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（反応速度法）（マイクロプレート法）

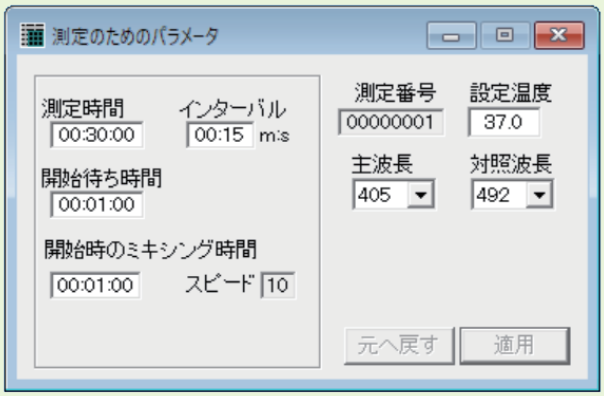
エンドトキシン標準溶液4倍段階希釈 3濃度（0.1, 0.025, 0.00625 EU/mL）および試料溶液（10倍希釈液）を用いる標準操作法を示します。
ライセート試液と試料溶液の混液のpHが6～8であることを確認してください。

■ 必要な試薬および器具

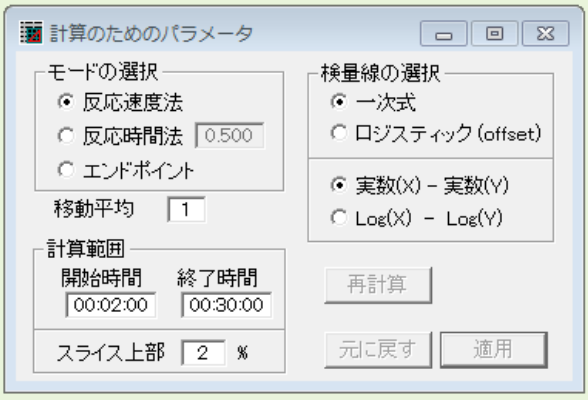
試　薬	・ライセート試薬：エンドスペシー ES-50Mセット（以下、ES-50Mセット） ・標準品：日本薬局方エンドトキシン標準品（以下、JP-RSE） ・LAL試験用水（以下、LRW）
器　具	・トキシペットサンプラー200、トキシペットサンプラー1000 ・トキシペットチップ200、トキシペットチップ1000 ・トキシペットディスペンサー用シリンジまたは同等品（以下、シリンジ） ・トキシペットプレートLP（以下、プレート） ・乾熱滅菌試験管（11.6×65mm、アルミキャップ付、以下、試験管） ・乾熱滅菌したアルミ箔等（以下、アルミ箔） ・試験管ミキサー ・プレートミキサー
測定機器	・ウェルリーダーアドバンス
ソフトウェア	・Software for Wellreader, DIエディション

■ ウェルリーダーアドバンスを用いたカイネティック比色法（反応速度法）：設定条件

1. 測定のためのパラメータ



2. 計算のためのパラメータ



■ 予備試験

1 検量線の信頼性確認試験

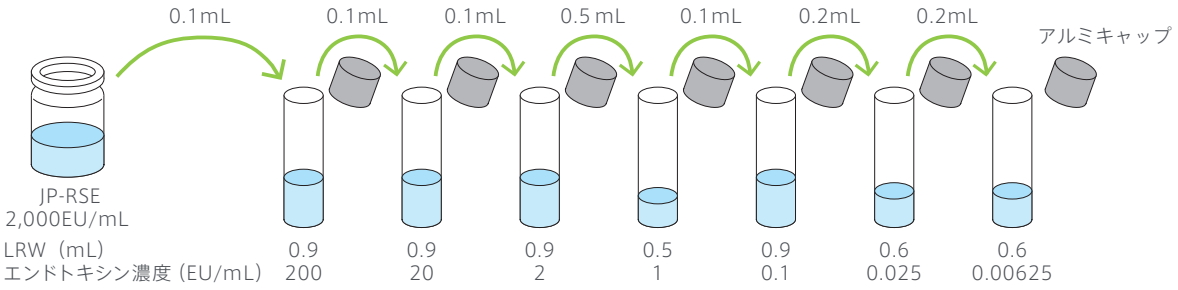
1-1 エンドトキシン標準溶液の調製

(1) エンドトキシン標準原液 (2,000EU/mL) (p.7参照) を試験管ミキサーで3分間攪拌する。

(2) LRWを用いて10倍段階希釈を繰り返し、2EU/mLを調製後、2倍希釈し、1EU/mLを調製する。

(3) さらに、10倍希釈後、4倍段階希釈を2回繰り返し、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 (mL)	エンドトキシン濃度 (EU/mL)							
	2,000	200	20	2	1	0.1	0.025	0.00625
JP-RSE		0.1	0.1	0.1	0.5	0.1	0.2	0.2
LRW		0.9	0.9	0.9	0.5	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) LRWおよび 1-1 で調製した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LRW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。

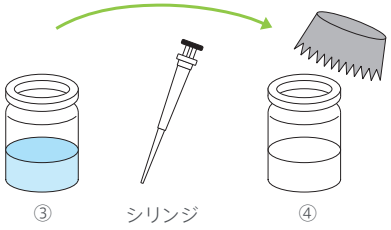
ウェルパターン例：予備試験 (検量線の信頼性確認試験)

Blk：LRW

St1～St3：エンドトキシン標準溶液

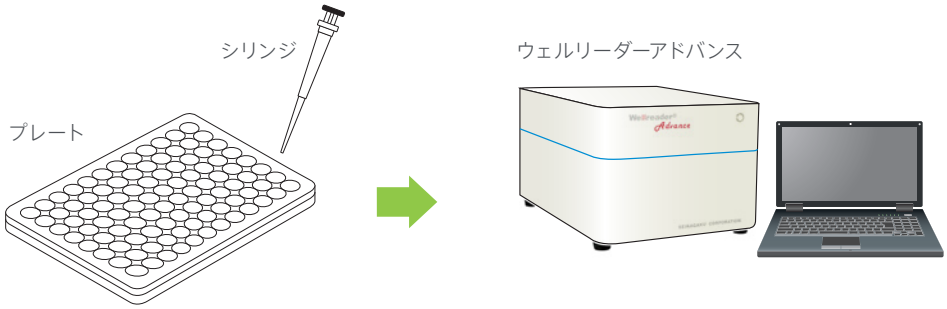
1-3 ライセート試液の調製

(1) ES-50Mセットのライセート試薬 (④) のバイアルを軽く叩いて、飛散した粉末を底に落とす。
(2) ピンセットを用い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) 添付の緩衝液 (③) の全量をシリンジで加え、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撹拌して溶解する。
・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分程度で溶解します。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、ウェルリーダーアドバンスにセットする。
(3) 測定 ボタンをクリックすると、直ちに1分間撹拌され、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。
・ウェルリーダーアドバンス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。
・Software for Wellreader, DIエディション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) 検量線の表示 ボタン→ 検量線の情報 ボタンをクリックし、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。

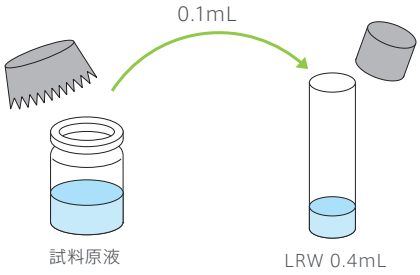
2 反応干渉因子試験

2-1 エンドトキシン標準溶液の調製

(1) 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 (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) 試験管にLRW 0.4mLを入れる。
(2) 被検試料原液は試験管ミキサーで渦ができるよう1分間撹拌後、0.1mLを (1) の試験管に加え、試験管ミキサーで1分間撹拌し、2倍濃度試料溶液とする。



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 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：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0.1EU/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。

(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)

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。

2-5 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、ウェルリーダーアドバンスにセットする。

(3) 測定 ボタンをクリックすると、直ちに1分間撹拌され、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。

・ウェルリーダーアドバンス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。

・Software for Wellreader, DIエディション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：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。
（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）

① 検量線の表示 ボタン－ 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液の吸光度変化率が1.00mAbs/minを超えないことを確認する。

(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。

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

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」）。

■ 定 量

3 定量

3-1 操作方法

2 反応干渉因子試験と同様に、

(1) エンドトキシン標準溶液、2倍濃度試料溶液、試料添加用エンドトキシン標準溶液を調製する。

(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。

ウェルパターン例：定量

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)

(3) ライセート試液を調製する。

(4) 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。

(5) プレートに蓋をかぶせ、ウェルリーダーアドバンスにセットする。

(6) 測定 ボタンをクリックすると、直ちに1分間撹拌され、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。

・ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.1をご参照ください。

3-2 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。

・Software for Wellreader, DIエディションであらかじめ設定した解析条件で、自動解析されます。

3-3 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、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。
(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. 日本薬局方エンドトキシン標準品（エンドトキシン10000）のキャップを開封し、汚染に注意しながらピンセットでゴム栓を開封します。
2. 2,000EU/mLになるよう、添付文書あるいはキャップの上に記載された用量のエンドトキシン試験用水を添加します。
3. ゴム栓で蓋をし、キャップを締めます。パラフィルムでキャップとバイアルを固定し、試験管ミキサーで15分間激しく攪拌します。
4. 調製したエンドトキシン標準原液は5±3℃（凍結を避ける）で保存し、溶解後は28日以内にご使用ください。
   直ちに使用しないときは、キャップにパラフィルムを巻いて密封してください。

発売元

生化学工業株式会社

事業推進本部 海外事業推進部 LALグループ
〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目6-1
Telephone:03-5220-8953
Facsimile :03-5220-8956
E-mail : lal@seikagaku.co.jp
URL : https://www.lalbiz.com/

2026年9月1日発行 0T（NE）