

エンドトキシン計 Sievers* Eclipse

遺伝子組み換え試薬を用いたエンドトキシン分析

Application Note



目的

USP <86>では、エンドトキシン試験に非動物由来の試薬の使用が認められており、遺伝子組換えカスケード試薬 (rCR) と遺伝子組換えC因子試薬 (rFC) の両方を使用できます。このアプリケーションノートでは、エンドトキシン計 Sievers EclipseとrCRの様々な医薬品への適合性を示し、カプトガニの血球抽出物 (LAL) を使ったエンドトキシン試験に代わる、動物を使用しない効率的なエンドトキシン試験を提供します。

エンドトキシン計 Sievers Eclipseにおいて、市販の遺伝子組換えカスケード試薬 (rCR) PyroSmart NextGenとChromo-LAL試薬によるカイネティック比色法を用いて、7つの市販製品について分析法の適合性と最適化を行いました。どちらの試薬もAssociates of Cape Cod社製です。この研究で評価した7つの製品を以下の表1に示します。

表1. Eclipseで測定した製品

製品	メーカー
Water For Injection (WFI, 注射用水)	Cytiva HyPure
Lactated Ringers for Injection USP (乳酸リンゲル液)	B. Braun
0.9% Sodium Chloride USP (塩化ナトリウム)	Cytiva
5% Dextrose Injection USP (5% デキストロース)	Baxter
Erythromycin Injection (エリスロマイシン)	Nexus Pharmaceuticals
Human Insulin Autoinjector (combination product) USP (インスリン)	N/A
Potassium Chloride Injection (塩化カリウム)	Nexus Pharmaceuticals

背景

エンドトキシン計 Sievers Eclipseは、検量線とポジティブプロダクトコントロール (PPC) を使った最大21サンプルの分析にカイネティック法を採用しています。Sievers Eclipseマイクロプレートには、エンドトキシン標準品 (RSE) とPPCが予め充填されているため、1mLのライセート試薬で5点までの検量線 (0.005~50 EU/mL) を作成できます。

市販されているrCR試薬は発色試薬のような挙動を示し、LALカスケード機構を利用するため、この研究では、rCR試薬が実際のサンプルで従来のライセート試薬を使ったカイネティック比色法と同様の性能を示すかどうかを決定することを目的としました。各製品をSievers EclipseでrCR試薬とカイネティック比色試薬の両方を用いて試験しました。

サンプル調製 & 試験計画

まず、LAL試薬水 (LRW) で全製品のさまざまな希釈倍率を測定してスクリーニングを実施し、どの希釈倍率で最適なPPC回収率を達成し、サンプルの干渉を克服できるかを決定しました。分析した希釈倍率は、1:1、1:10、1:20、1:50、1:100でした。初期スクリーニング後に各試薬で分析した製品と希釈倍率については、表2を参照してください。スクリーニング終了後、インスリン/エリスロマイシン/塩化カリウムについては、より多くの結果を得るため、また干渉を克服するために、複数の希釈倍率で測定しました。

標準液と製品の合格基準は以下の通りです。

- 標準液/サンプルのPPCのCV (%) : 15%以下
- PPC回収率 (%) : 50~200%
- R値 : 0.980以上

表2. 製品の希釈倍率

製品	希釈倍率
塩化カリウム	1 : 20、1 : 50
エリスロマイシン	1 : 20、1 : 50
5% デキストロース	1 : 10
0.9% 塩化ナトリウム	1 : 20
乳酸リンゲル液	1 : 20
インスリン	1 : 10、1 : 20、1 : 50
注射用水 (WFI)	1 : 1

結果

結果の要約を以下に示します。表3~4は検量線の結果、表5~10はサンプルの結果です。

表3. Chromo-LAL (Lot : 337092) と Sievers Eclipseの5点検量線の結果

プレートNo.	R値	オンセットタイムのCV (%) が 15%未満か？	ネガティブコントロールが 0.005 EU/ml未満か？
1	-0.999	合格	合格
2	-1.000	合格	合格
3	-1.000	合格	合格
4	-0.998	合格	合格

表4. PyroSmart NextGen (Lot: 2630003) と Sievers Eclipseの5点検量線の結果

プレートNo.	R値	オンセットタイムのCV (%) が 15%未満か？	ネガティブコントロールが 0.005 EU/ml未満か？
1	-0.999	合格	合格
2	-0.999	合格	合格
3	-1.000	合格	合格
4	-0.999	合格	合格
5	-0.999	合格	合格

サンプルの測定結果

塩化カリウム

表5. Sievers Eclipseにおける塩化カリウムの結果（各プレートにおいて3回 or 5回繰り返し測定）

プレート No.	試薬	希釈倍率	PPC平均回収率 (%)	サンプルのCV (%) が15% 未満か？	PPC回収率が15%未満か？	結果
1	Chromo-LAL x3	1 : 20	107.9	合格	合格	0.1 EU/mL未満
2	Chromo-LAL x3	1 : 20	78.7	合格	合格	0.1 EU/mL未満
3	Chromo-LAL x3	1 : 20	91.7	合格	合格	0.1 EU/mL未満
4	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 20	84.9	合格	合格	0.1 EU/mL未満
5	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 20	68.6	合格	合格	0.1 EU/mL未満
6	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 20	74.1	合格	合格	0.1 EU/mL未満
7	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 50	102.5	合格	合格	0.25 EU/mL未満
8	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 50	101.5	合格	合格	0.25 EU/mL未満
9	PyroSmart NextGen rCR x5	1 : 50	97.1	合格	合格	0.25 EU/mL未満

エリスロマイシン

表6. Sievers Eclipseにおけるエリスロマイシンの結果（各プレートにおいて3回 or 5回繰り返し測定）

プレート No.	試薬	希釈倍率	PPC平均回収率 (%)	サンプルのCV (%) が15% 未満か？	PPC回収率が15%未満か？	結果
1	Chromo-LAL x3	1 : 20	78.3	合格	合格	0.002 EU/mg未満
2	Chromo-LAL x3	1 : 20	83.3	合格	合格	0.003 EU/mg
3	Chromo-LAL x3	1 : 20	87.7*	合格*	合格*	0.002 EU/mg未満*
4	Chromo-LAL x3	1 : 20	71.3	合格	合格	0.002 EU/mg未満*
5	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 20	84.6	合格	合格	0.002 EU/mg未満
6	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 20	68.0	合格	合格	0.002 EU/mg未満
7	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 20	N/A**	合格**	合格**	N/A**
8	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 50	120.4***	合格/不合格***	合格/不合格***	0.005 EU/mg未満***
9	PyroSmart NextGen rCR x5	1 : 50	98.3	合格	合格	0.002EU/mg未満

* 1回の測定結果でウェルの分割が発生
 ** 3回の測定結果すべてでウェルの分割が発生
 *** 1回の測定結果のみCVが15%以上だった

エンドトキシン計 Sievers Eclipse 遺伝子組み換え試薬を用いたエンドトキシン分析

5% デキストロース

表7. Sievers Eclipseにおける5%デキストロースの結果（各プレートにおいて3回繰り返し測定）

プレート No.	試薬	希釈倍率	PPC平均回収率 (%)	サンプルのCV (%) が15% 未満か？	PPC回収率が15%未満か？	結果
1	Chromo-LAL	1 : 10	123.4	合格	合格	0.05 EU/mL未満
2	Chromo-LAL	1 : 10	96.4	合格	合格	0.05 EU/mL未満
3	Chromo-LAL	1 : 10	102.9	合格	合格	0.05 EU/mL未満
4	PyroSmart NextGen rCR	1 : 10	80.2	合格	合格	0.05 EU/mL未満
5	PyroSmart NextGen rCR	1 : 10	75.2	合格	合格	0.05 EU/mL未満
6	PyroSmart NextGen rCR	1 : 10	95.6	合格	合格	0.05 EU/mL未満

0.9% 塩化ナトリウム

表8. Sievers Eclipseにおける0.9% 塩化ナトリウムの結果（各プレートにおいて3回繰り返し測定）

プレート No.	試薬	希釈倍率	PPC平均回収率 (%)	サンプルのCV (%) が15% 未満か？	PPC回収率が15%未満か？	結果
1	Chromo-LAL	1 : 20	134.2	合格	合格	0.1 EU/mL未満
2	Chromo-LAL	1 : 20	101.5	合格	合格	0.1 EU/mL未満
3	Chromo-LAL	1 : 20	115.7	合格	合格	0.1 EU/mL未満
4	PyroSmart NextGen rCR	1 : 20	111.5	合格	合格	0.1 EU/mL未満
5	PyroSmart NextGen rCR	1 : 20	86.7	合格	合格	0.1 EU/mL未満
6	PyroSmart NextGen rCR	1 : 20	84.5	合格	合格	0.1 EU/mL未満

乳酸リンゲル液

表9. Sievers Eclipseにおける乳酸リンゲル液の結果（各プレートにおいて3回繰り返し測定）

プレート No.	試薬/希釈倍率	希釈倍率	PPC平均回収率 (%)	サンプルのCV (%) が15% 未満か？	PPC回収率が15%未満か？	結果
1	Chromo-LAL	1 : 20	143.9	合格	合格	0.1 EU/mL未満
2	Chromo-LAL	1 : 20	122.8	合格	合格	0.1 EU/mL未満
3	Chromo-LAL	1 : 20	139.2	合格	合格	0.1 EU/mL未満
4	PyroSmart NextGen rCR	1 : 20	104.3	合格	合格	0.1 EU/mL未満
5	PyroSmart NextGen rCR	1 : 20	94.9	合格	合格	0.1 EU/mL未満
6	PyroSmart NextGen rCR	1 : 20	93.5	合格	合格	0.1 EU/mL未満

インスリン

表10. Sievers Eclipseにおけるインスリンの結果 (各プレートにおいて3回 or 5回繰り返し測定)

プレート No.	試薬	希釈倍率	PPC平均回収率 (%)	サンプルのCV (%) が15% 未満か?	PPC回収率が15%未満か?	結果
1	Chromo-LAL x5	1 : 10	104.3	合格	合格	0.05 EU/mL未満
2	Chromo-LAL x5	1 : 10	87.0*	合格*	合格*	0.05 EU/mL未満*
3	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 10	52.4	合格	合格	0.05 EU/mL未満
4	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 20	55.6*	合格*	合格*	0.1 EU/mL未満*
5	PyroSmart NextGen rCR x3	1 : 50	101.2	合格	合格	0.25 EU/mL未満
6	PyroSmart NextGen rCR x5	1 : 50	79.3	合格	合格	0.25 EU/mL未満

* 1回の測定結果でウェルの分割が発生

WFI (注射用水)

表11. Sievers Eclipseにおける注射用水の結果 (各プレートにおいて3回繰り返し測定)

プレート No.	試薬	希釈倍率	PPC平均回収率 (%)	サンプルのCV (%) が15% 未満か?	PPC回収率が15%未満か?	結果
1	Chromo-LAL	1 : 1	120.4	合格	合格	0.005 EU/mL未満
2	PyroSmart NextGen rCR	1 : 1	110.2	合格	合格	0.005 EU/mL未満
3	PyroSmart NextGen rCR	1 : 1	114.1	合格	合格	0.005 EU/mL未満

まとめと提言

Sievers Eclipseは、市販のrCR PyroSmart NextGenと優れた互換性を示し、本研究で検証したほとんどの実際の製品で使用できました。エリスロマイシンとインスリンのサンプルでは、両試薬でいくつかのウェルが分割されましたが、これはサンプルの干渉によるものと考えられます。rCR試薬はSievers Eclipseマイクロプレートで最適化が可能です。USP <86>に沿ったエンドトキシン試験において、ラボは非動物由来試薬の使用を検討する必要があります。

今後の分析では、LAL試薬に対してrCR試薬を使用する場合、各製品の最適な希釈倍率を決定するためにサンプルスクリーニングを実施する必要があります。また、より多くの試薬ロットが市販されている場合は、正確な結果と再現性を確認するために試験を行う必要があります。

(翻訳：セントラル科学株式会社)