



SEIKAGAKU CORPORATION

日本薬局方における エンドトキシン試験法

標準操作法

- 光学的測定法〔カインティック比色法〕
- 光学的測定法〔エンドポイント比色法〕
- 光学的測定法〔カインティック比濁法〕
- ゲル化法



ENDOTOXIN

CONTENTS

はじめに	2
必要試薬および器具	2
I-1.光学的測定法	3
1.予備試験	3
2.定量	4
I-2.光学的方法(比色法)における予備試験および定量の標準操作法(検量線:実数および対数目盛り)	5
1.ウェルリーダーを用いたカインティック比色法標準操作法例(マイクロプレート)	5
2.EGリーダーSV-12を用いたカインティック比色法操作法例(バイアル)	8
3.エンドポイント比色法操作法例(マイクロプレート)	11
4.エンドポイント比色法標準操作法(バイアル)	12
I-3.光学的方法(比濁法)における予備試験および定量の標準操作法(検量線:実数および対数目盛り)	15
1.ウェルリーダーを用いたカインティック比濁法標準操作法例	15
II-1.ゲル化(ライセート試薬のゲル形成を指標とする)法	18
1.予備試験	18
2.限度試験法	19
3.定量試験法	20
II-2.ゲル化法における予備試験、限度試験法および定量試験法の標準操作法	22
1.標準操作法例	22
2.測定法例	24
III.ウェルリーダーの設定条件	26
1.カインティック比色法(反応速度法)	26
2.エンドポイント比色法	26
3.カインティック比濁法(反応時間法)	27
4.検量線(Select Curve)	27
IV.EGリーダーSV-12の設定条件	28
1.カインティック比色法(反応速度法)	28
製品一覧	29

INTRODUCTION

はじめに

第十四改正日本薬局方第二追補7. エンドトキシン試験法に記載された試験法は、カプ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。本法には、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变化を指標とする光学的測定法があります。

以下、これに準拠した当社製品を用いた標準操作法を示します。

必要試薬および器具

光学的変化を指標				ゲル形成を指標		
比色法				比濁法	ゲル化法	
カイネティック法		エンドポイント法		カイネティック法	マルチテスト	シングルテスト
マイクロプレート	バイアル	マイクロプレート	バイアル	マイクロプレート		
●エンドスペシー® ES-50Mセットまたはトキシカラー® LS-50Mセット	●エンドスペシー® ES-24Sセット	●エンドスペシー® ES-50Mセットまたはトキシカラー® LS-50Mセット ●トキシカラー® DIA-MPセット	●エンドスペシー® ES-24Sセット ●トキシカラー® DIAセット	●パイロテル®-Tまたはパイロタープ™-ES	●パイロテル® (感度:0.03,0.06,0.125EU/mL)	●パイロテル® (感度:0.03,0.125,0.25EU/mL)
<ul style="list-style-type: none"> ●日本薬局方エンドトキシン標準品 (JPRSE) (エンドトキシン100標準品またはエンドトキシン10,000標準品) ●エンドトキシン試験用水 						
器具 <ul style="list-style-type: none"> ●希釈用乾熱滅菌試験管 (アルミキャップ付き) ●乾熱滅菌アルミ箱 ●トキシベットサンブラー 100, 200または1000 ●トキシベットチップ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) ●トキシベットディスベンサー ●トキシベットディスベンサー用シリンジ (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 ●試験管立て ●氷-水浴槽 						
●比色計 (ウェルリーダー) ●トキシベットプレート (エンドトキシン、β-グルカンフリー:以下プレート)	●比色計 (EGリーダー-SV-12) ●乾熱滅菌アルミキャップ	●比色計 ●恒温槽 ●トキシベットプレート (エンドトキシン、β-グルカンフリー:以下プレート)	●比色計 ●恒温槽 ●乾熱滅菌アルミキャップ	●比色計 (ウェルリーダー) ●トキシベットプレート (エンドトキシン、β-グルカンフリー:以下プレート)	●恒温槽 (ホットプレート CT-961等) ●反応用乾熱滅菌試験管 (アルミキャップ付き)	●恒温槽 (ホットプレート CT-961等) ●乾熱滅菌アルミキャップ

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下さい。
- バイアルの開栓後は、乾熱滅菌アルミ箱をご使用下さい。
- ゴム栓の再利用はしないで下さい。
- 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下さい。

I 1 光学的測定法

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法概要(予備試験および定量)

第十四改正日本薬局方第二追補におけるライセート試薬によ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に、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。

1. 予備試験

(i) 検量線の信頼性確認試験: ライセート試薬の各ロットごとに、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。

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、これらの各濃度の溶液につき、3回以上測定して検量線を作成します。

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します。

(ii) 反応干渉因子試験(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。)

まず、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。

$$\text{最大有効希釈倍数} = \frac{\text{エンドトキシン規格値} \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

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。

次に、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	エンドトキシン添加濃度	被添加液	試験管またはウェルの数
A	0	試料溶液 ^{※1}	2以上
B	検量線の midpoint 濃度 ^{※2}	試料溶液 ^{※1}	2以上
C	3濃度以上 ^{※3}	エンドトキシン試験用水	各濃度、2以上
D	0	エンドトキシン試験用水	2以上

※1 最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈した試料溶液を用いてもよい。

※2 検量線の midpoint または midpoint 付近のエンドトキシン濃度になるように、エンドトキシン標準溶液を添加する。

※3 予備試験(i)検量線の信頼性確認試験で用いた濃度。

反応干渉因子試験は次の条件に適合しないとき、無効です。

i) C液で作成した検量線の相関係数の絶対値は0.980以上であること。

ii) 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、またはエンドトキシンの検出限界未満であること。

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。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断します。

2. 定量

(i) 操作法

表1に示すA、B、CおよびD液を調製し、1. 予備試験(ii)反応干渉因子試験を準用して操作します。

(ii) 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液のエンドトキシン濃度を算出します。

ただし、次のすべての条件に適合しないとき、試験は無効です。

i) C液で作成した検量線の相関係数の絶対値は0.980以上であること。

ii) 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%の範囲であること。

iii) 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、またはエンドトキシンの検出限界未満であること。

(iii) 判定

A液の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します。

