水素ナトリウム注射液	5.0EU/mEq

一般名称	規 格 値	一般名称	規 格 値		
注射用チアミラールナトリウム	1.0EU/mg	注射用ファモチジン	15EU/mg		
チアミン塩化物塩酸塩注射液	6.0EU/mg	フェノールスルホンフタレイン注射液	7.5EU/mg		
注射用チオペンタールナトリウム	0.30EU/mg	ブドウ糖注射液	0.50EU/mg		
チオ硫酸ナトリウム注射液	0.01EU/mg	注射用プレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム	2.4EU/mg*4		
テイコプラニン	0.75EU/mg (力価)	プロカイン塩酸塩注射液*5	0.02EU/mg		
デキストラン40	2.5EU/g	プロカインアミド塩酸塩注射液	0.30EU/mg		
デキストラン40注射液	0.50EU/mL	フロセミド注射液	1.25EU/mg		
デスラノシド注射液	500EU/mg	プロタミン硫酸塩注射液	6.0EU/mg		
テセロイキン(遺伝子組換え)	5EU/ たん白質1mg	注射用フロモキセフナトリウム	0.025EU/mg		
注射用テセロイキン(遺伝子組換え)	5EU/35万単位	ペチジン塩酸塩注射液	6.0EU/mg		
デヒドロコール酸注射液	0.30EU/mg	ヘパリンカルシウム	0.0030EU/ ヘパリン単位		
注射用ドキソルビシン塩酸塩	2.50EU/mg (力価)	ヘパリンナトリウム注射液	0.0030EU/単位		
ドパミン塩酸塩注射液	4.2EU/mg	注射用ペプロマイシン硫酸塩	1.5EU/mg (力価)		
トブラマイシン注射液	0.50EU/mg (力価)	注射用ベンジルベニシリンカリウム	1.25×10 ⁻⁴ EU/単位		
トラネキサム酸注射液	0.12EU/mg	注射用ホスホマイシンナトリウム	0.025EU/mg (力価)		
ニカルジピン塩酸塩注射液	8.33EU/mg	注射用マイトマイシンC	10EU/mg (力価)		
ニコチン酸注射液	3.0EU/mg	D-マンニトール注射液	0.50EU/mL		
ネオスチグミンメチル硫酸塩注射液	5EU/mg	注射用ミノサイクリン塩酸塩	1.25EU/mg (力価)		
ノルアドレナリン注射液	300EU/mg	メピバカイン塩酸塩注射液	0.6EU/mg		
精製白糖*3	0.25EU/mg	注射用メロペネム	0.12EU/mg (力価)		
バソプレシン注射液	15EU/ バソプレシン単位	モルヒネ塩酸塩注射液	1.5EU/mg		
パニペネム	0.15EU/mg (力価)	リドカイン注射液	1.0EU/mg		
パパベリン塩酸塩注射液	6.0EU/mg	リポフラビンリン酸エステルナトリウム注射液	10EU/mg		
注射用バンコマイシン塩酸塩	0.25EU/mg (力価)	硫酸マグネシウム注射液	0.09EU/mg		
注射用ヒドララジン塩酸塩	5.0EU/mg	リンゲル液	0.50EU/mL		
ピペラシリン水和物	0.07EU/mg (力価)	リンコマイシン塩酸塩注射液	0.50EU/mg (力価)		
注射用ピペラシリンナトリウム	0.04EU/mg (力価)	レバロルファン酒石酸塩注射液	150EU/mg		
ピリドキシン塩酸塩注射液	3.0EU/mg	注射用ロキサチジン酢酸エステル塩酸塩	4.0EU/mg		
注射用ビンブラスチン硫酸塩	10EU/mg	太字は第十六改正日本業局方における新規収載品 *1 ただし、エンドトキシン試験用水を用いて 0.15w/v% に希釈して試験を行う。 *2 本品をエンドトキシン試験用水 1mL 当たり 75 卵胞刺激ホルモン単位を溶かし、試験を行うと			
ファモチジン注射液	15EU/mg	エンドトキシンとして 1 卵胞刺激ホルモン単位当たり 0.66EU 未満である。 *3 ただし、大容量輸液の調製に用いるもの。 *4 プレドニゾロン 1mg 対応量当たり 2.4EU 未満。			

^{*4} プレドニゾロン 1mg 対応量当たり 2.4EU 未満。 *5 ただし、脊髄腔内に投与する製品に適用。

製品一覧

コード	品 名	包装	価格(円)	コード	品 名	包装	価格(円)	
[LAL試薬]		900637	吸光度校正用NDフィルター	1セット	120,000			
■比色法				900638	追加トレーサビリティ証明 (NDフィルター)	1波長	15,000	
010265	パイロクロム	1セット	23,000	900639	NDフィルター校正点検	1波長	15,000	
020130	トキシカラー®LS-50Mセット	1セット	21,000	900641	フィルター450nm	1枚	60,000	
020150	エンドスペシー®ES-50Mセット	1セット	28,000	900642	フィルター570nm	1枚	60,000	
020170	エンドスペシー®ES-24Sセット	1セット	33,000	900643	フィルター660nm	1枚	60,000	
■比濁法				900645	キャリブレーションプレート (OCP2000型)	1セット	160,000	
010250	パイロテル-T	1本	18,000	900646	追加トレーサビリティ証明 (キャリプレーションプレート)	1波長	15,000	
■ゲル化法	\$			900647	キャリブレーションプレート校正点検	1波長	15,000	
010210	パイロテル マルチテスト (0.03EU/mL)	1本	18,000	900648	IQ/OQ手順書	一式	150,000	
010215	パイロテル マルチテスト (0.06EU/mL)	1本	17,500	900649	IQ/OQ作業料金 (手順書付き)	一式	240,000	
010220	パイロテル マルチテスト (0.125EU/mL)	1本	17,000	900651	フィルター405nm	1枚	45,000	
010230	パイロテル シングルテスト (0.03EU/mL)	10本	12,000	900652	フィルター492nm	1枚	45,000	
010240	パイロテル シングルテスト (0.125EU/mL)	10本	10,000	900653	フィルター545nm	1枚	45,000	
010245	パイロテル シングルテスト (0.25EU/mL)	10本	10,000	900654	フィルター630nm	1枚	45,000	
[LAL関連	試薬]			900656	SK603光源ランプ	1個	15,000	
■エンドト	トキシン標準品			■その他員	■その他関連機器			
010020	コントロールスタンダードエンドトキシン (E.coli 0113, 10ng/vial, パイロクロム用)	1本	7,000	900481	サーモアルミバスALB-121 アルミブロック (ø10.5mmX45mm, 36穴)	1個	23,000	
010022	コントロールスタンダードエンドトキシン (E.coli O113)	1本	7,000	900482	サーモアルミバスALB-121 アルミブロック (¢12.0mmX45mm, 36穴)	1個	23,000	
010023	USP リファレンス スタンダードエンドトキシン	1本	52,000	900505	サーモアルミバスALB-121本体	1セット	98,000	
020055	エンドトキシン標準品 CSE-Lセット	1セット	10,000	900506	サーモアルミバスALB-121本体 (校正点検証明書付)	1セット	141,000	
■ジアゾカ	コップリング用試薬 (DIA)			900620	自動分注希釈システムトキシペットオート1000	1セット	9,800,000	
010045	パイロカラー ジアゾ試薬 DIA60-STV	1キット	24,000	900675	試験管ミキサーTM-251	1台	30,000	
010145	パイロカラー ジアゾ試薬 DIA150-MP	1キット	24,000	[測定器具]				
■その他隊	引連試薬			■消耗品				
010270	パイロソル pHインジケータ (5.5mL/vial)	5本	10,000	800798	乾熱滅菌試験管アルミキャップ付 (11.6x65mm)	100本	11,000	
010271	パイロソル pHインジケータなし (5.5mL/vial)	5本	10,000	800804	乾熱滅菌アルミ箔	1セット	1,500	
010272	パイロソル pHインジケータなし (55mL/vial)	1本	10,800	800807	乾熱滅菌アルミキャップ	100本	9,600	
010290	LRW (LAL試験用水)	10本	10,000	800810	パイロチューブアルミキャップ付 (パイロテル用)	50本	9,000	
010291	グルカシールド β-グルカン阻害緩衝液	1本	15,000	800817	バイアル瓶立 (26mm, 9本)	1個	3,500	
[その他関	連試薬]			800826	HDチューブ	50本	22,000	
■ β-グル	カン測定用試薬(研究用)			900520	トキシペット ディスペンサーシリンジ (3.0mL) (エンドトキシン,β-グルカンフリー)	50本	26,000	
010310	グルカテル	1セット	50,000	900540	トキシペット チップ 200	500本	27,000	
[測定用機	器]			900545	トキシペット チップ 1000	100本	16,000	
■エンドト	トキシン測定装置 測定用機器本体			900570	トキシペット プレート LP	50枚	31,000	
900625	ウェルリーダーMP-96	1セット	1,700,000	■器具				
900630	EGリーダー SV-12	1セット	980,000	900510	トキシペット ディスペンサー	1個	33,000	
■機器関連				900513	トキシペット サンプラー 10 (0.5-10μL)	1個	25,000	
900604	ウェルリーダーMP-96/SK603 ER/ES指針、Part11対応支援ソフト	1セット	1,200,000	900515	トキシペット サンプラー 100 (10-100μL)	1個	25,000	
900606	ウェルリーダーSK603/MP-96 ソフトパッケージVistaタイプ	1セット	11,000	900516	トキシペット サンプラー 200 (20-200 µL)	1個	25,000	
900607	EGリーダーSV-12ソフトパッケージVistaタイプ	1セット	11,000	900517	トキシペット サンプラー 1000 (100-1000 µL)	1個	25,000	
900636	SV-12光源ランプ	1個	12,000					