

2 反応干渉因子試験

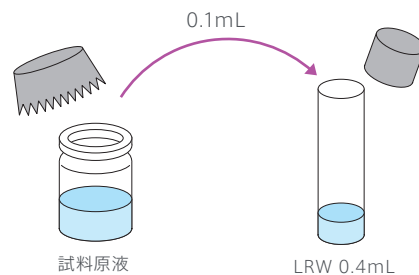
2-1 エンドトキシン標準溶液の調製

- (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 3 濃度 (1, 0.1, 0.01 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。

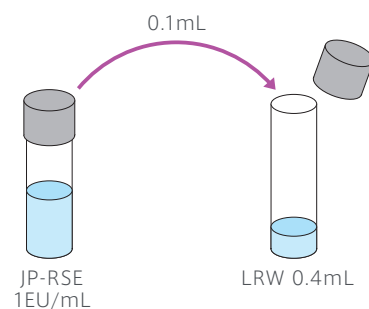
- (1) エンドスピーシーES-50Mセットを用いたカイネティック比色法（反応速度法）：2-2 2倍濃度試料溶液の調製（別冊参照）に従い、2倍濃度試料溶液を調製する。



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 (0.2EU/mL) 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1EU/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 ライセート試液の調製

- (1) 1 検量線の信頼性確認試験：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) LRW (D液) および2-1で調製したエンドトキシン標準溶液 3濃度 (C液: 1, 0.1, 0.01 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LRWを0.05mLずつ分注する。
- (3) B液: 所定のウェル (Tr1) に 2-3 で調製した0.2 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。
- (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: Pyrotest-T User ID: skka

Step 1: 製剤選択 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: XXXX-JK-XXXX-T
LAL 試薬: Pyrotest-T
溶媒: Glucashield Buffer
標準品: JP-BSE
測定パラメーター: 測定番号 684 測定機器番号 EPOCH2 測定者 ID skka
ミキシング時間 60 sec ミキシング強度 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 測定濃度単位: 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
スタイス上部 [%]: 0

製剤情報
製剤名: Pyrotest-T
標準濃度: 濃度 [EU/mL]
STD1 0.01
STD2 0.1
STD3 1

Blk: LRW (D液)
St1~St3: 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。

2-6 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、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」)。