

リムルスES-IIプラスCSシングルテストワコー

を使用したエンドトキシン簡便法

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
2024 年 5 月 9 日	2024/5/9 版		

目次

表紙	1
改訂履歴	2
目次	3
Limlus ES-IIplus CS SingleTest Wako	4
リムルス ES-II プラス CS シングルテストワコを用いたエンドトキシン試験法	4
<使用機材>	4
1. 保存検量線	4
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)	4
3. 日常測定手順	5
3.1 トキシノメーターの準備	5
3.2 陽性コントロール PC 及び陽性薬剤コントロール PPC の調製	5
3.3 検体の添加及び反応	5
3.4 データの解析と判定	5

Limlus ES- II plus CS SingleTest Wako

リムルス ES- II プラス CS シングルテストワコーを用いたエンドトキシン簡便法

本標準操作手順書は、リムルス ES- II プラス CS シングルテストワコーを用いたエンドトキシン簡便法の日常測定について記載したものである。

＜使用機材＞

- トキシノメーター ET-7000、ET-mini(3. 日常測定のみに使用できる)、ET-6000、ET-5000
又は ET-2000 (すべて富士フィルム和光純薬)
- タッヂミキサー(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 μL ^{注1)}
Finnpipette F2 #4642090(Thermo SCIENTIFIC)又は同等品、1 本
- マイクロピペット 20–200 μL ^{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 プラス CS シングルテストワコー #299-772011(富士フィルム和光純薬)
- リムルステストチューブ-S(アルミキヤップ付) #292-32751(富士フィルム和光純薬)
- アルミキヤップ-S #293-28251(富士フィルム和光純薬)
- 大塚蒸留水 20 mL アンプル(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 μL 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

保存検量線は、リムルス ES- II プラス CS シングルテストワコーのライセート試薬の取扱説明書に記載されている方法に従い、検量線データシートを Web よりダウンロードして使用する。

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。

新規の 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:3.2 参照)n=1
- 陽性薬剤コントロール(PPC:3.2 参照)n=1
- 薬剤溶液 n=2

3. 日常測定手順

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 陽性コントロール PC 及び陽性薬剤コントロール PPC の調製

リムルス ES-II プラス CS シングルテストワードに付属の CSE のゴム栓をゆっくりと外す。箱ラベルおよび添付検量線データシートに記載の CSE の表示含量を参照して終濃度が 0.1EU/mL となるように(例 0.084EU/バイアルの場合、840μL) 試験用水(陽性コントロール：PCを調製する場合)または試料溶液(陽性薬剤コントロール：PPC を調製する場合)を加え、アルミキヤップをしてボルテックスマキサーで約 30 秒激しく攪拌する。溶解後は 2~10 °Cに保存して 4 時間以内に使用すること。もし、CSE の粉末がゴム栓に付着している場合は、台上でバイアルの底を数回軽く叩きゴム栓に付着している CSE の粉末をバイアルの底に落としてから使用する。

3.3 検体の添加及び反応

1 検体当たり 4 本のライセート試薬をラックに並べゴム栓を取り、乾熱滅菌済みのアルミキヤップを被せておく。

- 試料溶液用 n = 2
- 陽性コントロール (PC)用 n= 1
- 陽性薬剤コントロール (PPC)用 n= 1

これに検体を 0.20 mL ずつ加え再びアルミキヤップをし、検体を加えて 2 秒後から、5 秒間ボルテックスマキサーで攪拌する。更に 3 秒後にトキシノメーターにセットし測定を開始する。(トータルで 10 秒)

もし、ライセート試薬の粉末がゴム栓に付着している場合は、台上でバイアルの底を数回軽く叩きゴム栓に付着しているライセート試薬の粉末をバイアルの底に落とす。少量のライセート試薬がゴム栓に付着している程度では試験の結果に影響はない。

3.4 データの解析と判定

保存検量線を用いて、PC、PPC、薬剤溶液のエンドト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。

3.4.1 (A)PC のエンドトキシン濃度が 0.075 EU/mL 以上 0.133 EU/mL 以下である。

3.4.2 (B)PPC のエンドトキシン濃度から薬剤溶液のエンドト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。

3.4.3 (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トキシン濃度と希釀倍数から薬剤溶液のエンドト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、サンプルのエンドトキシン濃度が A EU/mL となった場合、薬剤溶液のエンドトキシン濃度は、 $A \times \text{希釀倍数}$ となる。これが規格値未満であるかを判定する。)

3.4.4 保存検量線を用いて算出した PC のエンドトキシン濃度が、0.075 EU/mL 以上 0.133 EU/mL 以下でなかつた時、以下を確認し全行程を再試験する。ただし再試験を行う場合は、その理由を逸脱等記録書に記録し、再試験実施の判断は品質保証責任者(品質管理責任者)の判断を仰ぐこと。

⇒エンドトキシン標準品の有効期限、保存方法には問題ないか？

⇒エンドトキシン標準品の溶解方法や希釀方法は正しいか？

⇒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？

3.4.5 PC のエンドトキシン濃度は 0.075 EU/mL 以上 0.133 EU/mL 以下であったが、PPC のエンドトキシン濃度からサンプルのエンドトキシン濃度を差し引いた値が、0.050 EU/mL 以上 0.20 EU/mL 以下でなかつた時、以下の確認および再試験を実施する。ただし再試験を行う場合は、その理由を逸脱等記録書に記録し、再試験実施の判断は品質保証責任者(品質管理責任者)の判断を仰ぐこと。

⇒PPC の調製方法が問題なかったかを確認する。

⇒試料溶液の pH が 6.0～8.0 の範囲でない場合、試料溶液を最大有効希釀倍数の範囲内で希釀して PPC と希釀サンプルを再試験する。ただし、薬剤溶液のエンドトキシン濃度を算出する際に通常の希釀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、予備検討による希釀の再設定も検討すること。

以上