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)(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。
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：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 ・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	・マイクロプレートリーダーEPOCH2
ソフトウェア	・ENDOMEASUREソフトウェア, Type-M

■ マイクロプレートリーダーEPOCH2を用いたカイネティック比色法(反応時間法):設定条件

■ 予備試験

1 検量線の信頼性確認試験

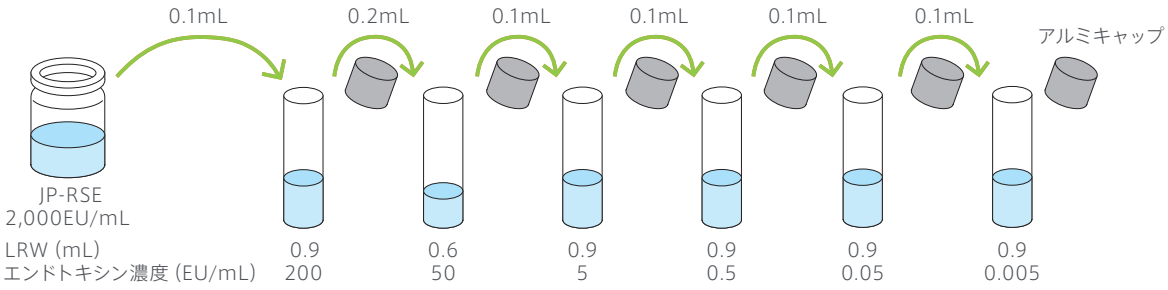
1-1 エンドトキシン標準溶液の調製

(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倍希釈を1回行い、200EU/mLを調製後、4倍希釈し、50EU/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。



添加量 (mL)	エンドトキシン濃度 (EU/mL)						
	2,000	200	50	5	0.5	0.05	0.005
JP-RSE		0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
LRW		0.9	0.6	0.9	0.9	0.9	0.9

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 (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 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。

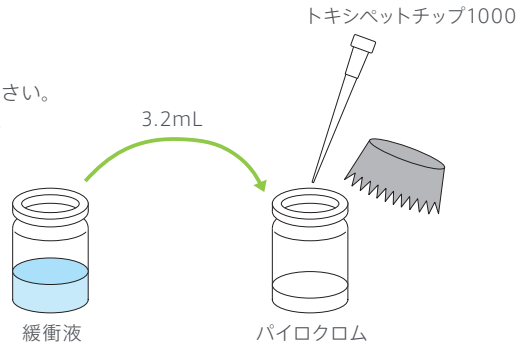
・試料の分注後、ただちにプレートに蓋をかぶせてください。

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～St5 : エンドトキシン標準溶液

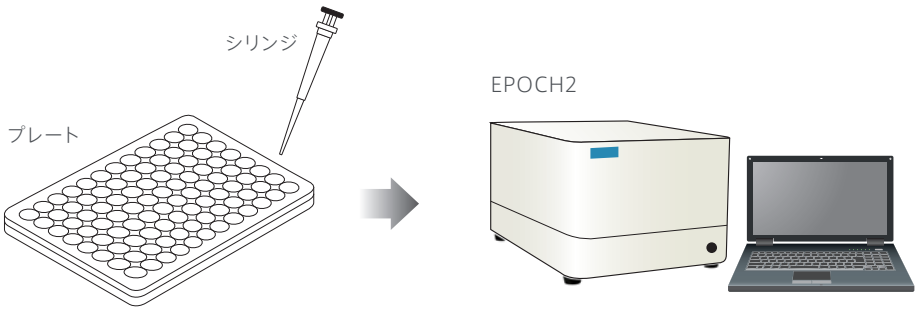
1-3 ライセート試液の調製

(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をトキシペットチップ1000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、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。



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。
・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。

1-6 判定

(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、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

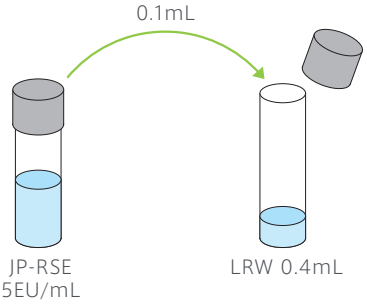
例 : 10倍希釈試料溶液を測定に用いる場合は、試料原液を5倍希釈します。
(1) エンドスペシーES-50Mセットを用いたカイネティック比色法（反応速度法）: 2-2 2倍濃度試料溶液の調製 (別冊参照) に従い、2倍濃度試料溶液を調製する。

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（1EU/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分間撹拌後、0.1mLを（1）の試験管に加え、1分間撹拌する。



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：50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 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分間撹拌する。

・調製後のエンドトキシン標準溶液は使用直前に10秒間撹拌してください。

・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～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 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、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 ー 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。

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。

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し、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。

(4) 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。

(5) 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。

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。

・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。

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。

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）