

院内製造 PET 薬剤のための簡便なエンドキシン試験法  
(エンドキシン簡便法)

改訂履歴

登録・発行 年月日	文書番号 (改訂番号)	改訂内容	改訂理由
2015年2月18日	2015/2/18 版		
2019年8月20日	2019/8/20 版	メーカー名の変更と 使用機材の追加	メーカー名称が変更 となった。また使用機 材として ET-7000 が 追加された。
2024年 4月26日	2024/4/26 版	誤記修正  使用機材の追加  陰性コントロールの測 定数をn=1からn=2 に変更した  日本薬局方エンド キシン標準品の使用 も可能とした  リムルス ES-II プラス CS シングルテストワ コを使用する場合の 注意事項を追記し た。	誤記があったため  使用機材としてET- miniが追加された。  陰性コントロールの測 定数を日本薬局方 試験法の記載と合わ せるため  日本薬局方エンド キシン標準品の使用 も可能とするため  リムルス ES-II プラス CS シングルテストワ コを使用可能とした ため。

## 目次

表紙.....	1
改訂履歴.....	2
目次.....	3
院内製造 PET 薬剤のための簡便なエンドキシシン試験法(エンドキシシン簡便法).....	4
<使用機材>.....	4
<b>1.保存検量線作成</b> .....	<b>4</b>
1.1. エンドキシシン標準品溶解.....	4
1.2. エンドキシシン標準溶液の希釈.....	5
1.3. トキシノメーターによる測定.....	6
1.4. 検量線データの有効性確認.....	6
1.5. 保存検量線の作成と有効性評価.....	6
<b>2.予備検討(新規薬剤などで反応干渉因子の有無が不明の時に実施)</b> .....	<b>7</b>
2.1. 陽性コントロール(PC)の調製.....	7
2.2. 陽性薬剤コントロール(PPC)の調製.....	7
2.3. トキシノメーターによる測定.....	7
2.4. データの解析と判定.....	7
<b>3.日常測定</b> .....	<b>7</b>
3.1 トキシノメーターの準備.....	8
3.2 リムルス ES- II シングルテストワコーのライセート試薬準備.....	8
3.3 エンドキシシン標準溶液の希釈.....	8
3.4 陽性コントロール(PC)の調製.....	8
3.5 陽性製品コントロール(PPC)の調製.....	8
3.6 トキシノメーターによる測定.....	9
3.7 データの解析と判定.....	9

## 院内製造 PET 薬剤のための簡便なエンドキシン試験法(エンドキシン簡便法)

本標準操作手順書は、エンドキシン簡便法の保存検量線作成手順及び、保存検量線を用いた日常測定について記載したものである。

なお、リムルス ES-II プラス CS シングルテストワコーを使用する場合、メーカーの示す使用方法に従って実施すること。ただし、試験成立の判定基準については、この文書の 3.7.1、3.7.2 を満たす場合に試験成立とする。

### <使用機材>

- トキシノメーターET-7000、ET-mini(3. 日常測定のみで使用できる)、ET-6000、ET-5000  
又は ET-2000 (すべて富士フィルム和光純薬)
- タッチミキサー(富士フィルム和光純薬)又は同等品(ボルテックス等)
- マイクロピペット 100-1000  $\mu$ L 注1)  
Finnpipette F2 #4642090(Thermo SCIENTIFIC)又は同等品、1本
- マイクロピペット 20-200  $\mu$ L 注1)  
Finnpipette F2 #4642080(Thermo SCIENTIFIC)又は同等品、1本
- バイオクリーンチップワコー1000 II #298-35031(富士フィルム和光純薬)
- バイオクリーンチップワコーエクステンドS II #294-35011(富士フィルム和光純薬)
- リムルス ES- II シングルテストワコー #295-51301(富士フィルム和光純薬)
- リムルステストチューブ-S(アルミキャップ付) #292-32751(富士フィルム和光純薬)
- アルミキャップ-S #293-28251(富士フィルム和光純薬)
- 大塚蒸留水 20 mL アンブル(大塚製薬工場)(以下、試験用水として使用)
- パラフィルム

注1) バイオクリーンチップに合わないピペットがあるので、適したピペットを使用すること。

バイオクリーンチップワコーエクステンドS IIは、汎用20-200  $\mu$ L用チップよりも長くなっている。  
汎用チップの場合、リムルステストチューブの底まで届かないことがあり、無理にチューブを斜めに  
にして操作した場合、測定結果に影響することがある。

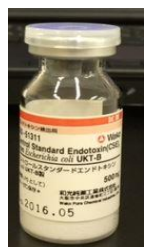
## 1. 保存検量線作成

保存検量線はリムルスES- II シングルテストワコーのライセート試薬のロットごとに作成する。以下の  
サンプルを3日間測定し、全点を使用して直線回帰式と相関係数を求める。

- エンドキシン濃度: 1、0.1、0.01 EU/mL(3 濃度、n=2)
- 陰性コントロール: 試験用水(n=2)

### 1.1. エンドキシン標準品溶解

リムルスES- II シングルテストワコーに付属しているCSEのゴム栓をゆっくりはずす。CSEの  
表示含量を参照して終濃度が1000 EU/mLとなるように、試験用水を加え、再びゴム栓をして



数回転倒攪拌した後、タッチミキサー（ボルテックス）で2分間激しく攪拌する（CSE溶液）。 溶解後はパラフィルムを巻き2-10℃で冷蔵保存する。溶解後の使用期限は1カ月である。日本薬局方エンドキシン標準品を使用する場合、攪拌方法や保存方法などは当該添付文書の使用方法に従う。

## 1.2. エンドキシン標準溶液の希釈

下記の表1、図1に従いリムルテストチューブ-Sに順次希釈する。日本薬局方エンドキシン標準品を使用する場合も同様に、1、0.1、0.01EU/mLの目的濃度まで希釈する。

希釈は室温（10-30℃）で行う。

表 1. エンドキシン標準溶液の調製

エンドキシン溶液濃度 (EU/mL)	溶液量 (μL)	試験用水 (μL)	目的濃度 (EU/mL)
1000 (CSE 溶液)	100	900	100
100	100	900	10
10	100	900	1
1	100	900	0.1
0.1	100	900	0.01

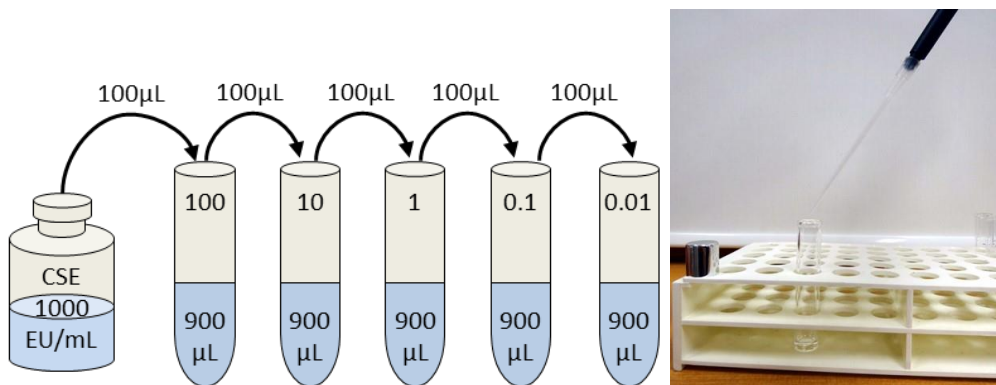


図 1. エンドキシン標準溶液の希釈

1.2.1 リムルテストチューブ-S を試験管立てに 6 本並べ、目的濃度をマジックインキ等で記す。

1.2.2 1 本は陰性コントロール用とする。

1.2.3 各チューブに試験用水を 1000 μL 用ピペットで 900 μL ずつ分注する。

1.1で調製したCSE溶液（1000 EU/mL）を室温に戻し、タッチミキサー（ボルテックス）で1分間激しく攪拌する。続いて100 μLを2回洗い込みしてから測り取り、「100 EU/mL」のチューブに加える。払い出し時のピペット押し出し操作は1回とする。使用したチップは廃棄する。日本薬局方エンドキシン標準品を使用する場合も同様である。



- 1.2.4 アルミキャップをしてタッチミキサー(ボルテックス)で 30 秒間攪拌する。この時内容液をアルミキャップに接触させないこと。
- 1.2.5 新しいピペットチップを取り付け、100  $\mu$ L を 2 回洗い込みしてから測り取り、同様に「0.01 EU/mL」濃度まで希釈する。チップは、毎回必ず交換すること。  
希釈したエンドキシン溶液は、使用まで室温保存する。使用期限は当日限りとする。

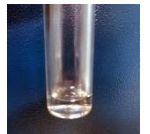
### 1.3. トキシノメーターによる測定

測定開始の20分以上前に機器の電源を入れておく。使用する前に所定の温度に達していることをトキシノメーターのモニターにて確認すること。測定時間は60分に設定する。トキシノメーター操作法に従い、以下測定を実施する。

- 1.3.1 リムルス ES- II シングルテストワコーのライセート試薬を 8 本冷蔵庫から取り出して室温に戻す(20 分程度)。アルミ栓ならびにゴム栓を専用器具で静かに取り外し、アルミキャップをかぶせておく。



- 1.3.2 バイオクリーンチップワコーエクステンド S II を使用して試験用水 200  $\mu$ L を 2 回洗い込みしてから測り取り、ライセート試薬に加える(この操作は約 2 秒で行う)。  
ただちにタッチミキサー(ボルテックス)を使用し約 5 秒間攪拌し(泡がないことを確認)、一連の操作開始から計約 10 秒後にトキシノメーターにセットし、ゲル化時間の測定を開始する。



- 1.3.3 1.2 で希釈したエンドキシン溶液のうち、0.01 EU/mL ~ 1 EU/mL を 20 秒攪拌した後、バイオクリーンチップワコーエクステンド S II を使用して 200  $\mu$ L を 2 回洗い込みしてから測り取り、ライセート試薬に加え、1.3.2 と同様にしてトキシノメーターで各濃度を n=2 で測定する。

### 1.4 検量線データの有効性確認

トキシノメーター付属のデータ解析ソフト、トキシマスターQCを利用して、X軸にlogエンドキシン濃度、Y軸にloglogゲル化時間をプロットした検量線の回帰式と相関係数を求める。

各測定日の検量線の相関係数の絶対値が 0.980 以上で、陰性コントロールが 60 分以内にゲル化判定されないとき、1.5 で使用できるものとする。

### 1.5. 保存検量線の作成と有効性評価

1.4にて3日間の検量線データが有効になった時、3日間の測定点の全点を使用して、X軸にlogエンドキシン濃度、Y軸にloglogゲル化時間をプロットした検量線の回帰式と相関係数を求める。この時の相関係数の絶対値が0.980以上であれば、求めた検量線は保存検量線として使用できる。

## 2. 予備検討(新規薬剤などで反応干渉因子の有無が不明の時に実施)

以下のサンプルを測定し、あらかじめPET薬剤に反応干渉因子がないことを確認する。

新規な PET 薬剤については、3 ロットの薬剤で確認することが望ましい。

- 陽性コントロール(PC:2.1 参照)n=2
- 陽性薬剤コントロール(PPC:2.2 参照)n=2
- 薬剤溶液 n=2

### 2.1. 陽性コントロール(PC)の調製

CSE 溶液 1000 EU/mL を 1. 保存検量線作成 1.2 エンドキシン標準溶液の希釈に記載の方法で 0.1 EU/mL まで希釈する。日本薬局方エンドキシン標準品を使用する場合も同様に目的濃度まで希釈する。

### 2.2. 陽性薬剤コントロール(PPC)の調製

2.1 で作成した CSE 溶液の希釈系列 1 EU/mL を 50  $\mu$ L と薬剤溶液 450  $\mu$ L<sup>注2)</sup>を混合し、薬剤溶液に CSE の終濃度が 0.1 EU/mL となるようにエンドキシンを添加する。

日本薬局方エンドキシン標準品を使用する場合も同様に行う。



### 2.3. トキシノメーターによる測定

1. 保存検量線作成の 1.3 と同様にして PC、PPC、薬剤溶液をトキシノメーターで測定する。

### 2.4. データの解析と判定

保存検量線を用いて、PC、PPC、薬剤溶液のエンドキシン濃度を求める。PC のエンドキシン濃度が 0.075 EU/mL 以上 0.133 EU/mL 以下であれば試験は有効となる。

PPC のエンドキシン濃度から薬剤のエンドキシン濃度を差し引いた値が 0.05 EU/mL 以上 0.2 EU/mL 以下であれば、薬剤溶液に反応干渉因子はない(真値の 50-200%の範囲)。

反応干渉が見られた場合は、薬剤溶液を 10 倍希釈するなどして、反応干渉が観察されない希釈倍率を求める(最大有効希釈倍数まで希釈可)。ただし、薬剤溶液の希釈倍数を大きくするほど、エンドキシン規格値を検出するための時間が長くなることに注意する。

注2)PET薬剤溶液を1mL用意できる場合は、CSEまたは日本薬局方エンドキシン標準品の希釈系列10 EU/mLを10  $\mu$ Lと薬剤溶液990  $\mu$ Lを混合してPPC(2本分)を調製する方法が望ましい。

## 3. 日常測定

薬剤ごとに以下の検体のゲル化時間の測定を行い、保存検量線を用いて評価する。

- 陽性コントロール(PC:3.4 参照)n=1

- 陽性製品コントロール(PPC:3.5 参照)n=1
- 薬剤溶液 n=2

### 3.1 トキシノメーターの準備

測定開始の20分以上前に機器の電源を入れておく。保存検量線のデータを手入力する。測定時間は、保存検量線データの濃度0.01 EU/mLの最長ゲル化時間に設定する。

### 3.2 リムルス ES- II シングルテストワコーのライセート試薬準備

リムルス ES- II シングルテストワコーのライセート試薬を 4 本、冷蔵庫から取り出して室温に戻す(20分程度)。

### 3.3 エンドキシン標準溶液の希釈

リムルステストチューブ-Sを試験管立てに4本並べ、図2に従ってマジックインキ等で目的濃度を記す。各チューブに試験用水を1000  $\mu$ L用ピペットで900  $\mu$ Lずつ分注する。次いで、室温に戻したCSE溶液(1000 EU/mL)をタッチミキサー(ボルテックス)で1分間激しく攪拌する。これをエクステンドIIピペットで100  $\mu$ Lを2回洗い込みしてから測り取り、100 EU/mLのチューブに加える。払い出し時のピペット押し出し操作は1回とし、使用したチップは廃棄する。日本薬局方エンドキシン標準品を使用する場合も同様に目的濃度まで希釈する。

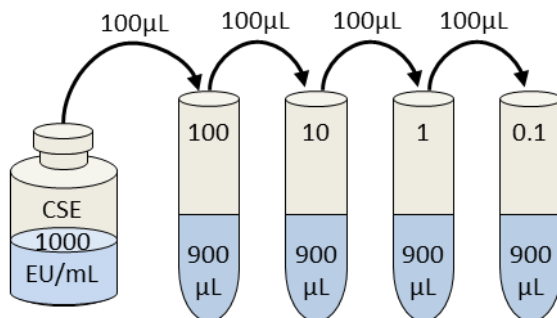


図2.エンドキシン標準溶液の希釈

### 3.4 陽性コントロール(PC)の調製

CSE 溶液 1000 EU/mL を 1. 保存検量線作成 1.2 エンドキシン標準溶液の希釈 に記載の方法で、0.1 EU/mL まで希釈する。0.1 EU/mL の溶液を陽性コントロール(PC)とする。日本薬局方エンドキシン標準品を使用する場合も同様に調製する。

### 3.5 陽性製品コントロール(PPC)の調製

3.3 で作成した CSE 希釈系列 1 EU/mL を 30  $\mu$ L と薬剤溶液(希釈測定する場合は希釈後の薬剤溶液)270  $\mu$ L<sup>注3)</sup>を混合し、エンドキシンの終濃度が 0.1 EU/mL となるよう調製する。日本薬局方エンドキシン標準品を使用する場合も同様に調製する。



### 3.6 トキシノメーターによる測定

1. 保存検量線作成の 1.3 と同様にして PC、PPC、薬剤溶液をトキシノメーターで測定する。

### 3.7 データの解析と判定

保存検量線を用いて、PC、PPC、薬剤溶液のエンドキシン濃度を求める。

試験成立の有効条件は、以下の(A)(B)が成り立つとき。

- 3.7.1 (A)PC のエンドキシン濃度が 0.075 EU/mL 以上 0.133 EU/mL 以下である。

- 3.7.2 (B)PPC のエンドキシン濃度から薬剤溶液のエンドキシン濃度を差し引いた値が 0.05 EU/mL 以上 0.2 EU/mL 以下である。

- 3.7.3 (A)(B)が確認できれば、試験は有効である。

保存検量線から得られたサンプルのエンドキシン濃度と希釈倍数から薬剤溶液のエンドキシン濃度を算出し、規格値未満であれば試験適合となる。(例えば、サンプルのエンドキシン濃度が A EU/mL となった場合、薬剤溶液のエンドキシン濃度は、 $A \times$  希釈倍数となる。これが規格値未満であるかを判定する。)

- 3.7.4 保存検量線を用いて算出した PC のエンドキシン濃度が、0.075 EU/mL 以上 0.133 EU/mL 以下でなかった時、以下を確認して再試験する。

⇒エンドキシン標準品の有効期限、保存方法には問題ないか？

⇒エンドキシン標準品の溶解方法や希釈方法は正しいか？

⇒測定操作はプロトコルに従っているか？

⇒トキシノメーターの温度、光量は適正か？

- 3.7.5 PC のエンドキシン濃度は 0.075 EU/mL 以上 0.133 EU/mL 以下であったが、PPC のエンドキシン濃度からサンプルのエンドキシン濃度を差し引いた値が、0.050 EU/mL 以上 0.20 EU/mL 以下でなかった時

⇒PPC の調製方法を確認し、問題がなければ下記の希釈を行う。

⇒サンプルをさらに最大有効希釈倍数の範囲内で希釈して PPC と希釈サンプルを再試験する。ただし、薬剤溶液のエンドキシン濃度を算出する際に通常の希釈倍数と異なるので注意が必要となる。

⇒PET 薬剤の性質が大きく変化していることも推測されるため、再試験後の出荷判断は慎重に行うこと。また、予備検討による希釈の再設定も検討すること。

注3) PET 薬剤溶液を 1mL 用意できる場合は、CSE または日本薬局方エンドキシン標準溶液の希釈系列 10 EU/mL を 10  $\mu$ L と薬剤溶液 990  $\mu$ L を混合して PPC を調製する方法が望ましい。急ぐときには 1mL をシリンジで取ることも被曝低減につながると考えられる。