



SEIKAGAKU CORPORATION

ENDOTOXIN

第十八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

1	はじめに
2	エンドトキシン試験法に必要な試薬および器具
3	参考
3	器具について
3	エンドトキシン標準原液の調製について
3	エンドトキシン試験用水について
5	第十八改正日本薬局方：参考情報
6	エンドトキシン試験法と測定試薬に遺伝子組換えタンパク質を用いる代替法 標準操作法
6	遺伝子組換えLAL試薬：パイロスマートネクストジェンを用いたカイネティック比色法（反応速度法）
13	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
17	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
18	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）
25	パイロクロム（グルカシールド緩衝液付き）を用いたカイネティック比色法（反応時間法）
31	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
32	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（反応速度法）
37	汎用比色計を用いたエンドポイント比色法 標準操作法
38	パイロカラージアゾ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）
40	パイロカラージアゾ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）
43	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
44	パイロテル-Tを用いたカイネティック比濁法（反応時間法）
51	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
52	日本薬局方におけるエンドトキシン試験法：ゲル化法
56	パイロテルを用いたゲル化法
60	付録
60	第十八改正日本薬局方 一般試験法 4.01 エンドトキシン試験法（全文）
63	第十八改正日本薬局方 参考情報G4：エンドトキシン試験法と測定試薬に遺伝子組換えタンパク質を用いる代替法〈G4-4-180〉
65	第十八改正日本薬局方 参考情報G4：エンドトキシン規格値の設定〈G4-5-131〉
66	主な医薬品のエンドトキシン規格値
70	製品一覧

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。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变化を指標とする光学定量法があります。

薬局方への収載は、わが国では、1988年に注射用水のエンドトキシン試験法として、ゲル化法がJP11追補に初めて収載され、その後JP13（1996年）に比色法、比濁法が追加収載されました。

その後、ICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）の活動の一環として、エンドトキシン試験法の国際調和作業が進められてきました。その結果、3次にわたり改訂・署名された国際調和文書に合わせてJP、米国薬局方、欧州薬局方が順次改訂されました。2013年には「薬局方テキストのICH地域における相互利用に関する専門家作業部会（ICH Q4B）」ガイドラインに基づく事項別付属文書Annex14（エンドトキシン試験法）について、三極規制当局から、ICH地域内においてエンドトキシン試験法は相互利用が可能であるとの通知*が出されています。

*厚生労働省からの通知は、薬食審査発0321第1号（平成25年3月21日）

JP18（令和3年6月7日厚生労働省告示第220号）では「エンドトキシン試験法と測定試薬に遺伝子組換えタンパク質を用いる代替法<G4-4-180>」が参考情報として収載されました。

以下、JP18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。

第十八改正日本薬局方 エンドトキシン試験法の構成

準 備	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
試験方法	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. 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

	遺伝子組換えLAL試薬	光学的定量法			
	比色法	比色法			
	カイネティック法	カイネティック法		エンドポイント法	
	マイクロプレート法	マイクロプレート法	シングルバイアル法	マイクロプレート法	シングルバイアル法
試薬	・パイロスマートネクストジェン	・エンドスペシー ES-50Mセット ・パイロクロム	・エンドスペシー ES-24Sセット	・エンドスペシー ES-50Mセット ・パイロクロム	・エンドスペシー ES-24Sセット
標準品	日本薬局方エンドトキシン標準品				
試験用水	LAL試験用水（LRW）				
その他関連試薬				・パイロカラー ジアゾ試薬 DIA150-MP	・パイロカラー ジアゾ試薬 DIA60-STV
測定機器	・ウェルリーダーアドバンス	・ウェルリーダー アドバンス	・EGリーダー SV-12	・マイクロプレート リーダー ・ドライブロックバス	・分光光度計 ・恒温槽
測定用器具	・トキシペットプレートLP	・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

その他器具

- ・乾熱滅菌試験管（アルミキャップ付）
- ・乾熱滅菌アルミ箔
- ・トキシペットサンプラー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）
- ・可変式連続分注器「MODEL 8100」（株式会社ニチヨー）
- ・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）
- ・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（エンドポイント法のみ使用）

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、汚染を避けるためにバイアルの口に乾熱滅菌アルミ箔をかぶせてください。
- ☆長時間標準品等を保存する場合は、液の蒸発を防ぐためパラフィルムをご使用ください。

光学的定量法	ゲル化法	
比濁法		
カイネティック法		
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

日本薬局方エンドトキシン標準品

LAL試験用水（LRW）

・ウェルリーダー アドバンス	LAL試験用サーモアルミバスセット	
・トキシベット プレートLP	・パイロチューブ	・乾熱滅菌 アルミキャップ

■ 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8℃以下（凍結を避ける）で保存し、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。

エンドトキシン試験用水について

LAL試験用水（LRW、製品コード：010290）を使用してください。

エンドトキシン試験法と測定試薬に 遺伝子組換えタンパク質を用いる代替法 標準操作法

第十八改正日本薬局方において、エンドトキシン試験法における
ライセート試薬および測定方法に加え、遺伝子組換えタンパク質を
利用したエンドトキシン測定試薬を用いる代替法が収載されました。
遺伝子組換えLAL試薬パイロスマートネクストジェンによる
カイネティック比色法（反応速度法）の標準操作法を示します。

遺伝子組換えLAL試薬： パイロスマートネクストジェンを用いた 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2倍段階希釈 5濃度 (0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 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。

■ 必要な試薬および器具

試 薬	・ 遺伝子組換えLAL試薬：パイロスマートネクストジェン ・ 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 ・ 可変式連続分注器「MODEL8100」 (株式会社ニチリョー) ・ 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 (以下、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

測定のためのパラメータ

測定時間: 00:30:00 インターバル: 00:15 m:s 測定番号: 00000001 設定温度: 37.0

開始待ち時間: 00:01:00 主波長: 405 対照波長: 492

開始時のミキシング時間: 00:01:00 スピード: 10

元へ戻す 適用

2. 計算のためのパラメータ

計算のためのパラメータ

モードの選択: ☒ 反応速度法 検量線の選択: ☒ 一次式

☐ 反応時間法 (0.500) ☐ ロジスティック (offset)

☐ エンドポイント ☒ 実数(X) - 実数(Y)

移動平均: 1 ☐ Log(X) - Log(Y)

計算範囲: 開始時間: 00:02:00 終了時間: 00:30:00

スライス上部: 2 %

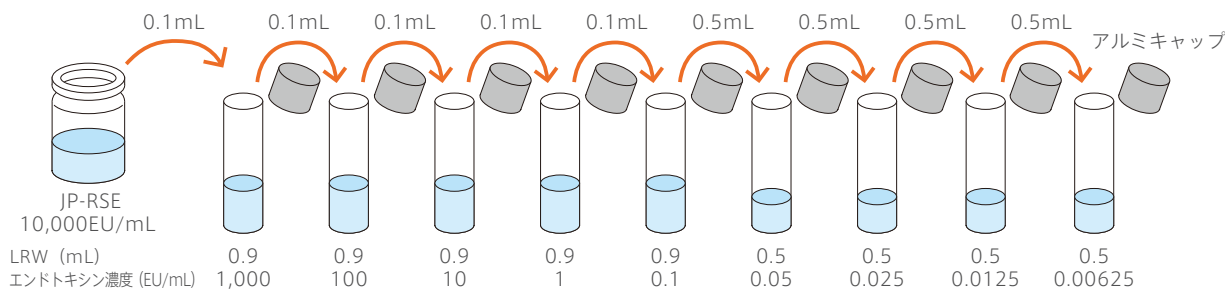
再計算 元に戻す 適用

■ 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 (10,000 EU/mL) (p.3参照) を試験管ミキサーで1分間攪拌する。
 - (2) LRW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、2倍段階希釈を4回繰り返し、エンドトキシン標準溶液 5濃度 (0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 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)									
	10,000	1,000	100	10	1	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.00625
JP-RSE		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5
LRW		0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5

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 5濃度 (0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625 EU/mL) の各0.05 mL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)

ウェルパターン

タイトル 予備試験 (検量線の信頼性確認試験) 濃度の単位 EU/mL

ウェル	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	blk									
B	St 1	St 1	St 1									
C	St 2	St 2	St 2									
D	St 3	St 3	St 3									
E	St 4	St 4	St 4									
F	St 5	St 5	St 5									
G												
H												

標準の濃度

標準の濃度	希釈倍率	添加濃度
St-01 0.00625	T-01 * 1.00	Tr-01 0.05
St-02 0.0125	T-02 * 1.00	Tr-02 0.05
St-03 0.025	T-03 * 1.00	Tr-03 0.05
St-04 0.05	T-04 * 1.00	Tr-04 0.05
St-05 0.1	T-05 * 1.00	Tr-05 0.05
St-06	T-06 * 1.00	Tr-06 0.05
St-07	T-07 * 1.00	Tr-07 0.05
St-08	T-08 * 1.00	Tr-08 0.05

検体名 (LIMS依頼番号)

T-01
T-02
T-03
T-04
T-05
T-06
T-07
T-08

試薬 バイロスマートネクストジェン ロット番号 PNGXXXX

溶解液 溶解緩衝液 ロット番号 XXXXXXXX

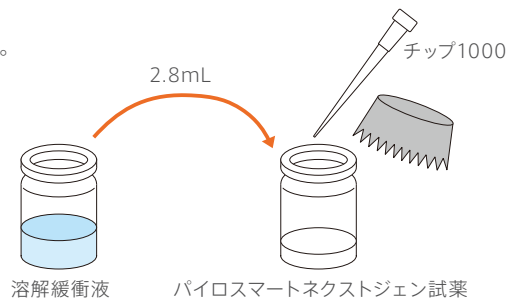
標準品 日本薬局方エンドトキシン標準品 ロット番号 Control_XXXXXXXX

blk : LRW

St1~St5 : エンドトキシン標準溶液

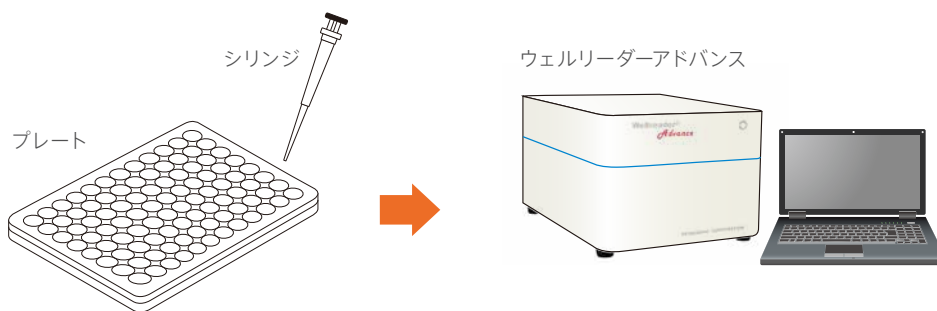
1-3 パイロスマートネクストジェン試薬の調製

- (1) パイロスマートネクストジェン試薬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) パイロスマートネクストジェン添付の溶解緩衝液2.8mLをトキシベットチップ1000で加え、バイアルの口に乾熱滅菌アルミ箔をかぶせる。
- (4) 手で小さな円を描くように1分間攪拌して完全に溶解させる。
細かい泡が消失するまで少なくとも2分間放置する。
 - ・使用する直前に、液が均一になるようにバイアルを振り混ぜます。
ただし、泡立てると感度低下を招くことがありますので、激しい攪拌は避けてください。
 - ・溶解後、20分以内に速やかに使用してください。



1-4 パイロスマートネクストジェンの添加および測定

- (1) 完全に溶解したパイロスマートネクストジェン 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。
 - ・ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.6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

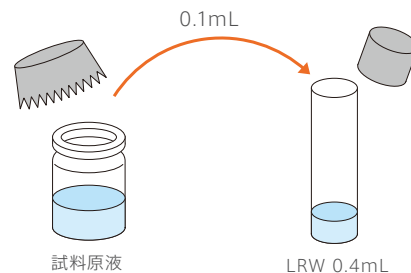
2-1 エンドトキシン標準溶液の調製

- (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 5濃度 (0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 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分間攪拌後、0.1mLを(1)の試験管に加え、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。



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 5濃度（C液：0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 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）

標準の濃度	希釈倍率	添加濃度
St-01 0.00625	T-01 * 1.00	Tr-01 0.05
St-02 0.0125	T-02 * 1.00	Tr-02 0.05
St-03 0.025	T-03 * 1.00	Tr-03 0.05
St-04 0.05	T-04 * 1.00	Tr-04 0.05
St-05 0.1	T-05 * 1.00	Tr-05 0.05
St-06	T-06 * 1.00	Tr-06 0.05
St-07	T-07 * 1.00	Tr-07 0.05
St-08	T-08 * 1.00	Tr-08 0.05

検体名 (LIMS依頼番号)

T-01 A液 (試料溶液のみ)

T-02

T-03

T-04

T-05

T-06

T-07

T-08

試薬: パイロスマートネクストジェン

溶解液: 溶解緩衝液

標準品: 日本薬局方エンドトキシン標準品

ロット番号: PNGXXXX

ロット番号: XXXXXXXX

ロット番号: Control_XXXXXXXX

blk: LRW (D液)

St1~St5: 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 パイロスマートネクストジェン試薬の調製

- (1) 検量線の信頼性確認試験：1-3 パイロスマートネクストジェン試薬の調製に従い、パイロスマートネクストジェンを調製する。

2-6 パイロスマートネクストジェンの添加および測定

- (1) 完全に溶解したパイロスマートネクストジェン 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。
 - ・ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.6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：パイロスマートネクストジェン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1.0mAbs/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1.0mAbs/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。

- 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。

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

- 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

標準の濃度	希釈倍率	添加濃度
St-01 0.00625	T-01 * 1.00	Tr-01 0.05
St-02 0.0125	T-02 * 1.00	Tr-02 0.05
St-03 0.025	T-03 * 1.00	Tr-03 0.05
St-04 0.05	T-04 * 1.00	Tr-04 0.05
St-05 0.1	T-05 * 1.00	Tr-05 0.05
St-06	T-06 * 1.00	Tr-06 0.05
St-07	T-07 * 1.00	Tr-07 0.05
St-08	T-08 * 1.00	Tr-08 0.05

検体名 (LIMS依頼番号)
T-01 A液 (試料溶液のみ)
T-02
T-03
T-04
T-05
T-06
T-07
T-08

試薬: パイロスマートネクストジェン
溶解液: 溶解緩衝液
標準品: 日本薬局方エンドキシン標準品

ロット番号: PNGXXXX
ロット番号: XXXXXXXX
ロット番号: Control_XXXXXXXX

blk : LRW (D液)

St1~St5 : 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) パイロスマートネクストジェン試薬を調製する。
- (4) 完全に溶解したパイロスマートネクストジェン 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。
 - ・ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.6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：パイロスマートネクストジェン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1.0mAbs/minである)

- (2) 試験の判定を行う。

- ① 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

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。試験は、通例 $37\pm1^{\circ}\text{C}$ で行います。

■ 予備試験

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。

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。

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試験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。

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

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。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します。

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。

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。

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

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： $|r| \geq 0.980$
- ・ 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

※注：反応干渉が認められるときは、試料溶液から反応干渉作用を除くために、試料溶液また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、透析または加熱処理など）を施すことができます。
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必要があります。

■ 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： $|r| \geq 0.980$
- ・ 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
- ・ 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 カインेटリック比色法 標準操作法

ウェルリーダーアドバンスを用いた
エンドスペシーES-50Mセット／
パイロクロム（グルカシールド緩衝液付き）による
カインेटリック比色法の標準操作法を示します。

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 ・可変式連続分注器「MODEL8100」 (株式会社ニチリョー) ・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 (以下、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

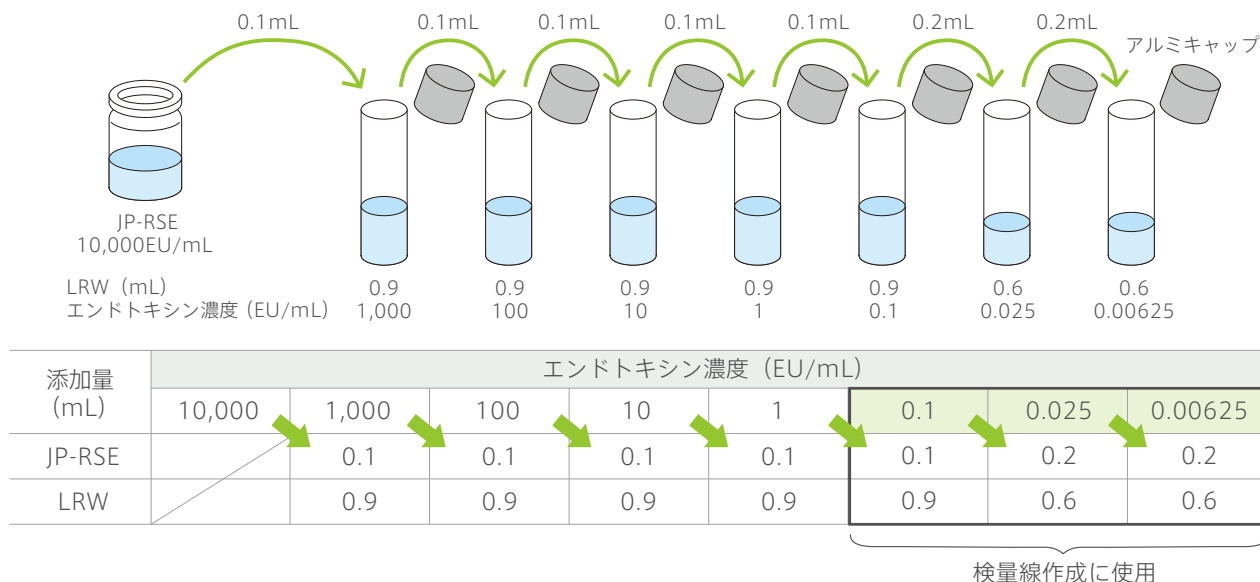
2. 計算のためのパラメータ

■ 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 (10,000 EU/mL) (p.3参照) を試験管ミキサーで1分間攪拌する。
 - (2) LRW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、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。



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)

ウェルパターン

タイトル: 予備試験 (検量線の信頼性確認試験) 濃度の単位: EU/mL

標準の濃度		希釈倍率	添加濃度
St-01	0.00625	T-01 * 1.00	Tr-01 0.05
St-02	0.025	T-02 * 1.00	Tr-02 0.05
St-03	0.1	T-03 * 1.00	Tr-03 0.05
St-04		T-04 * 1.00	Tr-04 0.05
St-05		T-05 * 1.00	Tr-05 0.05
St-06		T-06 * 1.00	Tr-06 0.05
St-07		T-07 * 1.00	Tr-07 0.05
St-08		T-08 * 1.00	Tr-08 0.05

検体名 (LIMS依頼番号)

T-01
T-02
T-03
T-04
T-05
T-06
T-07
T-08

試薬: エンドスペシーES-50Mセット ロット番号: ES1XXXX

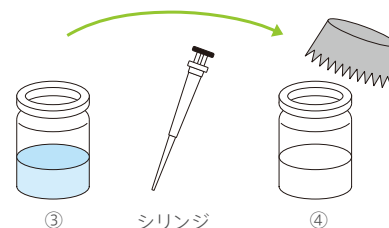
溶解液: 緩衝液 ロット番号: XXXXXX

標準品: 日本薬局方エンドトキシン標準品 ロット番号: Control_XXXXXXX

blk : LRW
St1~St3 : エンドトキシン標準溶液

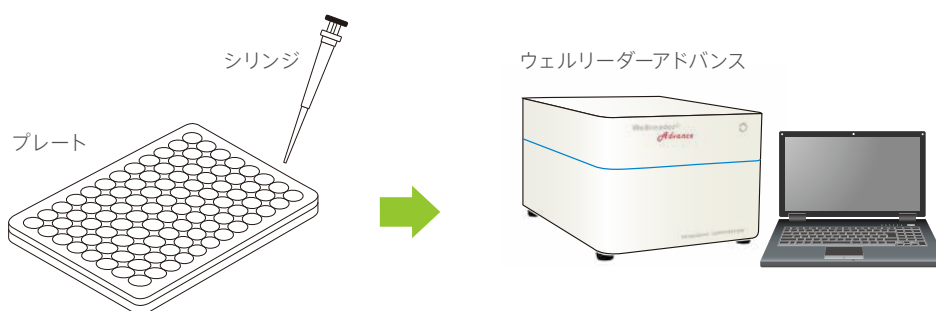
1-3 ライセート試液の調製

- (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、バイアルの口に乾熱滅菌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攪拌して溶解する。
 - ・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。
 - ・ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.18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

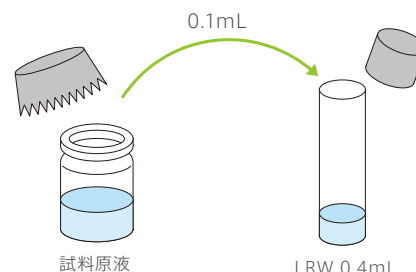
2-1 エンドトキシン標準溶液の調製

- (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分間攪拌後、0.1mLを(1)の試験管に加え、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。



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)

ウェルパターン

タイトル | 予備試験 (反応干渉因子試験) | 濃度の単位 | EU/mL

標準の濃度	希釈倍率	添加濃度
St-01 0.00625	T-01 * 1.00	Tr-01 0.05
St-02 0.025	T-02 * 1.00	Tr-02 0.05
St-03 0.1	T-03 * 1.00	Tr-03 0.05
St-04	T-04 * 1.00	Tr-04 0.05
St-05	T-05 * 1.00	Tr-05 0.05
St-06	T-06 * 1.00	Tr-06 0.05
St-07	T-07 * 1.00	Tr-07 0.05
St-08	T-08 * 1.00	Tr-08 0.05

検体名 (LIMS依頼番号)

T-01 A液 (試料溶液のみ)

T-02

T-03

T-04

T-05

T-06

T-07

T-08

試薬 | エンドスベシー ES-50Mセット | ロット番号 | ES1XXXX

溶解液 | 緩衝液 | ロット番号 | XXXXXX

標準品 | 日本薬局方エンドトキシン標準品 | ロット番号 | Control_XXXXXXX

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。
 - ・ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.18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。

- 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。

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

- 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。
- ・ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.18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。

- ① 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。

試験成績書：例

エンドトキシン試験成績書

LIMS依頼番号： 検体4

製剤名	アスコルビン酸注射液	エンドトキシン規格値
品目コード	87314	0.15 EU/mg 未満
製造番号	1J237	添加エンドトキシン濃度
試験実施日	2017/06/23 10:42	機器S/N 507031
ファイル名	00000010~170623_113538.kiw	0.05 EU/mL

LAL試薬：エンドスペシーES-50M

ロット番号 ES16008

溶解液：緩衝液

ロット番号 758105

標準品：CSE

ロット番号 249025

	試料溶液エンドキシン濃度	平均値	試料溶液の濃度	試料エンドキシン濃度
試料溶液 (A液)	0.00626 EU/mL 0.00643 EU/mL -----	0.00634 EU/mL	25.000 mg/mL	0.00025 EU/mg
		平均値	回収率	有効性(適/不適)
エンドキシン添加 試料溶液 (B液)	0.04973 EU/mL 0.05058 EU/mL -----	0.05016 EU/mL	88 %	適
検量線 (C液)	相関係数：		0.999	適
ブランク (D液)	平均値：		0.24 mAbs/min	適
試験有効性(成立/不成立)				成立

* 各適合条件
50% ≤ 回収率 ≤ 200% で 適
|相関係数| ≥ 0.980 で 適
ブランク ≤ 1.00 mAbs/min で 適

エンドトキシン試験判定(適合/不適合)

適合

作成・承認 測定者：生化学次郎
開始日：2017/06/23 10:11

作成者：生化学次郎
署名日：2017/06/23 11:28

承認者：生化学太郎
署名日：2017/06/23 11:33

監査証跡 確認(1)：生化学次郎
署名日：2017/06/23 11:22

確認(2)：生化学太郎
署名日：2017/06/23 11:32

確認(3)：生化学花子
署名日：2017/06/23 11:35

備考欄

パイロクロム(グルカシールド緩衝液付き)を用いた カインेटィック比色法(反応時間法) (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：パイロクロム（グルカシールド緩衝液付き）（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） ・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 ・可変式連続分注器「MODEL8100」（株式会社ニチリョー） ・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（以下、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ンेटィック比色法(反応時間法):設定条件

1. 測定のためのパラメータ

測定のためのパラメータ

測定時間	インターバル	測定番号	設定温度
01:00:00	00:15 m/s	00000001	37.0
開始待ち時間		主波長	対照波長
00:01:00		405	492
開始時のミキシング時間			
00:01:00	スピード 10		

元へ戻す 適用

2. 計算のためのパラメータ

計算のためのパラメータ

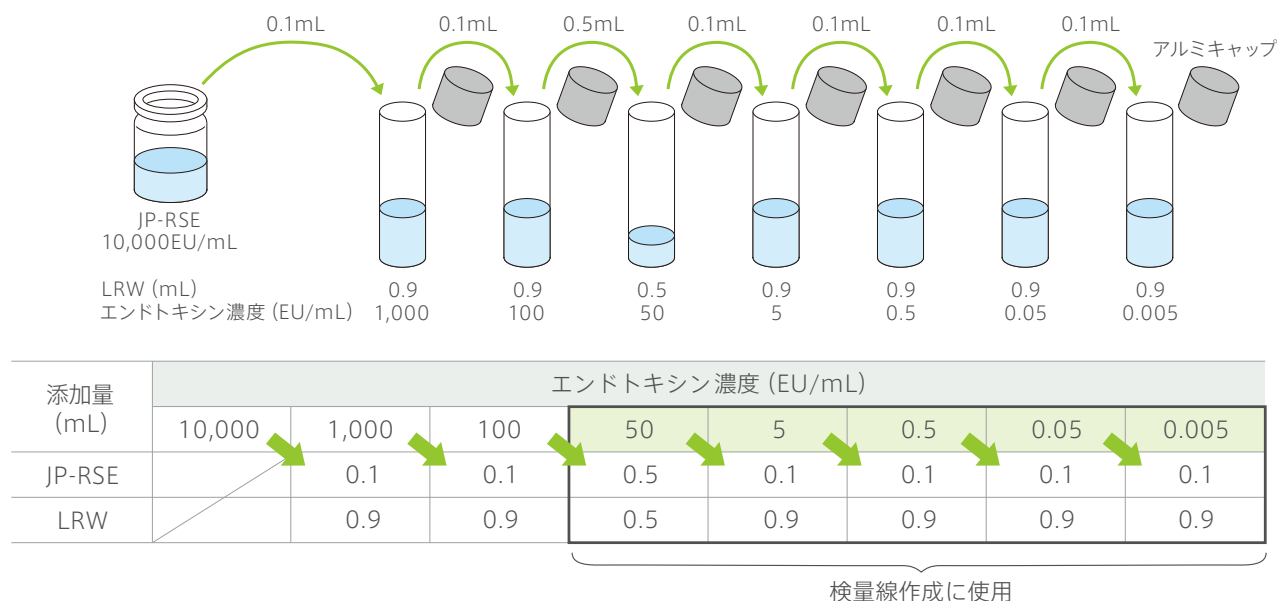
モードの選択	検量線の選択
☐ 反応速度法	☒ 一次式
☒ 反応時間法 0.030	☐ ロジスティック (offset)
☐ エンドポイント	☐ 実数(X) - 実数(Y)
移動平均 5	☒ Log(X) - Log(Y)
計算範囲	
開始時間 終了時間	再計算
00:00:00 01:00:00	
スライス上部 0 %	元へ戻す 適用

■ 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 (10,000 EU/mL) (p.3参照) を試験管ミキサーで1分間攪拌する。
 - (2) LRWを用いて10倍段階希釈を2回繰り返し、100 EU/mLを調製後、2倍希釈し、50 EU/mLを調製する。
 - (3) さらに、10倍段階希釈を4回繰り返し、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。



1-2 各試料のプレートへの分注

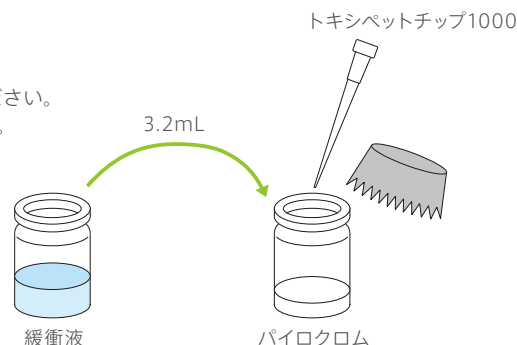
- (1) LRWおよび1-1で調製したエンドトキシン標準溶液 5濃度 (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/mL) の各0.05 mLずつをプレートの所定のウェルに分注する (ウェルパターン例参照)。
- ・ 調製後のエンドトキシン標準溶液は使用直前に10秒間攪拌してください。
 - ・ 陰性対照として同時にLRWを測定することをおすすめします。
 - ・ 試料の分注後、ただちにプレートに蓋をかぶせてください。

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~St5: エンドトキシン標準溶液

1-3 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) ピンセットを使っ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) パイロクロム添付の溶解用緩衝液3.2mLをトキシベットチップ1000で加え、バイアルの口に乾熱滅菌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攪拌する。
 - ・ 溶解用緩衝液の吸引・吐出はゆっくりと行ってください。
 - ・ 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。
 - ・ 凍結乾燥粉末が完全に溶解するまで少なくとも5分程度かかります。
 - ・ 調製後は2~8℃で保存し、8時間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。
 - ・ ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.25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 5濃度 (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/mL) を調製する。

2-2 2倍濃度試料溶液の調製

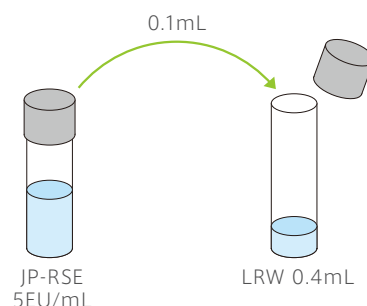
例 : 10倍希釈試料溶液を測定に用いる場合は、試料原液を5倍希釈します。

- (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 (p.20参照) 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 (1 EU/mL) 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LRW 0.4mLを入れる。
- (2) 2-1 で調製した5EU/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 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 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1 EU/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)

The screenshot shows the 'Well Pattern' window with the following details:

- Title:** 予備試験 (反応干渉因子試験)
- Concentration Unit:** EU/mL
- Well Plate Layout (12 wells):**
 - Row A: 1-12 are empty.
 - Row B: 1-12 are empty.
 - Row C: 1-12 are empty.
 - Row D: 1-12 are empty.
 - Row E: 1-12 are empty.
 - Row F: 1-12 are empty.
 - Row G: 1-12 are empty.
 - Row H: 1-12 are empty.
- Standard Concentration Table:**

標準の濃度	希釈倍率	添加濃度
St-01 0.005	T-01 * 1.00	Tr-01 0.5
St-02 0.05	T-02 * 1.00	Tr-02 0.05
St-03 0.5	T-03 * 1.00	Tr-03 0.05
St-04 5	T-04 * 1.00	Tr-04 0.05
St-05 50	T-05 * 1.00	Tr-05 0.05
St-06	T-06 * 1.00	Tr-06 0.05
St-07	T-07 * 1.00	Tr-07 0.05
St-08	T-08 * 1.00	Tr-08 0.05
- Sample Name (LIMS依頼番号):** T-01 A液 (試料溶液のみ)
- Test Reagent:** Pyrochrome
- Dissolution Solution:** Glucashield Buffer
- Standard:** 日本薬局方エンドトキシン標準品
- Lot Numbers:**
 - Pyrochrome: CKGXXXX
 - Glucashield Buffer: XXXXXXX
 - Standard: Control_XXXXXXX

blk : LRW (D液)

St1~St5 : 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)

2-5 ライセート試液の調製

- (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。
 - ・ ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.25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：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 **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」)。

■ 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~St5: 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。
 - ・ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.25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：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)

- (2) 試験の判定を行う。

- ① 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 カインेटリック比色法 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
カインेटリック比色法（反応速度法）の標準操作法を示します。

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(反応速度法)(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-24Sセット (以下、ES-24S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 ・可変式連続分注器「MODEL8100」 (株式会社ニチリョー) ・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 ・試験管ミキサー
測定機器	・EGリーダーSV-12

■ EGリーダーSV-12を用いたカイネティック比色法(反応速度法):設定条件

1. Parameter

Parameter

Measurement Conditions

☐ Endpoint Assay

☒ Kinetic Assay - Total Time(h:m:s) 00:30:00 Interval Time(m:s) 00:15

Filters

Main Wave 405 - Reference 492

Temperature 37.0 °C Serial No. 1

Kinetic Assay Parameter

Mode

☒ Mean Slope ☐ Decrease Mode ☐ Pulse Reduction

☐ Max Slope Threshold OD 0.010 ☐ Delta-T 1 Moving Average

☐ Mean OD

Limit

Calc Start Time 00:07:00 Slice(High) 2%

- End Time 00:30:00 Slice(Low) 0%

Renewal Step 0.000

Kinetic Multiplier

Slope * 1.00 Recalc

Regression Analysis

☐ Blank Subtraction

Curve

☒ Point to Point ☐ Linear Equation ☐ Quadratic Equation ☐ Logit ☐ Logistic ☐ Logistic(Offset) ☐ Gompertz

X

☒ Real ☐ Log ☐ Log(Log)

Y

☒ Real ☐ Log ☐ Log(Log)

Y=y, X=x

Y = AX + B

■ 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

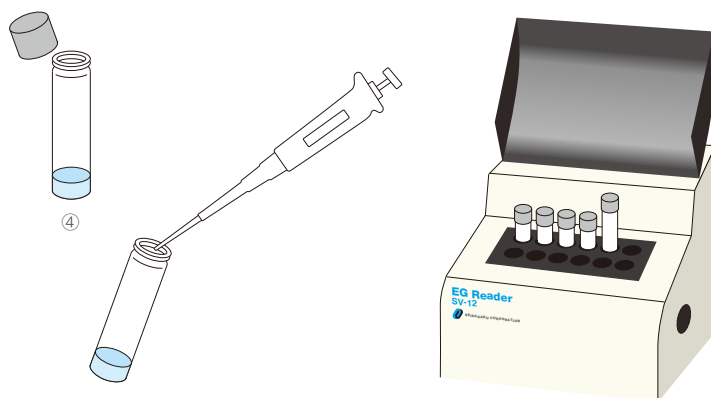
- (1) エンドスペシーES-50Mセットを用いたカイネティック比色法（反応速度法）：1-1 エンドトキシン標準溶液の調製 (p.19参照) に従い、エンドトキシン標準溶液 3濃度 (0.1, 0.025, 0.00625 EU/mL) を調製する。

1-2 ライセート試液の調製

- (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) 0.2mLをトキシペットチップ200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。
- ・ライセート試液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) 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0.2mLを所定のバイアルに添加し、アルミキャップをかぶせ、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LRW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。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) **Curve** 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。

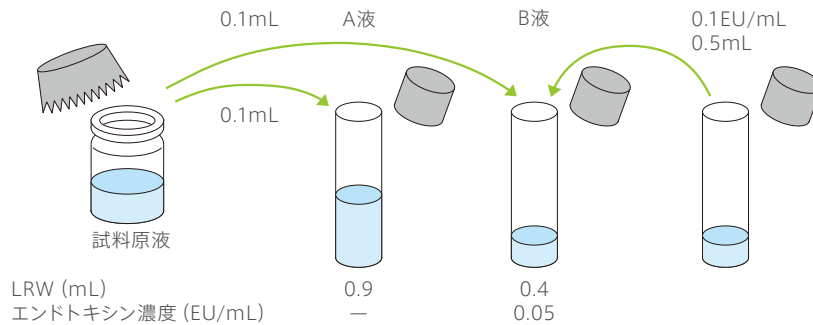
2 反応干渉因子試験

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 試料溶液 (10倍希釈液、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、ES-24Sセットのライセート試薬 (④) のバイアル 12本分を緩衝液で溶解する。
・ライセート試液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) LRW (D液)、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) 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、アルミキャップをかぶせ、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。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。

パターン例：予備試験 (反応干渉因子試験)

Pattern

Multi 2 Start 1 End 48

Unit EU/mL Auto Dilution

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	St 1	St 1	St 2	St 2	St 3	St 3	T 1	T 1	T 2	T 2
B												
C												
D												

	Conc
St-1	0.00625
St-2	0.025
St-3	0.100
St-4	
St-5	
St-6	
St-7	
St-8	
St-9	
St-10	
St-11	
St-12	

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)

T2 : 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)

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。

(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。

- 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」）。

■ 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) A, B, CおよびD液を調製する。
 - (2) ES-24Sセットのライセート試薬 (④) のバイアル12本分を緩衝液で溶解する。
 - (3) A, B, CおよびD液の各0.2mLを所定のバイアルに添加し、アルミキャップをかぶせ、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。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。

パターン例：定量

	Conc
St-1	0.00625
St-2	0.025
St-3	0.100
St-4	
St-5	
St-6	
St-7	
St-8	
St-9	
St-10	
St-11	
St-12	

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)
T2 : 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)

3-2 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、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3.00mAbs/minである)

(2) 試験の判定を行う。

- ① 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。

パイロカラージアゾ試薬を用いた 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、エンドスペシーES-50Mセットを用いたカインेटリック比色法（反応速度法）（マイクロプレート法）標準操作法（p.18～p.24参照）に準じてください。予備試験、定量それぞれの標準操作法のライセート試液の調製後、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：パイロカラージアゾ試薬 DIA150-MP
-----	-------------------------------------

■ ウェルリーダーアドバンスを用いたエンドポイント比色法：設定条件（例）

1. 測定のためのパラメータ

2. 計算のためのパラメータ

■ 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A, B, CおよびD液の所定のウェルに0.05mL添加し、プレートに蓋をかぶせ、ウェルリーダーアドバンスまたはドライブブロックバスを使用し、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）。

1-2 ジアゾカップリング試薬の調製

- (1) Sodium nitrite[1]のバイアルにHCl 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）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、ウェルリーダーアドバンスまたはプレートミキサーを使用して、マイクロプレートを攪拌し、十分に混合する。
- (2) さらに、2液を0.05mLずつ添加し、同様に攪拌、混合し、次いで3液を0.05mLずつ添加し、同様に攪拌、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-グルカンフリーの条件下で行う必要はありません。

1-4 吸光度の測定およびデータ解析

- (1) ウェルリーダーアドバンスまたは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) 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) と同様です。
 - ・エンドポイント法における空試験の限度値は、吸光度0.100Abs以下です。

パイロカラージアゾ試薬を用いた エンドポイント比色法（シングルバイアル法）

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、エンドスペシーES-24Sセットを用いたカインेटリック比色法（反応速度法）（シングルバイアル法）標準操作法（p.32～p.36参照）に準じてください。予備試験、定量それぞれの標準操作法のライセート試液の調製後、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：パイロカラージアゾ試薬 DIA60-STV
-----	-------------------------------------

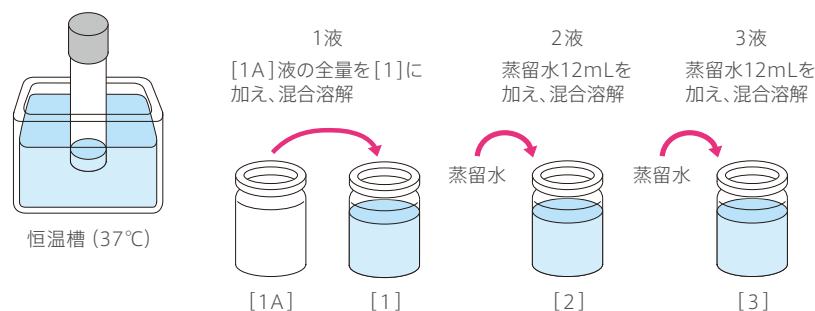
■ 操作方法

1-1 ライセート試液への添加および反応

- (1) A, B, CおよびD液の各0.2mLを調製したライセート試液のバイアルに添加し、アルミキャップをかぶせ、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）。

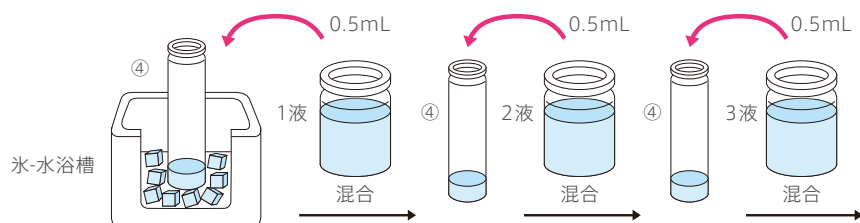
1-2 ジアゾカップリング試薬の調製

- (1) Sodium nitrite[1]のバイアルにHCl 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）。



1-3 反応停止

- (1) 加温終了後、直ちにバイアル（④）を氷-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秒間攪拌し、混合する。
- (2) さらに、2液を0.5mLずつ添加し、同様に攪拌、混合し、次いで3液を0.5mLずつ添加し、同様に攪拌、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-グルカンフリーの条件下で行う必要はありません。
3液を入れたあとは、液量が1.9mLとなりますので、攪拌中に液がこぼれないように注意してください。

1-4 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)。

1-5 判定

- (1) エンドスピーES-24Sセットを用いたカイネティック比色法(反応速度法)(シングルバイアル法)と同様です。
 - ・エンドポイント法における空試験の限度値は、吸光度0.200Abs以下です。

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（反応時間法） 標準操作法

ウェルリーダーアドバンスを用いた
パイロテル-Tによるカイネティック比濁法（反応時間法）の
標準操作法を示します。

パイロテル-Tを用いたカインेटィック比濁法 (反応時間法) (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3濃度 (1, 0.1, 0.01 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。

■ 必要な試薬および器具

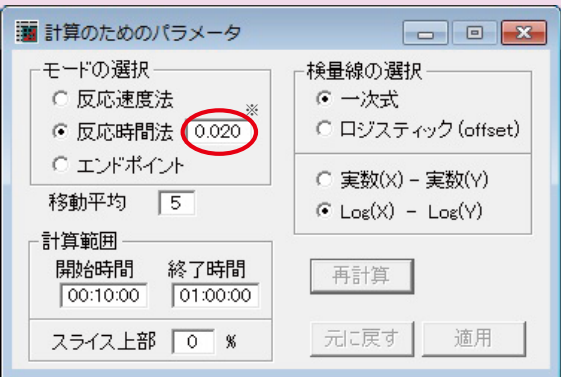
試 薬	・ライセート試薬：パイロテル-T ・標準品：日本薬局方エンドトキシン標準品 (以下、JP-RSE) ・LAL試験用水 (以下、LRW) ・緩衝液：グルカシールドまたはパイロソル (インジケータなし)
器 具	・トキシペットサンプラー200、トキシペットサンプラー1000 ・可変式連続分注器「MODEL8100」 (株式会社ニチリョー) ・トキシペットチップ200、トキシペットチップ1000 ・トキシペットディスペンサー用シリンジ (以下、シリンジ) ・乾熱滅菌試験管 (11.6×65mm、アルミキャップ付、以下、試験管) ・乾熱滅菌アルミ箔 (以下、アルミ箔) ・試験管ミキサー ・プレートミキサー
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ンेटィック比濁法 (反応時間法) : 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



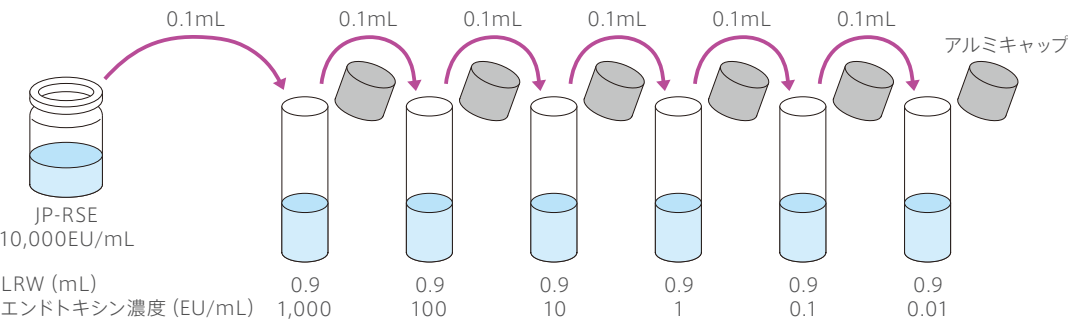
※ 閾値は0.015～0.050の幅で適宜設定してください。

■ 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 (10,000EU/mL) (p.3参照) を試験管ミキサーで1分間攪拌する。
- (2) LRW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、10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 (1, 0.1, 0.01 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。

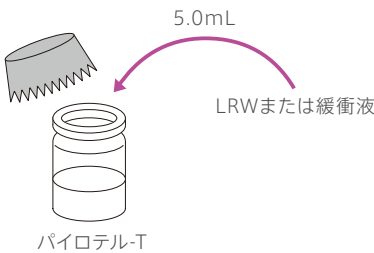


添加量 (mL)	エンドトキシン濃度 (EU/mL)						
	10,000	1,000	100	10	1	0.1	0.01
JP-RSE		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
LRW		0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

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す。
- (2) ピンセットを使って栓を無菌的に持ち上げ、真空状態を解除します。栓は廃棄する。
- (3) LRWまたは緩衝液 (グルカシールドまたはパイロソルインジケータなし) 5.0mLをトキシペットチップ1000で加え、バイアルの口に乾熱滅菌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攪拌する。
- ・ 溶解用のLRWまたは緩衝液の吸引・吐出はゆっくりと行なってください。
 - ・ 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。
 - ・ 凍結乾燥粉末が完全に溶解するまで数分かかります。
 - ・ 溶解後の試薬は2~8℃で保存し、24時間以内に使用してください。



1-3 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 (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)。

- ・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。

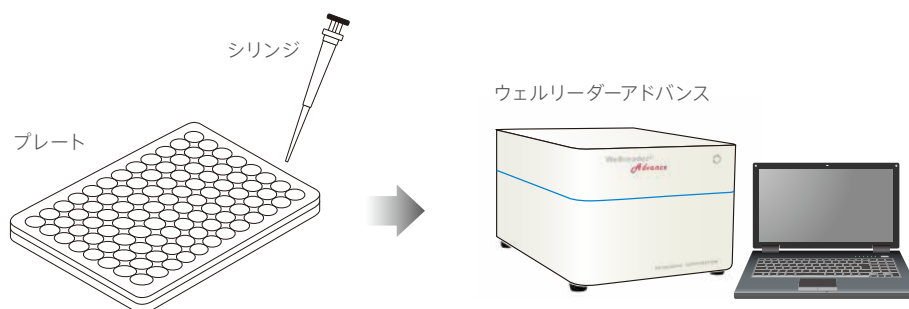
ウェルパターン例：予備試験（検量線の信頼性確認試験）

blk : LRW

St1~St3 : エンドトキシン標準溶液

1-4 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。
- ・ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.44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

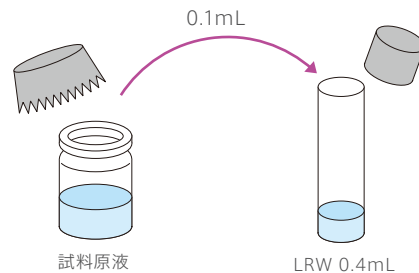
2-1 エンドトキシン標準溶液の調製

- (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 (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。

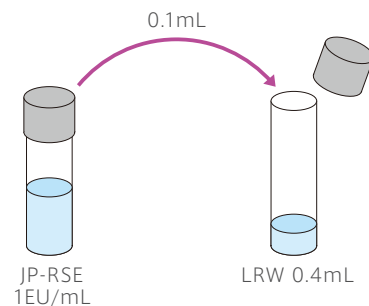
- (1) エンドスピーシーES-50Mセットを用いたカイネティック比色法（反応速度法）：2-2 2倍濃度試料溶液の調製 (p.20参照) に従い、2倍濃度試料溶液を調製する。



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)

ウェル	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

標準の濃度: St-01 0.01, St-02 0.1, St-03 1

希釈倍率: T-01 * 1.00, T-02 * 1.00, T-03 * 1.00, T-04 * 1.00, T-05 * 1.00, T-06 * 1.00, T-07 * 1.00, T-08 * 1.00

添加濃度: Tr-01 0.1, Tr-02 0.05, Tr-03 0.05, Tr-04 0.05, Tr-05 0.05, Tr-06 0.05, Tr-07 0.05, Tr-08 0.05

検体名 (LIMS依頼番号): T-01 A液 (試料溶液のみ), T-02, T-03, T-04, T-05, T-06, T-07, T-08

試薬: パイロテル-T, ロット番号: XXX-XX-XXX-T

溶解液: LRW, ロット番号: XXX-XXXX

標準品: 日本薬局方エンドトキシン標準品, ロット番号: Control_XXXXXXXX

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)

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。
 - ・ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.44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：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)

(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」)。

■ 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、ライセート試液を調製する。
- (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

The screenshot shows the 'Well Pattern' software interface. It includes a 12-well plate layout with wells labeled A-H and 1-12. The layout is as follows:

Well	Content
A1	blk
A2	St 3
A3	T 1
A4	Tr 1
A5	blk
A6	blk
A7	St 1
A8	St 1
A9	St 2
A10	St 2
A11	St 3
A12	St 3
B1	T 1
B2	T 1
B3	Tr 1
B4	Tr 1
B5	Tr 1
B6	Tr 1
B7	Tr 1
B8	Tr 1
B9	Tr 1
B10	Tr 1
B11	Tr 1
B12	Tr 1

Below the plate layout, there are input fields for '試薬' (Reagent), '溶解液' (Solvent), and '標準品' (Standard). The '標準品' field is set to '日本薬局方エンドトキシン標準品'.

On the right, there are tables for '標準の濃度' (Standard Concentration), '希釈倍率' (Dilution Factor), and '添加濃度' (Addition Concentration).

標準の濃度	希釈倍率	添加濃度
St-01 0.01	T-01 * 1.00	Tr-01 0.1
St-02 0.1	T-02 * 1.00	Tr-02 0.05
St-03 1	T-03 * 1.00	Tr-03 0.05
St-04	T-04 * 1.00	Tr-04 0.05
St-05	T-05 * 1.00	Tr-05 0.05
St-06	T-06 * 1.00	Tr-06 0.05
St-07	T-07 * 1.00	Tr-07 0.05
St-08	T-08 * 1.00	Tr-08 0.05

At the bottom, there are fields for '検体名 (LIMS依頼番号)' (Sample Name (LIMS Request Number)) and 'ロット番号' (Lot Number).

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) 完全に溶解したライセート試液 0.1 mL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、ウェルリーダーアドバンスにセットする。
 - (5) **測定** 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。
- ・ウェルリーダーアドバンスの設定条件については、p.44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：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)

- (2) 試験の判定を行う。

- ① 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

パイロテル（マルチテスト／シングルテスト）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

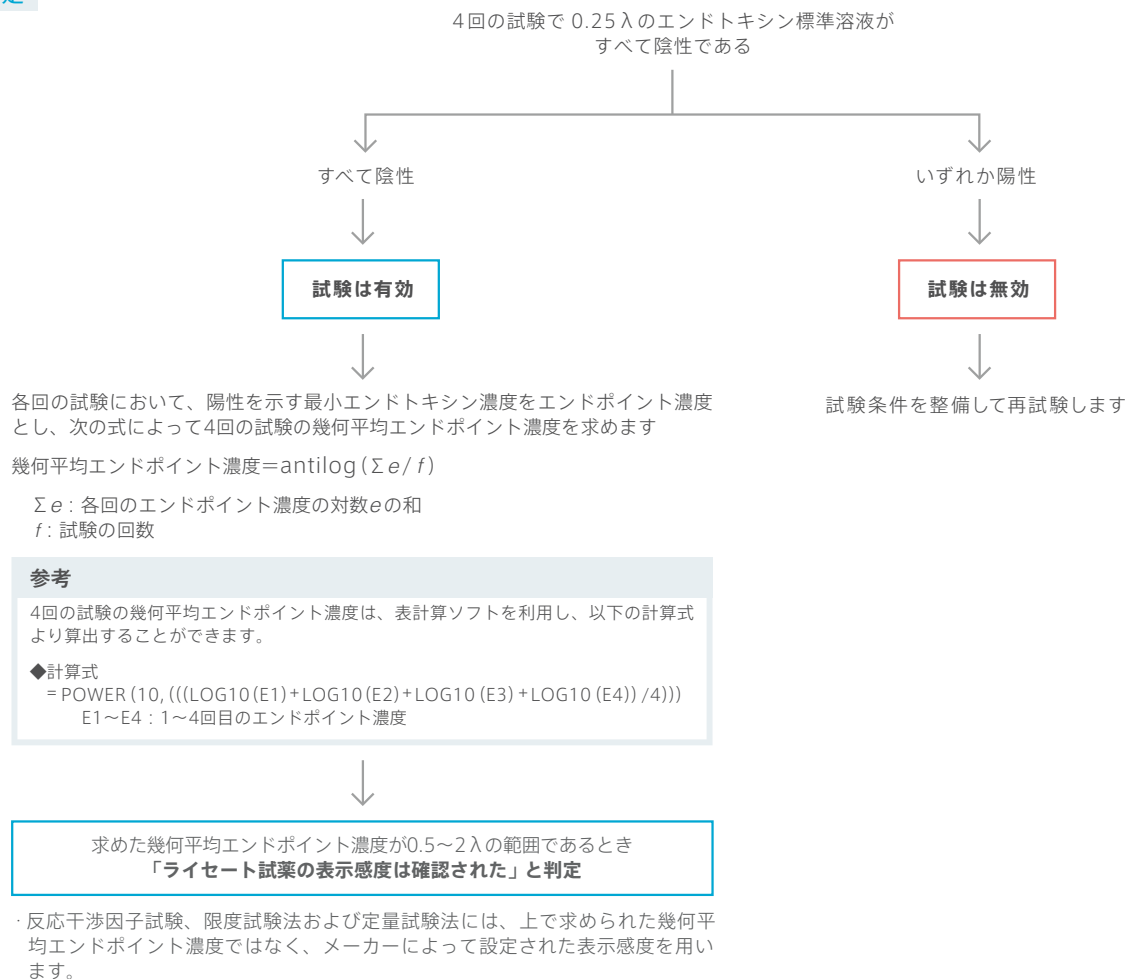
ライセート試薬の表示感度とは、ライセート試薬に規定されている条件下でのライセート試液の凝固に必要な最小エンドトキシン濃度です。使用する前にその表示感度をλを確認しなければなりません。
ライセート試薬の各ロットで、使用する前に、また試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときに行います。

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（2λ，1λ，0.5λ，0.25λ）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。

必要な試験管の本数：16本

判 定



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

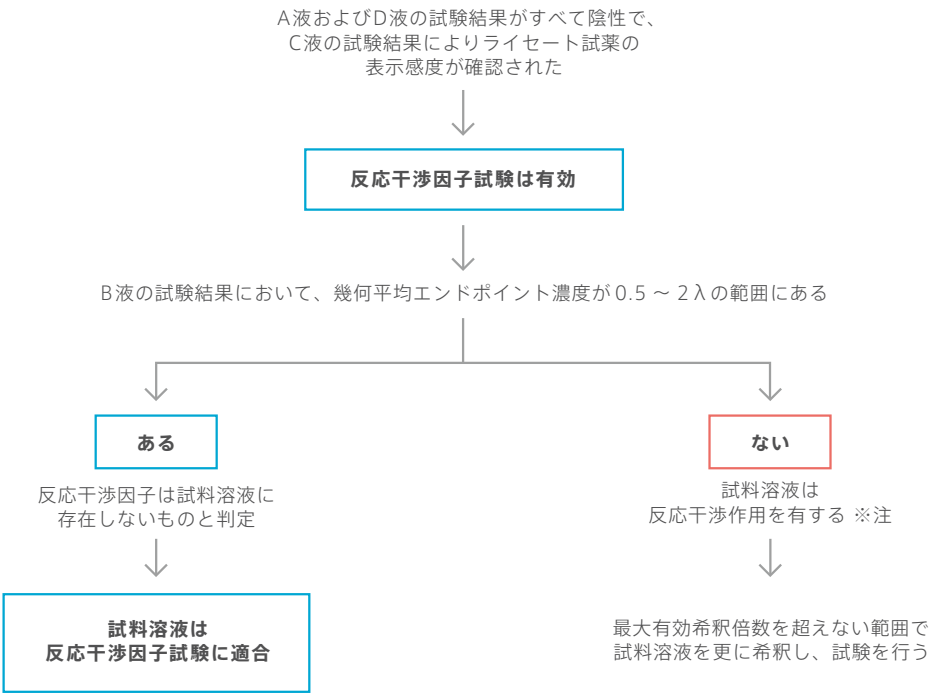
表2に従い、A、B、CおよびD液を調製し、AおよびB液は4回、CおよびD液は2回試験を行います。

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	試験管の本数
A* ¹	0／試料溶液	—	—	—	4	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	16
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	8
D* ⁴	0／エンドトキシン試験用水	—	—	—	2	2
						計30本

- *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



※注：反応干渉が認められるときは、試料溶液から反応干渉作用を除くために、試料溶液また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、透析または加熱処理など）を施すことができます。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必要があります。

■ 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	試験管の本数
A* ¹	0／試料溶液	2	2
B* ²	2 λ／試料溶液	2	2
C* ³	2 λ／エンドトキシン試験用水	2	2
D* ⁴	0／エンドトキシン試験用水	2	2
			計8本

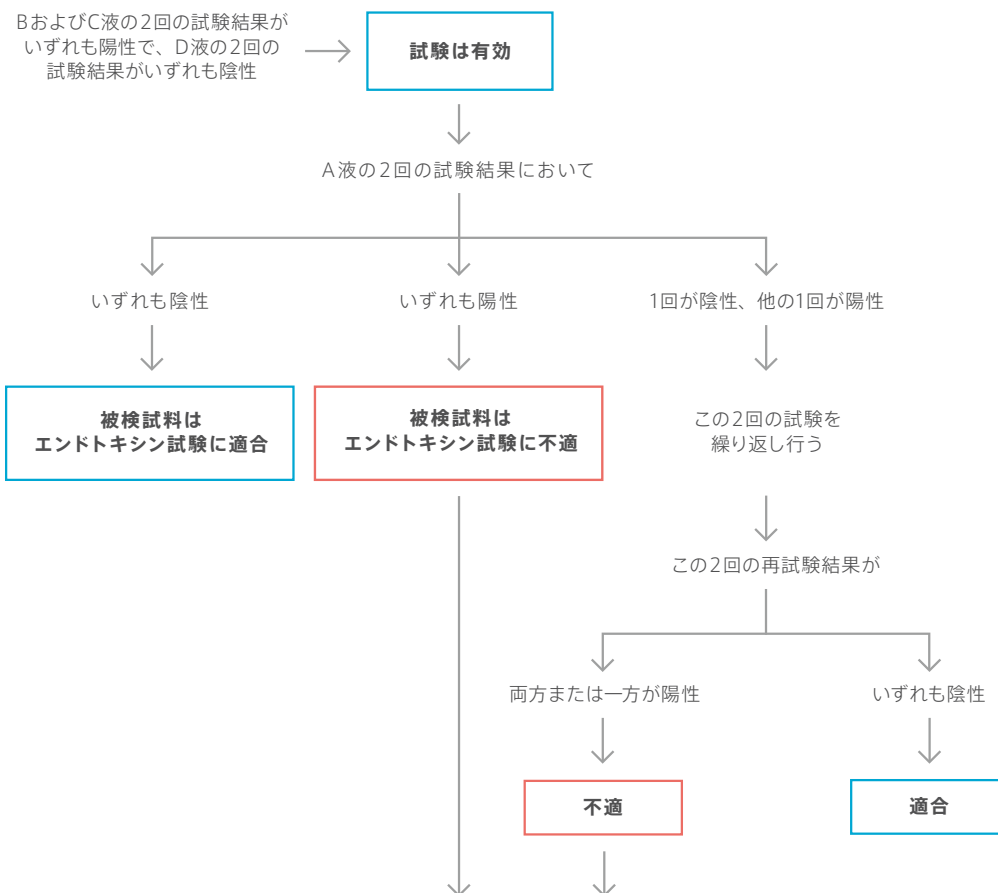
*1 限度試験のための試料溶液。最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈することができる

*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 陽性対照。濃度2 λ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



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、
最大有効希釈倍数また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

■ 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	試験管の本数
A*1	0／試料溶液	エンドトキシン試験用水	1 2 4 8	— — — —	2	8
B*2	2 λ／試料溶液	—	1	2 λ	2	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	8
D*4	0／エンドトキシン試験用水	—	—	—	2	2
						計20本

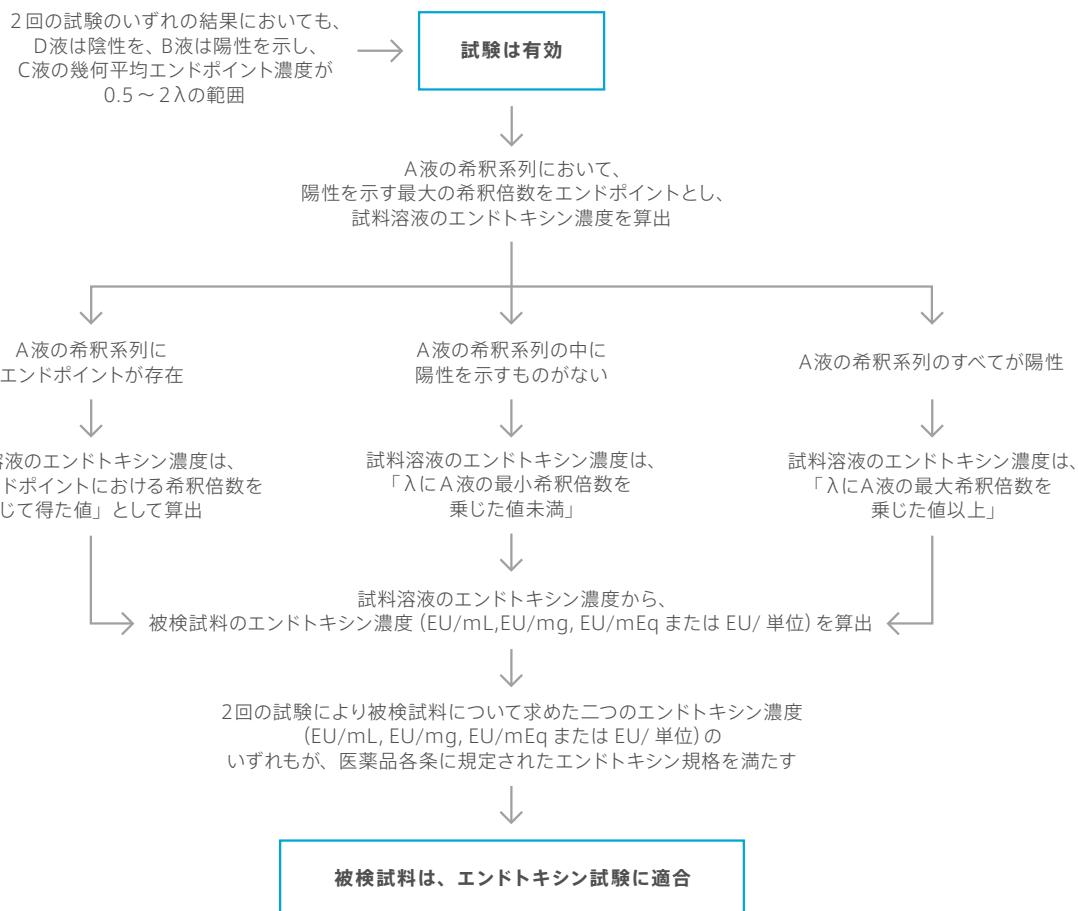
*1 定量試験のための試料溶液。段階希釈倍数は、最大有効希釈倍数を超えない範囲で適宜変更することができる

*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

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/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

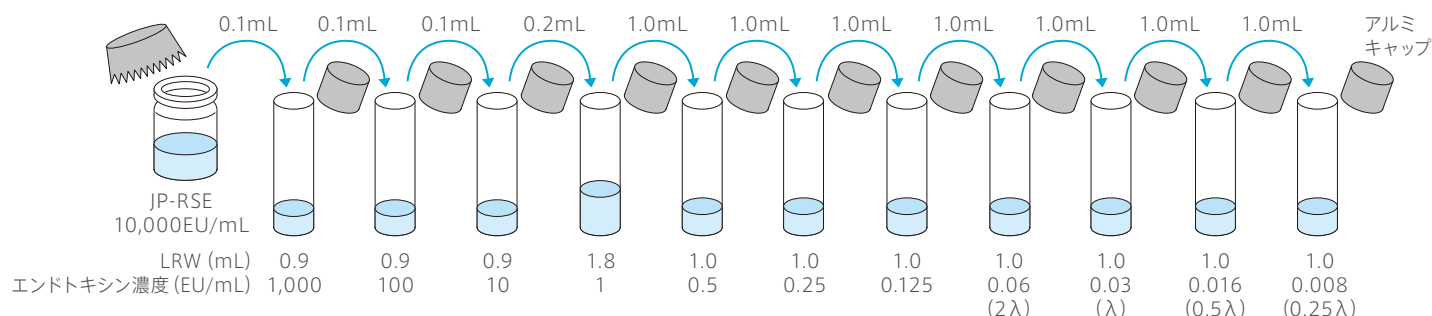
試 薬	- ライセート試薬：パイロテル マルチテスト/シングルテスト - 標準品：日本薬局方エンドトキシン標準品 (以下、JP-RSE) - LAL試験用水 (以下、LRW) - 緩衝液：グルカシールドまたはパイロソル
器 具	- トキシペットサンプラー200、トキシペットサンプラー1000 - 可変式連続分注器「MODEL8100」 (株式会社ニチリョー) - トキシペットチップ200、トキシペットチップ1000 - トキシペットディスペンサー用シリンジ (以下、シリンジ) - 乾熱滅菌試験管 (アルミキャップ付、以下、試験管) - パイロチューブ アルミキャップ付 (パイロテル マルチテスト用：10×75mm、以下、パイロチューブ) - 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
ドライブブロックバス	LAL試験用サーモアルミバスセット

■ 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

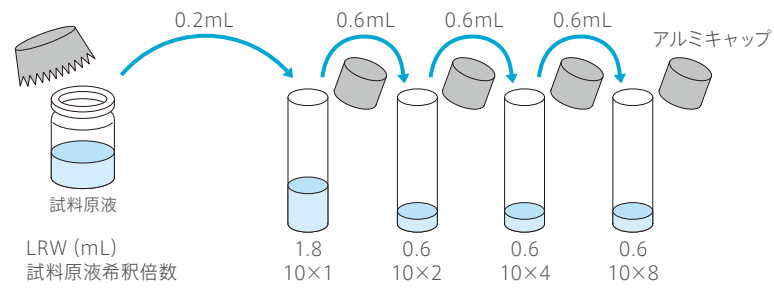
- (1) エンドトキシン標準原液 (10,000EU/mL) (p.3参照) を試験管ミキサーで1分間攪拌する。
- (2) LRWを用いて10倍段階希釈を繰り返し、1.0EU/mLを調製する。
- (3) さらに、下図のように2倍段階希釈を繰り返し、ライセート試薬の表示感度確認試験ならびにC液用のエンドトキシン標準溶液 [0.06 (2λ), 0.03 (1λ), 0.016 (0.5λ), 0.008EU/mL (0.25λ)] を調製する。
・段階希釈では各1分間試験管ミキサーで攪拌してください。



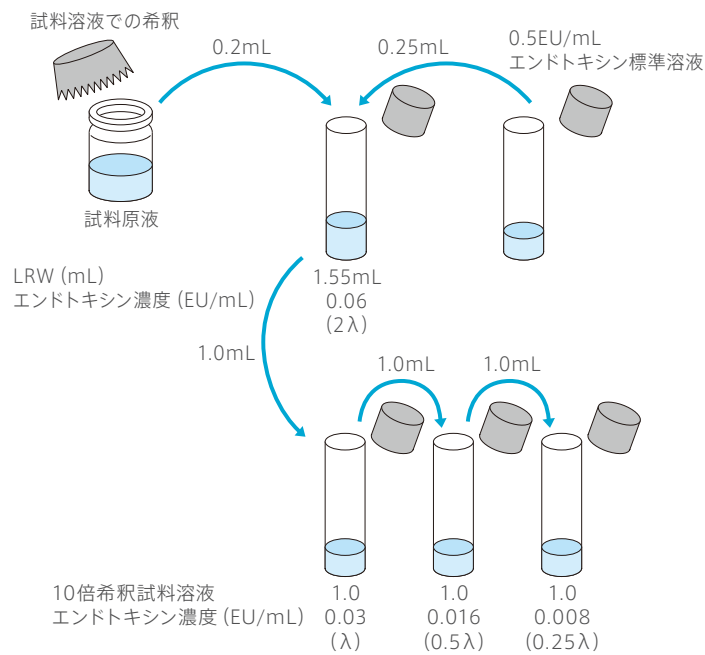
添加量 (mL)	エンドトキシン濃度 (EU/mL)											
	10,000	1,000	100	10	1	0.5	0.25	0.125	0.06 (2λ)	0.03 (1λ)	0.016 (0.5λ)	0.008 (0.25λ)
JP-RSE	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
LRW	0.9	0.9	0.9	0.9	1.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

1-2 その他の試料溶液の調製

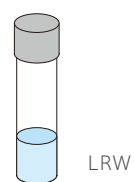
(1) A液の調製



(2) B液の調製



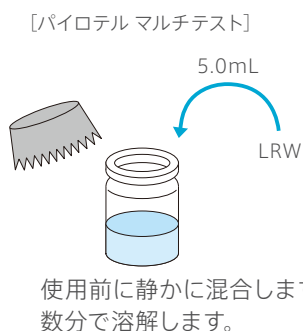
(3) D液の準備



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。

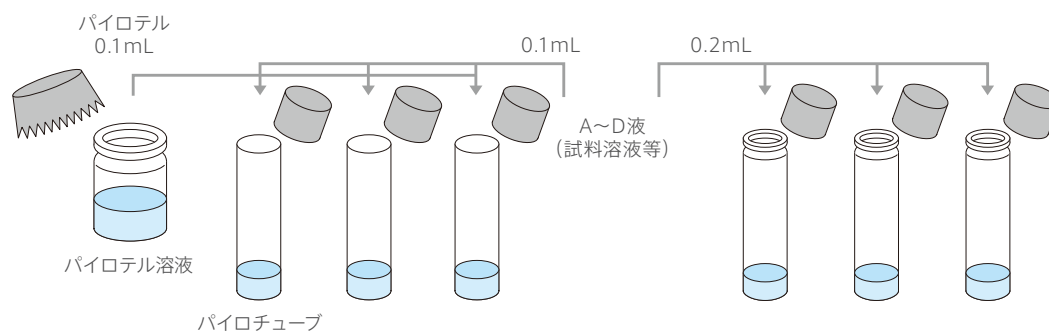


1-4 試料溶液等の添加

(1) 下図に従い、試料溶液等を添加する。

[パイロテル マルチテスト]
A～D液の0.1mLずつをトキシペットチップ200でパイロチューブに分注した後、溶解したパイロテル 0.1mLずつをシリンジ等で添加します。

[パイロテル シングルテスト]
A～D液の0.2mLずつをトキシペットチップ200で添加します。



1-5 加温

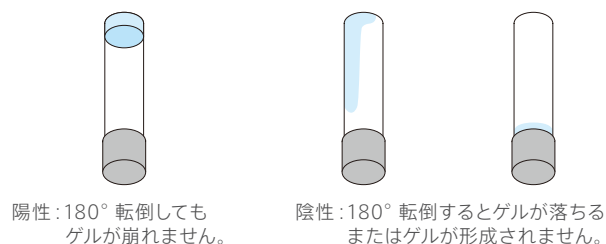
- (1) アルミキャップで蓋をし、試験管ミキサーで1～2秒間攪拌する。
- (2) ドライブロックバスで37 (±1) °C、60 (±2) 分間静置する。
 - ・加温中は振動を与えないように注意してください。

1-6 転倒

- (1) ドライブロックバスより静かに取り出し、180°転倒する。



1-7 判定 (ゲル化法)



付録：第十八改正日本薬局方 一般試験法

4.01 エンドトキシン試験法

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。
三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

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及び光学的变化を指標とする光学の定量法がある。光学の定量法には、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、ゲル化法の限度試験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

試験に用いる全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、マルチウエルプレート及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。試料により、エンドトキシン試験用水以外の水溶液で溶解又は希釈してもよい。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の調整には、酸、塩基、又は適当な緩衝液を用いることができる。酸及び塩基は、高濃度の原液又は固体から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。緩衝液は、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。

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

エンドトキシン規格値：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 の4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、0.1 mL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、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 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 0.25λ のエンドトキシン標準溶液が全て陰性を示すとき、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。

$$\text{幾何平均エンドポイント濃度} = \text{antilog}(\Sigma e / f)$$

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液を調製し、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求める。

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液の試験結果が全て陰性で、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るとき、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0.5～2λ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	2λ／試料溶液	試料溶液	1 2 4 8	2λ 1λ 0.5λ 0.25λ	4
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	1 2 4 8	2λ 1λ 0.5λ 0.25λ	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回の試験を繰り返す。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	2λ／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	2λ 1λ 0.5λ 0.25λ	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。

4.3.2. 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0.5～2λ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液の希釈系列の全てが陽性のとき、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-比濁法とカイネティック-比濁法がある。

エンドポイント-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-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、発色合成基質から遊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-比色法とカイネティック-比色法がある。

エンドポイント-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-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。

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。

本試験は次の全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：第十八改正日本薬局方 参考情報 G4 微生物関連 エンドトキシン試験法と測定試薬に遺伝子組換えタンパク質を用いる代替法 (G4-4-180)

エンドトキシンは、グラム陰性細菌の細胞壁外膜に存在するリポ多糖 (Lipopolysaccharide) であり、様々な生物活性を示す。エンドトキシンは血中に入ると極微量で発熱を惹起し、大量ではエンドトキシンショックから死に至らしめるような強い毒性を発揮する。また、環境中に広く存在しているグラム陰性菌に由来すること、耐熱性を示し容易に失活しないことから、エンドトキシンは医薬品の製造工程などにおいて混入する可能性があり、更に混入の可能性がある発熱性物質の中で特に強力な作用を示すことから、医薬品などの安全性確保のために管理すべき物質として位置づけられている。エンドトキシン試験法〈4.01〉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、エンドトキシンを高感度に検出できる *in vitro* 試験法であり、注射剤などに適用される。一方、カプトガニの保護、試薬の安定供給、試薬ロット間差の低減及び試験の安定性の向上を目的に、ライセート試薬に代わるものとして遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬が開発された。

本参考情報では、エンドトキシン試験法〈4.01〉におけるライセート試薬及び測定方法に加え、遺伝子組換えタンパク質を利用したエンドトキシン測定試薬を用いて代替法とする際の測定及び測定上の留意点を示す。

1. エンドトキシン試験法の測定原理

エンドトキシン試験法〈4.01〉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、エンドトキシンを検出又は定量する方法である。これは、カプトガニの血球抽出成分がエンドトキシンにより凝固する反応を利用した試験法であり、その凝固反応はエンドトキシンにより引き起こされる複数のセリンプロテアーゼによる連鎖反応に基づいている(図1)。エンドトキシンがカプトガニの血球抽出成分に含まれるC因子を活性化して活性型セリンプロテアーゼに変換し、それが次のB因子、更に凝固酵素前駆体を連続的に活性化して、最後に凝固性タンパク質であるコアギュロゲンがコアギュリンに加水分解されると、不溶性のゲルが形成されて凝固する。また、カプトガニの血球抽出成分は、エンドトキシンだけでなく主に(1→3)- β -D-グルカンにも反応し、G因子から始まる連鎖反応により凝固する。

2. エンドトキシン試験法における測定方法

エンドトキシン試験法〈4.01〉には、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变化を指標とする光学の定量法がある(図1)。

ゲル化法は、ゲルの形成の有無を目視で確認する方法であり、判定には特別な機器を必要としない。ゲル化法には限度試験法及び定量試験法があり、前者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を指標として判定

する方法で、後者は被検試料中のエンドトキシン量を、ゲル化反応を示した最大の試料希釈倍数(エンドポイント)を求めることにより定量する方法である。

光学の定量法には、比濁法及び比色法がある(図1)。いずれもライセート試液と試料溶液を混和し、一定時間後又は経時的に反応液を分光光度計で測定する。比濁法は、ライセート試液のゲル化に伴う濁度変化を吸光度又は透過率を用いて測定する方法で、比色法は、エンドトキシンとライセート試液との反応により、発色合成基質から遊離される発色基の量を吸光度又は透過率を用いて測定する方法である。

3. エンドトキシン試験法に用いる試薬

エンドトキシン試験法〈4.01〉に用いるライセート試薬は、各測定法に対応した複数の試薬がある。エンドトキシン及び β -グルカンに対する反応性から試薬を分類すると、C因子から始まる反応系及びG因子から始まる反応系の両方を含む試薬と、G因子を除去、又はG因子系の反応を抑制し、C因子から始まる反応系によりエンドトキシンのみを検出する試薬に分類され、被検試料や試験の目的に応じて選択する。

ゲル化法に用いるライセート試薬には、凝固(ゲルの形成)を呈する最小のエンドトキシン濃度が表示感度(エンドトキシン単位(EU)/mL)として試薬メーカーにより設定されている。その表示感度を指標として被検試料の適否が判定される。正確な試験結果を得るために、エンドトキシン試験法〈4.01〉の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により、表示感度が適切であることを確認する。幾何平均エンドポイント濃度が規定の範囲内でない場合は、試験条件を整備して再試験を行う。再試験においても幾何平均エンドポイント濃度が規定の範囲内でない場合は、そのライセート試薬は使用できない。

光学の定量法に用いるライセート試薬は、比濁法、比色法のいずれにおいても、定量可能な濃度範囲内で3濃度以上の標準溶液により検量線を作成するが、エンドトキシン試験法〈4.01〉の5.3.予備試験 5.3.1. 検量線の信頼性確認試験により、試験者の試験操作及び試験条件が適切であることを確認する。光学の定量法に用いるライセート試薬には、表示感度は表示されていないが、検量線に用いた最小の標準溶液濃度が表示感度に相当する。

医薬品の多くは、エンドトキシン試験において、程度には差はあるが何らかの反応干渉作用を示す。一般に、試料溶液に存在する反応干渉因子の影響は希釈により回避できることが多いが、その場合、エンドトキシン試験用水などで最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈して測定する。最大有効希釈倍数は、許容される試料溶液の最大の有効希釈倍数であり、エンドトキシン試験法〈4.01〉の3.最大有効希釈倍数の求め方に示されている通り、ゲル化法に用いるライセート試薬については表示感度、光学の定量法に用いるライセート試薬については検量線の最小濃度が λ であり、 λ が小さいほど最大有効希釈倍数が大きくなる。光学の定量法に用いるライセート試薬の λ は、ゲル化法に用いるライセート試薬の λ より小さい試薬が多い。被検試料に含まれる反応干渉因子が明確な場合は、それを取り除く処理を行う。取り除くことができない、あるいは反応干渉因子が明確でなく、反応干渉作用が回避できない場合は、他のライセート試薬を用いるか、測定法を変更することを検討する。

4. 遺伝子組換えタンパク質を利用したエンドトキシン測定試薬を用いて代替法とする際の測定及び測定上の留意点

遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬は、カプトガニの血球抽出成分に含まれる因子の遺伝子情報を利用して作製したタンパク質を用いたものである。カプトガニ(例えば *Carcinoscorpius rotundicauda*, *T. tridentatus*) の血球抽出成分に含まれるC因子の遺伝子情報を用いて作製した遺伝子組換えタンパク質を用いる試薬、カプト

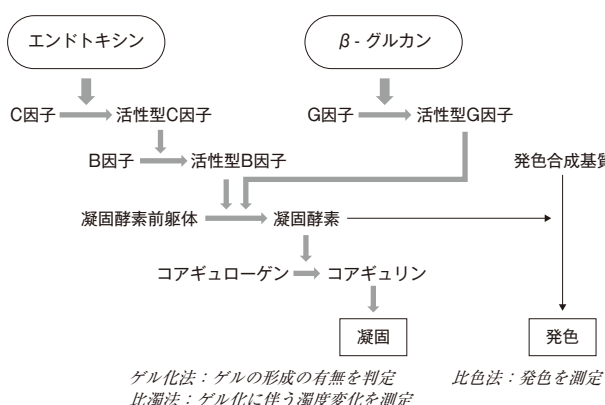


図1 エンドトキシン試験法〈4.01〉における測定原理及び測定法

ガニ(例えば*T.tridentatus*)の血球抽出成分に含まれるC因子、B因子及び凝固酵素前駆体それぞれの遺伝子情報を利用して作製した遺伝子組換えタンパク質を用いる試薬などがある。前者のC因子(遺伝子組換え)を用いた試薬には、エンドトキシンがC因子(遺伝子組換え)を活性化し、活性型C因子(遺伝子組換え)が蛍光合成基質に作用することにより生じる蛍光量を測定するものがある。後者の三種類の遺伝子組換えタンパク質で構成される試薬には、比色法の測定法と同様に、エンドトキシンがC因子(遺伝子組換え)を活性化し、それがB因子(遺伝子組換え)、更に凝固酵素前駆体(遺伝子組換え)の連続的な活性化により、発色合成基質から遊離される発色基の量を測定するものがある。いずれの試薬も、試液と試料溶液を混和し、一定時間後又は経時的に反応液を光学的に測定する方法で、蛍光強度又は吸光度を測定する。

遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬は、エンドトキシン試験法〈4.01〉で規定されている「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」には該当しない。エンドトキシン測定試薬を用いて代替法とする際は、ライセート試薬を用いたエンドトキシン試験法〈4.01〉と比較して、同等以上の真度、精度、感度、特異性などが得られることを確認する。遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬のうち、感度、特異性などがライセート試薬を用いた方法と同等以上であることが報告されているものがある。医薬品などのエンドトキシン試験法〈4.01〉を遺伝子組換えタンパク質試薬を用いて行う際は、エンドトキシン試験法〈4.01〉の光学的定量法と同様に、5.3. 予備試験 5.3.1. 検量線の信頼性確認試験も実施する必要がある。その場合、検量線の最小濃度が λ (EU/mL)に相当する。また、反応干渉作用について留意する必要がある。5.3.2. 反応干渉因子試験も実施する。蛍光量を測定するなど、エンドトキシン試験法〈4.01〉では用いられていない測定法を利用する場合、蛍光の発生を阻害するといった、ライセート試薬での測定では影響のなかった物質が干渉作用を示す可能性についても留意する必要がある。また、エンドトキシン試験法〈4.01〉で規定されているカプトガニ(*L.polyphemus*又は*T.tridentatus*)と異なるカプトガニのタンパク質の遺伝子情報を用いて作製した試薬については、そのタンパク質(遺伝子組換え)の違いがエンドトキシンに対する反応性に影響を及ぼす可能性について留意すべきである。

付録：第十八改正日本薬局方 参考情報 G4 微生物関連
エンドトキシン規格値の設定 〈G4-5-131〉

注射剤のエンドトキシン規格値は、下記の方法に従って設定される。

エンドトキシン規格値 = $\frac{K}{M}$

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、次の表のように設定される。

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

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。 M の単位は、投与量が製剤の容量に基づく場合はmL/kg、主薬の質量に基づく場合はmg/kg又はmEq/kg、主薬の生物学的単位に基づく場合は単位/kgで表す。

備考

- 1) 質量又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。
- 2) 成人の体重1kg当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60 kgを用いる。
- 3) 体重1kg当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。
- 4) 上記の表に示した投与経路区分以外の経路で投与される医薬品等の K 値は、静脈内投与の K 値を準用する。

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 (未満)	一 般 名 称	規格値 (未満)
アシクロビル注射液	0.5 EU/mg	エフェドリン塩酸塩注射液	7.5 EU/mg
注射用アシクロビル	0.25 EU/mg	エルゴメトリンマレイン酸塩注射液	1500 EU/mg
アスコルビン酸注射液	0.15 EU/mg	塩化カルシウム注射液	0.30 EU/mg
注射用アズトレオナム	0.10 EU/mg (力価)	10%塩化ナトリウム注射液	3.6 EU/mL
アトロピン硫酸塩注射液	75 EU/mg	オキシトシン注射液	10 EU/単位
アミカシン硫酸塩注射液	0.50 EU/mg (力価)	オザグレルナトリウム注射液	3.7 EU/mg
注射用アミカシン硫酸塩	0.50 EU/mg (力価)	注射用オザグレルナトリウム	3.7 EU/mg
アミノフィリン注射液	0.6 EU/mg	果糖注射液	0.5 EU/mL
注射用アムホテリシンB	3.0 EU/mg (力価)	カルボプラチン注射液	0.2 EU/mg
L-アルギニン塩酸塩注射液	0.50 EU/mL	キシリトール注射液	0.50 EU/mL
アルプロスタジル注射液	10 EU/mL	輸血用クエン酸ナトリウム注射液	5.6 EU/mL
アルベカシン硫酸塩注射液	0.50 EU/mg (力価)	クリンダマイシンリン酸エステル注射液	0.1 EU/mg (力価)
アレンドロン酸ナトリウム注射液	119 EU/mg	クロルフェニラミンマレイン酸塩注射液	8.8 EU/mg
注射用アンピシリンナトリウム	0.075 EU/mg (力価)	ゲンタマイシン硫酸塩注射液	0.50 EU/mg(力価)
注射用アンピシリンナトリウム・スルバクタムナトリウム	0.10 EU/mg (力価)	シアノコバラミン注射液	0.30 EU/μg
イオタラム酸ナトリウム注射液	3.4 EU/mL	ジゴキシン注射液	200 EU/mg
イオパミドール注射液	1.5 EU/mL	注射用シベレスタットナトリウム	25 EU/mg
イオヘキソール注射液	0.47 EU/mL	ジモルホラミン注射液*2	5.0 EU/mg
イセパマイシン硫酸塩注射液	0.50 EU/mg (力価)	注射用水	0.25 EU/mL
イソニアジド注射液	0.50 EU/mg	注射用水 (容器入り)	0.25 EU/mL
注射用イダルビシン塩酸塩	8.9 EU/mg (力価)	スキサメトニウム塩化物注射液	2.0 EU/mg
注射用イミペナム・シラスタチンナトリウム	0.25 EU/mg (力価)	注射用スキサメトニウム塩化物	1.5 EU/mg
イリノテカン塩酸塩注射液	1.8 EU/mg	注射用ストレプトマイシン硫酸塩	0.10 EU/mg (力価)
インジゴカルミン注射液	7.5 EU/mg	ヒト下垂体性性腺刺激ホルモン*3	0.66 EU/単位
インスリン ヒト (遺伝子組換え)	10 EU/mg	ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン	0.03 EU/単位
インスリン ヒト (遺伝子組換え) 注射液*1	0.80 EU/ インスリン単位	注射用ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン	0.03 EU/単位
インスリン グラルギン (遺伝子組換え)	10 EU/mg	生理食塩液	0.50 EU/mL
インターフェロン アルファ (NAMALWA) 注射液	0.25 EU/60万単位	セファゾリンナトリウム水和物	0.10 EU/mg (力価)
エダラボン注射液	5.0 EU/mg	注射用セファゾリンナトリウム	0.05 EU/mg (力価)
エドロホニウム塩化物注射液	15 EU/mg	注射用セファロチンナトリウム	0.2 EU/mg (力価)

一 般 名 称	規 格 値 (未 満)	一 般 名 称	規 格 値 (未 満)
セフェピム塩酸塩水和物	0.04 EU/mg (力価)	注射用ドリベネム	0.25 EU/mg (力価)
注射用セフェピム塩酸塩	0.06 EU/mg (力価)	ナルトグラスチム (遺伝子組換え)	0.62 EU/μg
セフォゾプラン塩酸塩	0.05 EU/mg (力価)	注射用ナルトグラスチム (遺伝子組換え)	0.62 EU/μg
注射用セフォゾプラン塩酸塩	0.05 EU/mg (力価)	ニカルジピン塩酸塩注射液	8.33 EU/mg
注射用セフォチアム塩酸塩	0.125 EU/mg (力価)	ニコチン酸注射液	3.0 EU/mg
注射用セフォペラゾンナトリウム	0.05 EU/mg (力価)	L-乳酸ナトリウムリンゲル液	0.25 EU/mL
注射用セフォペラゾンナトリウム・スルバクタムナトリウム	0.060 EU/mg (力価)	ネオスチグミンメチル硫酸塩注射液	5 EU/mg
注射用セフトジジム	0.067 EU/mg (力価)	ノルアドレナリン注射液	300 EU/mg
セフピロム硫酸塩	0.10 EU/mg (力価)	精製白糖*5	0.25 EU/mg
注射用セフメタゾールナトリウム	0.06 EU/mg (力価)	バズフロキサシンメシル酸塩注射液	0.30 EU/mg
セルモロイキン (遺伝子組換え)	100 EU/mL	バソプレシン注射液	15 EU/単位
タゾバクタム	0.04 EU/mg (力価)	注射用パニベネム・ベタミプロン	0.15 EU/mg (力価)
注射用タゾバクタム・ピペラシリン水和物 1mg (力価)*4	0.07 EU/ピペラシリン水和物 1mg (力価)*4	パバペリン塩酸塩注射液	6.0 EU/mg
炭酸水素ナトリウム注射液	5.0 EU/mEq	ハロペリドール注射液	60 EU/mg
注射用チアミールナトリウム	1.0 EU/mg	注射用バンコマイシン塩酸塩	0.25 EU/mg (力価)
チアミン塩化物塩酸塩注射液	6.0 EU/mg	精製ヒアルロン酸ナトリウム注射液	0.003 EU/mg
注射用チオペンタールナトリウム	0.30 EU/mg	注射用ヒドララジン塩酸塩	5.0 EU/mg
チオ硫酸ナトリウム注射液	0.01 EU/mg	ピペラシリン水和物	0.07 EU/mg (力価)
デキストラン40	2.5 EU/g	注射用ピペラシリンナトリウム	0.04 EU/mg (力価)
デキストラン40注射液	0.50 EU/mL	ピリドキシン塩酸塩注射液	3.0 EU/mg
デスラノシド注射液	500 EU/mg	注射用ビンブラスチン硫酸塩	10 EU/mg
テセロイキン (遺伝子組換え)	5 EU/ タンパク質1mg	ファモチジン注射液	15 EU/mg
注射用テセロイキン (遺伝子組換え)	5 EU/35万単位	注射用ファモチジン	15 EU/mg
デヒドロコール酸注射液	0.30 EU/mg	フィルグラスチム (遺伝子組換え)	0.25 EU/mL
注射用ドキシソルピシン塩酸塩	2.50 EU/mg (力価)	フィルグラスチム (遺伝子組換え) 注射液	0.25 EU/mL
ドセタキセル注射液	2.5 EU/mg	フェノールスルホンフタレイン注射液	7.5 EU/mg
注射用ドセタキセル	2.5 EU/mg	ブドウ糖注射液	0.50 EU/mL
ドバミン塩酸塩注射液	4.2 EU/mg	フルコナゾール注射液	0.75 EU/mg
トブラマイシン注射液	0.50 EU/mg (力価)	注射用プレドニゾンコハク酸エステルナトリウム	2.4 EU/プレドニゾン 1mg対応量*6
トラネキサム酸注射液	0.12 EU/mg	プロカイン塩酸塩注射液*7	0.02 EU/mg

一 般 名 称	規格値（未満）
プロカインアミド塩酸塩注射液	0.30 EU/mg
フロセミド注射液	1.25 EU/mg
プロタミン硫酸塩注射液	6.0 EU/mg
注射用フロモキセフナトリウム	0.025 EU/mg（力価）
ペチジン塩酸塩注射液	6.0 EU/mg
ヘパリンカルシウム	0.0030 EU/ ヘパリン単位
ヘパリンナトリウム	0.0030 EU/ ヘパリン単位
ヘパリンナトリウム注射液	0.0030 EU/単位
透析用ヘパリンナトリウム液	0.0030 EU/単位
ロック用ヘパリンナトリウム液	0.0030 EU/単位
注射用ペプロマイシン硫酸塩	1.5 EU/mg（力価）
ペラパミル塩酸塩注射液	12 EU/mg
注射用ベンジルペニシリンカリウム	1.25×10^{-4} EU/単位
注射用ホスホマイシンナトリウム	0.025 EU/mg（力価）
注射用ポリコナゾール	1.5 EU/mg
注射用マイトマイシンC	10 EU/mg（力価）
D-マンニトール注射液	0.50 EU/mL
注射用ミノサイクリン塩酸塩	1.25 EU/mg（力価）
注射用メトトレキサート	0.1 EU/mg
メビバカイン塩酸塩注射液	0.6 EU/mg
注射用メロペネム	0.12 EU/mg（力価）
モルヒネ塩酸塩注射液	1.5 EU/mg
リドカイン注射液	1.0 EU/mg
リトドリン塩酸塩注射液	25 EU/mg
リボフラビンリン酸エステルナトリウム注射液	10 EU/mg
硫酸マグネシウム注射液	0.09 EU/mg
リングエル液	0.50 EU/mL
リンコマイシン塩酸塩注射液	0.50 EU/mg（力価）
レパロルファン酒石酸塩注射液	150 EU/mg
レボフロキサシン注射液	0.60 EU/mg

一 般 名 称	規格値（未満）
注射用ロキサチジン酢酸エステル塩酸塩	4.0 EU/mg

太字は第十八改正日本薬局方において、エンドトキシン規格値が新たに設定された医薬品

*1 ただし、静脈内に投与する製品に適用する。

*2 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。

*3 本品をエンドトキシン試験用水 1 mL 当たり 75 卵胞刺激ホルモン単位を溶かし、試験を行うとき、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。

*4 「ピペラシリン水和物」1mg（力価）当たり 0.07 EU 未満。

*5 ただし、輸液の調製に用いるもの。

*6 プレドニゾロン ($C_{21}H_{28}O_5$) 1mg 対応量当たり 2.4 EU 未満。

*7 ただし、脊髄腔内に投与する製品に適用する。

製品一覧

コード	品名	包装
LAL試薬		
比色法		
010265	パイロクロム	5×60回
020130	トキシカラーLS-50Mセット	1セット
020150	エンドスペシーES-50Mセット	1セット
020170	エンドスペシーES-24Sセット	1セット
比濁法		
010250	パイロテル-T	5本
ゲル化法		
010210	パイロテル マルチテスト(0.03EU/mL)	5本
010215	パイロテル マルチテスト(0.06EU/mL)	5本
010220	パイロテル マルチテスト(0.125EU/mL)	5本
010230	パイロテル シングルテスト(0.03EU/mL)	5×10本
010240	パイロテル シングルテスト(0.125EU/mL)	5×10本
010245	パイロテル シングルテスト(0.25EU/mL)	5×10本
組換えエンドトキシン測定試薬		
030265	PyroSmart NextGen (パイロスマート ネクストジェン)	2×50回
LAL関連試薬		
エンドトキシン標準品		
010020	コントロールスタンダードエンドトキシン (E.coli O113, 10ng/vial, パイロクロム用)	5本
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
010023	USP リファレンス スタンダードエンドトキシン	1本
その他関連試薬		
010045	パイロカラー ジアゾ試薬 DIA60-STV	1セット
010145	パイロカラー ジアゾ試薬 DIA150-MP	1セット
010270	パイロソル pHインジケータ入り(5.5mL/vial)	5本
010271	パイロソル pHインジケータなし(5.5mL/vial)	5本
010290	LAL試験用水(LRW)	10本
010291	グルカシールド (β-グルカン阻害緩衝液)	5本
その他関連試薬		
010310	グルカテル	1セット
測定装置		
測定装置本体		
900600	ウェルリーダーアドバンス	1セット
900630	EGリーダー SV-12	1セット
900640	ウェルリーダー-SK603	1セット
900681	エンドトキシン自動測定システム ENDOMEASURE	一式
ソフトウェア		
900608	ウェルリーダー標準ソフト	1セット
900609	EGリーダーSV-12標準ソフト	1セット
900617	Software for Wellreader用 平行線定量法 機能拡張ソフト	1セット
900618	ウェルリーダーアドバンス透析用ソフト	1セット
900619	EGリーダーSV-12透析用ソフト	1セット

コード	品名	包装
900662	Software for Wellreader, DIエディション	1セット
900664	Software for Wellreader用 平行線定量法拡張ソフト, Software for Wellreader, DIエディションセット	1セット
機器関連製品		
900626	ウェルリーダーアドバンス光源ランプ	1個
900636	SV-12光源ランプ	1個
900637	吸光度校正用NDフィルター	1セット
900641	フィルター450nm	1枚
900642	フィルター570nm	1枚
900643	フィルター660nm	1枚
900644	キャリブレーションプレート (OCP2014型)	1セット
900645	キャリブレーションプレート (OCP2000型)	1セット
900649	IQ/OQ作業料金 (手順書付き)	一式
900651	フィルター405nm	1枚
900652	フィルター492nm	1枚
900653	フィルター545nm	1枚
900654	フィルター630nm	1枚
900656	SK603/MP-96光源ランプ	1個
校正点検		
900639	NDフィルター校正点検	1波長
900646	追加トレーサビリティ証明 (干渉フィルタ追加1波長分)	1波長
900647	キャリブレーションプレート校正点検	1セット
900665	EGリーダーSV-12 校正点検	1セット
900666	ウェルリーダー受入検査	1セット
900668	ウェルリーダー校正点検	1セット
900679	校正点検後OQサービス	1セット
その他関連機器		
900501	LAL試験用サーモアルミバスセット (パイロチューブ用, φ10.5mmX45mm)	1セット
900502	LAL試験用サーモアルミバスセット (パイロテルシングルテスト用, φ12.0mmX45mm)	1セット
900675	試験管ミキサーTM-251	1台
測定用器具		
消耗品		
800798	乾熱滅菌試験管アルミキャップ付 (11.6X65mm)	100本
800802	乾熱滅菌スピッツ管アルミキャップ付 (12X75mm)	80本
800804	乾熱滅菌アルミ箔	10枚X10
800807	乾熱滅菌アルミキャップ	20個X5
800810	パイロチューブアルミキャップ付(パイロテル用)	50本
800811	パイロチューブ(希釈用)	90本
800820	イージーチューブII (EGチューブII) EGチューブ(S)	50本
800821	イージーチューブII (EGチューブII) EGチューブ(P)	50本
800826	HDチューブ	50本
900520	トキシペット ディスペンサー用シリンジ(3mL) (エンドトキシン,β-グルカンフリー)	50本
900540	トキシペット チップ 200	500本
900545	トキシペット チップ 1000	100本

コード	品名	包装
900560	トキシベット プレート 96F	50枚
900570	トキシベット プレート LP	50枚
器具		
900516	トキシベット サンプラー 200(20-200μL)	1個
900517	トキシベット サンプラー 1000(100-1000μL)	1個

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 ACC/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/>