

Limulus Color KY Test *Wako*

Package Insert

[Summary and History]

Lipopolysaccharide (LPS) also known as endotoxin, is a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Since endotoxin causes serious symptoms such as fever and shock in the human body, the testing of bacterial endotoxins in pharmaceuticals (especially parenteral drugs) is important.

In 1956, F. B. Bang reported clotting of the horseshoe crab blood due to Gram negative bacteria¹⁾. In 1964, J. Levin and F. B. Bang discovered that clotting of Limulus Amebocyte Lysate (LAL) is caused by endotoxin²⁾. Subsequently, bacterial endotoxin detection using the lysate is widely used as a sensitive and convenient method. This method, known as the Bacterial Endotoxin Test (BET) was listed in the United States Pharmacopoeia in 1980 and in the Japanese Pharmacopoeia in 1988^{3),4)}. Currently, there are gel-clot, turbidimetric and chromogenic techniques as methods of the bacterial endotoxin test. A bacterial endotoxin test is to be performed by one of these techniques⁴⁾.

Kakinuma *et al.* reported that the lysate reacts not only to endotoxin but also to (1→3)- β -D-glucan (β -glucan)⁵⁾. Iwanaga *et al.* reported that the cascade system in the lysate activated by β -glucan was different from the one activated by endotoxin^{6),7)}. It was also described that an LAL-reactive material coeluted from cellulose membranes⁸⁾. A false positive such as from β -glucan or any substance other than endotoxin can present an issue when testing.

This kit contains Limulus Color KY Test vials and a Control Standard Endotoxin (CSE) which can specifically, and rapidly detect and quantify endotoxin with high sensitivity. The Limulus Color KY Test is a lyophilized lysate including a synthetic chromogenic substrate and buffer constituents. This lysate is dissolved by water for BET before testing with the assay. The Limulus Color KY Test is suitable for kinetic analysis by using the Toxinometer[®] Measurement System (Toxinometer[®]) or Microplate reader.

The CSE is lyophilized LPS which has been extracted and purified from *E. coli* UKT-B by the phenol method^{9),10)}, including mannitol and glycine as additives. The CSE contains 500 ng of endotoxin and is evaluated in comparison to the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard Endotoxin. The potency is determined and printed on the label as a reference.

[Features]

1. The lysate and chromogenic synthetic substrate are formulated together to form the Limulus Color KY Test reagent.
2. When dissolved with water for BET, the reagent can specifically detect endotoxin with high sensitivity without being affected by β -glucan in the sample.

3. The reagent is stable after being dissolved, and does not react with water for BET.
4. The reagent reacts with endotoxin in a wide range of concentrations, some samples may not need to be diluted.
5. Due to its high sensitivity, sample dilution can reduce the chance of interfering factors in the sample.
6. The Toxinometer[®] and Microplate reader are capable of quantifying endotoxins with the kinetic-chromogenic technique.

[Principle]

The mechanism of this chromogenic reagent in the presence of endotoxin is summarized in Figure 1. The serine protease precursors contained in the lysate are sequentially activated, the clotting enzyme then hydrolyzes the chromogenic synthetic substrate. As a result, it produces a yellow coloration. β -glucan also activates β -glucan dependent clotting cascade, however, activation by β -glucan is dependent on the concentration of β -glucan within the sample. In the presence of very high concentration of β -glucan, the lysate will not be activated. The Limulus Color KY Test contains a large amount of β -glucan to prevent the activation. This formulation allows β -glucan to be completely inhibited and endotoxin can be assayed specifically⁽¹⁾.

The Limulus Color KY Test is measured using a Toxinometer[®] or Microplate reader to show the activation of product due to color generation when there is a decrease in the transmitted light quantity ratio or increase in absorbance. In addition, both instrumentations measure the activation time (Ta), which is the reaction time to reach the preset threshold value. As a result, the endotoxin concentration of the sample is calculated from the relationship between the Ta and endotoxin concentration generated from the standard curve.

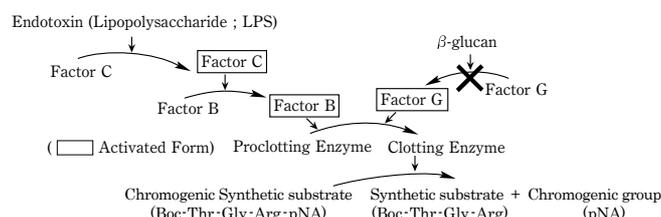


Figure 1 : The Color Development Cascade Mechanism of Limulus Color KY Test

The X represents that the activation of β -glucan is prevented due to the large amount of β -glucan derivative in the reagent.

[Kit Contents]

1. Limulus Color KY Test, lyophilized extract of *Limulus polyphemus* amebocytes containing synthetic chromogenic substrate, buffer constituents and (1→3)- β -D-glucan derivatives. 3 vials × 2 mL - 60tests
Storage : Store at 2 to 10°C. Use the reconstituted Limulus Color KY solution within 6 hours. The reconstituted solution can be stored below -80°C for up to 2 weeks, if necessary. The frozen solution can only be thawed once.
2. Control Standard Endotoxin (CSE), lyophilized.....1 vial (500 ng purified LPS) Contains LPS, purified from *E. coli* UKT-B including mannitol and glycine as additives.
Storage : Store at 2 to 10°C. The reconstituted CSE solution can be stored at 2-10°C for 1 month. Stored CSE solution must be agitated vigorously with a vortex mixer for 1 minute before use.

I. Materials and Equipment not provided

1. Pipettes
2. Test tubes* for dilution of standard solutions
3. Vortex mixer
4. Water for BET*
5. Micropipette tips* (Bio Clean Tip Wako[®] Extend S II Code : 294-35011, Bio Clean Tip Wako[®] 1000 II Code : 298-35031, Bio Clean Tip Wako[®] 200 II Code : 291-35021)

Toxinometer[®] Measurement System (additional items)

- Toxinometer[®]
- Limulus Test Tube-S* with Aluminum Cap (Code : 292-32751)

Microplate Reader (additional items)

- Microplate Reader
- 96-well microplates* (Bio Clean Plate Wako[™] Code : 293-35221)

* : The materials should be endotoxin-free.

When using plastic products such as 96 well microplates and micropipette tips, ensure these materials are endotoxin-free and will have no effect on measurement. Endotoxin-free glassware and aluminum caps can be prepared by dry-heating at 250°C for more than 30 minutes.

II. Preparation of Reagents

1. Preparation of Limulus Color KY Test Solution

- 1) Collect the lyophilized product into the bottom of the vial by tapping on a firm surface. Small amounts of the product on the rubber stopper will not affect testing.
- 2) Remove the aluminum cap from the vial.
- 3) Use tweezers to slowly pull up the rubber stopper.
Note : The inside of the vial forms a vacuum, therefore avoid dispersion of the product. Do not touch the inside of the vial or the inside part of the rubber stopper when pulling up the rubber stopper.
- 4) Place the removed rubber stopper upside down on a bench. Do not let the inside portion of the rubber stopper touch any surfaces.
- 5) Dispense 2.0 mL of water for BET into the vial. Do not allow the rim of the vial to become wet.
- 6) Return the rubber stopper on to the vial. Do not let the solution touch the rubber stopper.
- 7) Gently swirl the vial to dissolve the lyophilized product completely. Be careful not to make bubbles in the solution or agitate the vial vigorously.

2. Preparation of Control Standard Endotoxin (CSE) Solution

- 1) Remove the aluminum cap from the vial.
- 2) Pull up the rubber stopper with tweezers and remove the stopper from the vial.
- 3) Add the appropriate volume of water for BET based on the EU value** (EU/vial) printed on the label for Toxinometer[®] to make 1000 EU/mL solution.
- 4) Return the rubber stopper on to the vial.
- 5) Agitate the vial vigorously with a Vortex mixer for approximately 2 minutes to dissolve the lyophilized product.

** : Please request for EU value (EU/vial) of CSE for Microplate reader before use.

3. Preparation of dilution standards
 - 1) Use the CSE solution from the “Preparation of Control Standard Endotoxin (CSE) Solution” to prepare dilution standards.
 - 2) Prepare a dilution series, ensure that one dilution does not exceed more than 10-fold.
 - 3) Each standard solution should be mixed with a vortex mixer for more than 30 seconds before proceeding to the next dilution in the series.
 - 4) The dilution standard solutions should be assayed after preparation.
4. Dilution of samples

Samples often need to be diluted. A diluted sample should be agitated with a vortex mixer for more than 30 seconds before being used in the procedure.
5. pH adjustment of samples

If the pH of a mixture of the sample + Limulus Color KY Test solution is out of the range (between 6.0 and 8.0), adjust the pH range of the sample solution to the appropriate range. This can be achieved with a diluted sodium hydroxide or diluted hydrochloric acid solution.

Note : For use with the Toxinometer[®], approximately one vial corresponds to 20 tests. For use with a microplate reader, approximately 40 tests per vial can be prepared.

III-A Determination using Toxinometer[®] Measurement System^{13),14),15),16)}

1. Preparation of Reagents

Prepare Reagents as stated in the “Preparation of Reagents” section.
2. Toxinometer[®] Parameters

Set the Toxinometer[®] parameters as shown :

| | |
|----------------------|--------------|
| Target temperature | : 37°C |
| Threshold value (Th) | : 94.9% |
| Count | : 3 |
| Wait time | : 5 minutes |
| Measurement Time* | : 60 minutes |

* Please note that the higher the sensitivity, the more time may be required for the endotoxin to be measured by the Toxinometer[®].
3. Assay procedure
 - 1) Place the appropriate number of Limulus Test Tube-S in the test tube rack. Be careful not to touch the rim of each tube.
 - 2) Gently swirl the reconstituted Limulus Color KY Test solution to confirm its uniformity.
 - 3) Dispense 0.1 mL of the Limulus Color KY Test solution into each Limulus Test Tube-S.
 - 4) Pipette 0.1 mL of water for BET (negative control), standard solutions, and/or samples into each of the corresponding tubes.
 - 5) Place each tube into the Toxinometer[®] to be measured by the Toxinometer[®] software.

4. Standard curve and Data analysis

The endotoxin concentration of the sample is based on the sample's activation time using the generated standard curve. A standard curve will be generated by taking the logarithm of the endotoxin concentration on the x axis and the logarithm (log-log) or twice the logarithm (log-loglog) of the activation time on the y axis. Linear or quadratic regression can be used for regression calculation. If the range of the standard curve is wide, improvement of the standard curve fitting can be expected by using twice the logarithm of activation time or quadratic regression.

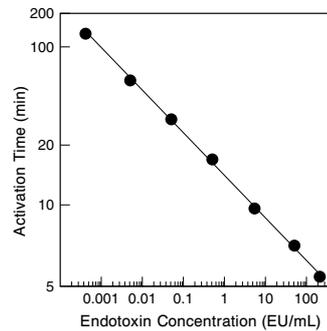


Figure2 : An example of standard curve measured with Limulus Color KY Test using the Toxinometer[®]. This figure shows that a high correlation standard curve can be obtained over a wide concentration range.

III-B Determination using microplate reader

1. Preparation of Reagents

Prepare reagents as stated in the "Preparation of Reagents" section.

Note : Each lot of Control Standard Endotoxin is tested by Toxinometer[®] and Microplate reader but, the printed EU value (EU/vial) on the label is determined by the Toxinometer[®]. Please request the EU value (EU/vial) for Microplate reader before use.

2. Microplate Reader Parameters

Set the microplate reader parameters as shown :

Temperature : 37°C
Assay mode : Kinetic
Onset OD : 0.015
Auto mix : Once
Wavelength : 405 nm (main) and 650 nm (reference)

3. Assay procedure

- 1) Dispense 0.05 mL each of water for BET (negative control), standard solutions, and/or samples into the corresponding wells of a microplate.
- 2) Gently swirl the reconstituted Limulus Color KY Test solution to confirm its uniformity.
Pipette 0.05 mL of the Limulus Color KY Test solution into each well of the microplate.
- 3) Gently agitate to confirm homogeneity and add the plate to the microplate reader to be measured.

4. Standard curve and Data analysis

The endotoxin concentration of the sample is based on the sample's activation time using the generated standard curve. A standard curve will be generated by taking the logarithm of the endotoxin concentration on the x axis and the logarithm (log-log) or twice the logarithm (log-loglog) of the activation time on the y axis. Linear or quadratic regression can be used for regression calculation. If the range of the standard curve is wide, improvement of the standard curve fitting can be expected by using twice the logarithm of activation time or quadratic regression.

[Warnings and General Precautions]

- Do not use this reagent for any purposes other than BET.
- This product is for research use only, not for diagnostic use.
- Exercise caution when handling the reagent, because toxicity of LAL is unknown.
- Even a trace amount of the Limulus Color KY Test reagent, which contains a large amount of β -glucan derivative, may activate regular LAL reagent. Be careful not to contaminate regular LAL with the Limulus Color KY Test reagent.
- Be careful not to cause endotoxin contamination and always use aseptic techniques.
- Discard product if the color has changed to yellow or any insoluble matter is found after dissolution.
- Do not use reagents past their expiration dates.

[References]

1. Bang, F.B. *Bull Johns Hopkins Hosp.* **98**, 325-351 (1956).
2. Levin, J. and Bang, F. B. *Bull Johns Hopkins Hosp.* **115**, 265-274 (1964).
3. *The United States Pharmacopeia 41st, the National Formulary 36*, 6011, U.S. Pharmacopeial Convention Inc. (2018).
4. *The Japanese Pharmacopoeia, Seventeenth Edition Handbook*, B-473-B-492 (2016).
5. Kakinuma, J., Asano, T., Torii, H., and Sugino, Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434-439 (1981).
6. Nakamura T, Morita T, Hiranaga M, Miyata T, Iwanaga S. : *Nihon Saikingaku Zasshi*, **38**, 781-803 (1983).
7. Iwanaga, S., Morita, T., Miyata, T., Nakamura, T., Hiranaga, M. and Ohtsubo, S. : *Bacterial Endotoxin: Chemical, Biological and Clinical Aspects*, edited by Homma, J. Y., Kanegasaki, S., Luderitz, O., Shiba, T. and Westphal, O., 365-382, Verlag Chemie (1984).
8. Peason, F. C., Weary, M. and Bohon, J. : *Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test*, edited by Watson, S. W., Levin, J. and Novitsky, T. J., 247-260, Alan R. Liss, Inc. (1982).
9. Westphal, O., Luderiz, O., Eichenberger, E. and Keiderling, W. : *Z. Naturforsch.*, **7b**, 536-548 (1952).
10. Akama, K., Kuratsuka, K. and Homma, R. Kanoh, S., Niwa, M., Iwanaga, S. and Nakahara, C. : *Bacterial Endotoxin: Chemical, Biological and Clinical Aspects*, edited by Homma, J. Y., Kanegasaki, S., Luderitz, O., Shiba, T. and Westphal, O., 395-407, Verlag Chemie (1984).

11. Tsuchiya M, Takaoka A, Tokioka N, Matsuura S. *Nihon Saikingu Zasshi*. **45**, 903-911 (1990).
12. Oishi, H., Hatayama, Y., Shiraishi, H., Yanagisawa, K., Sakata, Y. : *Yakugakuzasshi*, **105**, 300 (1985).
13. Oishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39**, 194-199 (1985).
14. Oishi, H., Fusamoto, M., Hatayama, Y., Tsuchiya, M., Takaoka, A. and Sakata, Y. : *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3012-3019 (1988).
15. Oishi, H., Wada S., Shiraishi H., Koshindo T., Tsujino R. : The 116th Annual Meeting the Pharmaceutical Society of Japan, 100, (1996).

[Storage] 2~10℃

[Expiration date] Indicated on the label

[Package] 60 tests

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://fwk.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

Code 291-53101 (60 回用)

エンドトキシン検出用

Limulus Color KY Test Wako

リムルスカラー KY テストワコー

使用説明書

〔はじめに〕

エンドトキシン (内毒素) は、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖 (LPS) であり、代表的な発熱性物質 (パイロジェン) です。エンドトキシンにより汚染された血液、輸液、注射薬が体内に入ると発熱やショックなどの重篤な副作用をひき起すため、これらの医薬品のエンドトキシンによる汚染はきびしく検査する必要があります。

1956年、F. B. Bang が、グラム陰性菌によるカプトガニ体液の凝固を報告し¹⁾、さらに、1964年、J. Levin と F. B. Bang が、Limulus Amebocyte Lysate (LAL) の凝固がエンドトキシンによってひき起こされることを発見して以来²⁾、ライセート試薬を用いたエンドトキシン検出法は、鋭敏で簡便な方法として広く用いられています。リムルステストとして知られるこの方法は、1980年、米国薬局方に収載され、1988年には、日本薬局方にも収載されました^{3),4)}。現在、エンドトキシン検出法には、ゲル化法、比濁法および比色法 (発色合成基質法) があり、エンドトキシン試験はこれらのいずれかで行うように規定されています。

Kakinuma らは、ライセート試薬が (1→3)- β -D-グルカン (β -グルカン) にも反応することを報告し⁵⁾、さらに Iwanaga らは、ライセート試薬中にはエンドトキシン以外に β -グルカンで活性化が起る系があることを明らかにしました^{6),7)}。また、セルロース系の膜よりライセート試薬に反応する物質が溶出することも報告され⁸⁾、ライセート試薬のエンドトキシンに対する特異性が問題となっています。

本キットは、リムルスカラーKY試薬と Control Standard Endotoxin (CSE) からなり、高い感度で迅速にエンドトキシンの特異的な検出を行うことができます。リムルスカラーKY試薬は、発色合成基質および緩衝液成分を含むライセート試薬の凍結乾燥品であり、エンドトキシン試験用水で溶解して使用します。また、本試薬は、トキシノメーター[®]ならびにマイクロプレートリーダーを用いた比色法に適しています。CSEは、*E. coli* UKT-B株からフェノール法^{9),10)}によって抽出、精製したリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 500 ngに、添加剤としてマンニトールおよびグリシンを加えて凍結乾燥したもので、参考値として日本薬局方で定められたエンドトキシン標準品を用いて検定した力価が表示されています。

〔特長〕

1. ライセート試薬と発色合成基質が一体製剤されており、試薬溶解後、試料と混合するだけで反応を開始させることができます。

2. 検体中のβ-グルカンの影響を受けることなく、高感度でエンドトキシンの特異的検出ができます。
3. 溶解後の試薬の安定性にすぐれ、ブランクの反応性が低く抑えられています。
4. 検量範囲が広く、ほとんどの場合、試料を希釈する必要がありません。
5. 高感度のため、試料中の反応阻害・促進物質の影響を希釈により低減できます。
6. トキシノメーター®（青色光源タイプ）あるいはマイクロプレートリーダーを用いた比色法による定量専用試薬です。

〔原 理〕

エンドトキシンによる本試薬の発色機構は図1のように考えられています。すなわち、ライセート試薬中に含まれるセリンプロテアーゼが順次活性化され、最後に凝固酵素が黄色発色合成基質を水解し、発色基（pNA）が遊離して、黄色の発色が生じるというものです（図1）。一方、β-グルカンもライセート試薬の活性化を引き起こしますが、濃度依存性があり、高濃度では逆にライセート試薬の活性化を阻害し、かつ、エンドトキシンによるライセート試薬の活性化には影響を与えません。本試薬は、反応系にβ-グルカン誘導体を高濃度共存させることにより、エンドトキシンを特異的に測定することができます¹⁾。

トキシノメーター®（青色光源タイプ）ならびにマイクロプレートリーダーを用いた比色法では、活性化に伴って生じた色素による透過光量比の減少、あるいは吸光度の増大を測定し、これらがあらかじめ設定したしきい値に達するまでの反応時間を活性化時間（Ta）として、Taとエンドトキシン濃度との関係からエンドトキシン濃度を算出します。

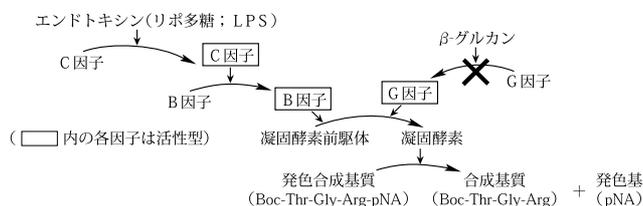


図1. リムルスカラー-KY試薬の発色カスケード機構

×は試薬中の高濃度のβ-グルカン誘導体によりβ-グルカンによる活性化を妨げていることを示しています。

〔キット内容〕

1. リムルスカラー-KY試薬, 米国産カプトガニ (*Limulus Polyphemus*) 血球抽出物の凍結乾燥品 (発色合成基質, トリス塩酸緩衝液および(1→3)-β-D-グルカン誘導体を含む)
 …… 2 mL用 (20回用*) × 3バイアル
 * トキシノメーター®で約20回, マイクロプレートリーダーで約40回測定できます。

* 2~10℃保存 *

注) 溶解したリムルスカラー-KY試薬は氷令で6時間以内に使用してください。保存する場合は-80℃以下で凍結し2週間以内に使用してください。凍結融解を繰り返すと感度が変わることがあります。凍結融解は1回にとどめて下さい。

2. コントロールスタンダードエンドトキシン, 凍結乾燥品

……… 1 バイアル (精製LPSとして500 ng)

E. coli UKT-Bの菌体から精製したエンドトキシンです. 添加剤としてマンニトール, グリシンを含みます. * 2~10℃保存 *

注) 溶解したコントロールスタンダードエンドトキシンは2~10℃保存して1ヶ月以内に使用してください. 保存したものを使用时は1分以上ボルテックスミキサーで攪拌してください.

〔使用方法〕

I. 使用器具及び用意するもの

1. ピペット
2. 希釈用試験管 (アルミキャップ付き推奨)
3. ボルテックスミキサー (バイアルチューブミキサー VTM-252II Code : 295-35421等)
4. エンドトキシン試験用水 (通常は日本薬局方注射用水が使用できます.)
5. チップ (バイオクリーンチップワコーエクステンド SII Code : 294-35011, バイオクリーンチップ 1000II Code : 298-35031, バイオクリーンチップワコー 200II Code : 291-35021等)

トキシノメーター[®] 測定システム

- ・トキシノメーター[®]
- ・リムルテストチューブ S (アルミキャップ付) Code : 292-32751

マイクロプレートリーダー測定システム

- ・マイクロプレートリーダー (恒温機能付)
- ・96ウェルマイクロプレート (バイオクリーンプレートワコー Code : 293-35221)

注) 以下の操作には試験管, ピペットなどの器具は250℃で30分以上乾熱滅菌したものを, 水はエンドトキシン試験用水を用いて下さい. 96ウェルマイクロプレートやマイクロピペ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の汚染及び測定に対する干渉のないことを確認して下さい.

II. 試薬の調製

1. リムルスカラーKY試薬の溶解

- 1) 台上でバイアルの底を数回軽く叩きゴム栓に付着しているライセート試薬の粉末をバイアルの底に落とします. 少量のライセート試薬がゴム栓等に付着している程度では試験の結果に影響はありません.
- 2) リムルスカラーKY試薬のバイアルからアルミキャップをはずします. バイアルからゴム栓をゆっくり開栓します.

- 3) バイアルの口の内側に触れないように注意してゴム栓を持ち上げます。バイアルの内部は真空になっているので、粉末が舞い上がらないようにゆっくりと開けてください。乾熱滅菌したスパテラ、ピンセット、ピペットの先端などを使用してゴム栓を持ち上げる方法をおすすめします。
 - 4) はずしたゴム栓は汚染しないように足を上に向けて置きます。
 - 5) エンドトキシン試験用水 2 mL をピペットでバイアルの口を濡らさないようにゆっくりと加えます。
 - 6) ゴム栓に内容液がつかないようにバイアルにゴム栓をします。
 - 7) ゴム栓に内容液がつかないように注意してゆっくりと振り混ぜ完全に溶かします。溶解したリムスカラー-KY 試薬は、泡立ったり、激しく攪拌したりしないでください。
2. コントロールスタンダードエンドトキシン (CSE) の溶解
 - 1) バイアルからアルミキャップを取り外します。
 - 2) バイアルからCSEのゴム栓をゆっくりとはずします。バイアルの内容物は 500 ng のCSEです。
 - 3) CSEの表示含量を参照して終濃度が 1000 EU/mL となるように加えるエンドトキシン試験用水量を決めます。終濃度が 1000 EU/mL となるようにエンドトキシン試験用水をバイアルに加えます。日本薬局方で定められたエンドトキシン標準品を用いて検定した表示含量* (EU/vial) がバイアルのラベルに印刷されています (トキシノメーター[®] 用)。
 - 4) ゴム栓をし、CSEを溶解させます。
 - 5) ボルテックスミキサーで約 2 分間激しく攪拌してください。

* : マイクロプレートリーダーで使用される場合のCSEの表示含量 (EU/vial) は弊社にお問い合わせください。
 3. コントロールスタンダードエンドトキシン (CSE) の希釈系列の調製
 - 1) CSEをエンドトキシン試験用水で希釈します。
 - 2) 1 段階の希釈で10倍をこえる希釈はしないでください。
 - 3) 各希釈溶液は次の希釈操作を行う前に 30 秒以上ボルテックスミキサーで攪拌します。
 - 4) 希釈したエンドトキシン及び試料溶液はできるだけ速やかに使用してください。
 4. 試料の希釈
試料を必要に応じて希釈します。希釈試料溶液は次の希釈操作を行う前に 30 秒以上ボルテックスミキサーで攪拌します。
 5. 試料のpH調整
試料溶液とリムスカラー-KY 試薬を等量混合したもののpHが6.0から8.0の範囲からはずれている場合には、試料溶液のpHを適当な濃度の水酸化ナトリウムまたは塩酸溶液で6.0から8.0になるように調整してください。

測定方法に応じて、「Ⅲ-A. トキシノメーター[®]で測定する場合」または「Ⅲ-B. マイクロプレートリーダーで測定する場合」をご参照下さい。

Ⅲ-A. トキシノメーター[®] (12), (13), (14), (15) で測定する場合

1. 試薬の調製

試薬の調製の項目の記載に従って試薬の調製を行います。

2. トキシノメーター[®]の推奨測定条件

| | |
|---------|--------------------------------|
| 測定温度 | 37℃ |
| しきい値 | 94.9% |
| カウント | 3 |
| ウェイトタイム | 5分 |
| 測定時間 | 60分 (測定するエンドトキシン濃度で任意に変更できます。) |

3. 測定手順

- 1) 反応用試験管を試験管の口に触れないように取り出します。反応用試験管をラックに立ててすみやかにアルミキャップをかぶせます。
- 2) リムスカラー-KY試薬を再度ゆるやかに攪拌して均一であることを確認します。
- 3) 反応用試験管に0.1 mLずつリムスカラー-KY試薬を分注します。
- 4) リムスカラー-KY試薬を分注した反応用試験管にエンドトキシン試験用水 (陰性対照), エンドトキシンの希釈系列, 試料を0.1 mLずつ加え, 泡立たないように直ちに攪拌します。
- 5) 試験チューブをトキシノメーター[®]に挿入し, 測定します。

4. 検量線とデータ解析

標準エンドトキシンから得られた活性化時間を用いて検量線を作成し、試料の活性化時間と検量線から試料のエンドトキシン濃度を算出します。

検量線のx軸にはエンドトキシン濃度の対数を、y軸には活性化時間の対数あるいは二回対数が使用できます。回帰計算には一次式回帰あるいは二次式回帰が使用できます。検量線範囲が広い場合は活性化時間の二回対数や二次式回帰を用いることで検量線のフィッティングの向上が期待できます。

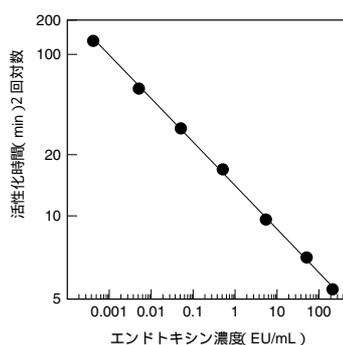


図2. 本品とトキシノメーター[®] (青色光源タイプ) を用いたエンドトキシンの分析例
広い濃度範囲で高い相関の検量線が得られています。

III-B. マイクロプレートリーダーで測定する場合

1. 試薬の調製

試薬の調製の項目の記載に従って試薬の調製を行います。

2. マイクロプレートリーダーの推奨測定条件

温度 : 37℃

測定モード: カイネティック

Onset OD : 0.015

Auto mix : Once

波長 : 405 nm (主波長) -650 nm (副波長)

3. 測定手順

- 1) エンドトキシンの希釈系列, エンドトキシン試験用水および試料をそれぞれ 0.05 mL ずつマイクロプレートの各ウェルに加えます。
- 2) リムスカラー-KY 試薬を, 再度ゆるやかに攪拌して均一であることを確認します。リムスカラー-KY 試薬を 0.05 mL ずつマイクロプレートの各ウェルに加えます。これらのウェルを穏やかに攪拌した後, 均一性を確認します。
- 3) マイクロプレートをマイクロプレートリーダーに入れ測定します。

4. 検量線とデータ解析

標準エンドトキシンから得られた活性化時間を用いて検量線を作成し、試料の活性化時間と検量線から試料のエンドトキシン濃度を算出します。

検量線の x 軸にはエンドトキシン濃度の対数を、y 軸には活性化時間の対数あるいは二回対数が使用できます。回帰計算には一次式回帰あるいは二次式回帰が使用できます。検量線範囲が広い場合は活性化時間の二回対数や二次式回帰を用いることで検量線のフィッティングの向上が期待できます。

詳細は“エンドトキシン試験法標準操作法”をご参照下さい。

〔ご使用上の注意〕

1. 本品はエンドトキシン試験以外の目的には使用しないで下さい。
2. 本品の毒性については確認されておりませんので吸いこんだりしないよう取扱には十分ご注意下さい。
3. リムスカラー-KY 試薬中に含まれる β -グルカン誘導体は、低濃度ではエンドトキシン特異的でないライセート試薬を強くゲル化しますので、これらへの試薬の混入には十分ご注意下さい。
4. 本品はエンドトキシンに対して極めて鋭敏に反応しますのでピペットその他の器具、エンドトキシン試験用水などによるエンドトキシン汚染には十分ご注意下さい。
5. 変色したり溶解した時に多量の不溶物が生じたものは変質していますので使用しないで下さい。

〔参考文献〕

1. Bang, F.B. *Bull Johns Hopkins Hosp.* **98**, 325-351 (1956).
2. Levin, J. and Bang, F.B. *Bull Johns Hopkins Hosp.* **115**, 265-274 (1964).
3. *The United States Pharmacopeia 41st, the National Formulary 36*, 6011, U.S. Pharmacopeial Convention Inc. (2018).
4. 第十七改正日本薬局方・解説書, B-473-B-492 (2016).
5. Kakinuma, J., Asano, T., Torii, H., and Sugino, Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434-439 (1981).
6. 中村隆範, 森田隆司, 平永万寿代, 宮田敏行, 岩永貞昭 : 日本細菌学雑誌, **38**, 781-803 (1983).
7. Iwanaga, S., Morita, T., Miyata, T., Nakamura, T., Hiranaga, M. and Ohtsubo, S. : *Bacterial Endotoxin : Chemical, Biological and Clinical Aspects*, edited by Homma, J. Y., Kanegasaki, S., Luderitz, O., Shiba, T. and Westphal, O., 365-382, Verlag Chemie (1984).
8. Peason, F. C., Weary, M. and Bohon, J. : *Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test*, edited by Watson, S. W., Levin, J. and Novitsky, T. J., 247-260, Alan R. Liss, Inc. (1982).
9. Westphal, O., Luderiz, O., Eichenberger, E. and Keiderling, W. : *Z. Naturforsch.*, **7b**, 536-548 (1952).
10. Akama, K., Kuratsuka, K. and Homma, R. Kanoh, S., Niwa, M., Iwanaga, S. and Nakahara, C. : *Bacterial Endotoxin: Chemical, Biological and Clinical Aspects*, edited by Homma, J. Y., Kanegasaki, S., Luderitz, O., Shiba, T. and Westphal, O., 395-407, Verlag Chemie (1984).
11. 土谷正和, 高岡 文, 時岡伸之, 松浦脩治 : 日本細菌学雑誌, **45**, 903-911 (1990).
12. 大石晴樹, 畑山泰道, 白石浩己, 柳沢和也, 佐方由嗣, 薬学雑誌, **105**, 300 (1985).
13. Oishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39**, 194-199 (1985).
14. Oishi, H., Fusamoto, M., Hatayama, Y., Tsuchiya, M., Takaoka, A. and Sakata, Y. : *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3012-3019 (1988).
15. 大石晴樹, 和田正悟, 白石浩己, 小新堂 透, 辻野隆三 : 日本薬学会第116年会, 100, (1996).

〔貯 法〕 2～10℃保存

〔使用期限〕 ラベルに記載

〔包 装〕 60回用

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

1906KA3