



エンドトキシン試験の注意点

2025/6/24

株式会社ベリタス

汚染を防ぐ

- 操作に起因する汚染
- 器具に起因する汚染
- 試薬に起因する汚染

影響を取り除く

- ライセート試薬の反応への影響
- エンドトキシン活性への影響

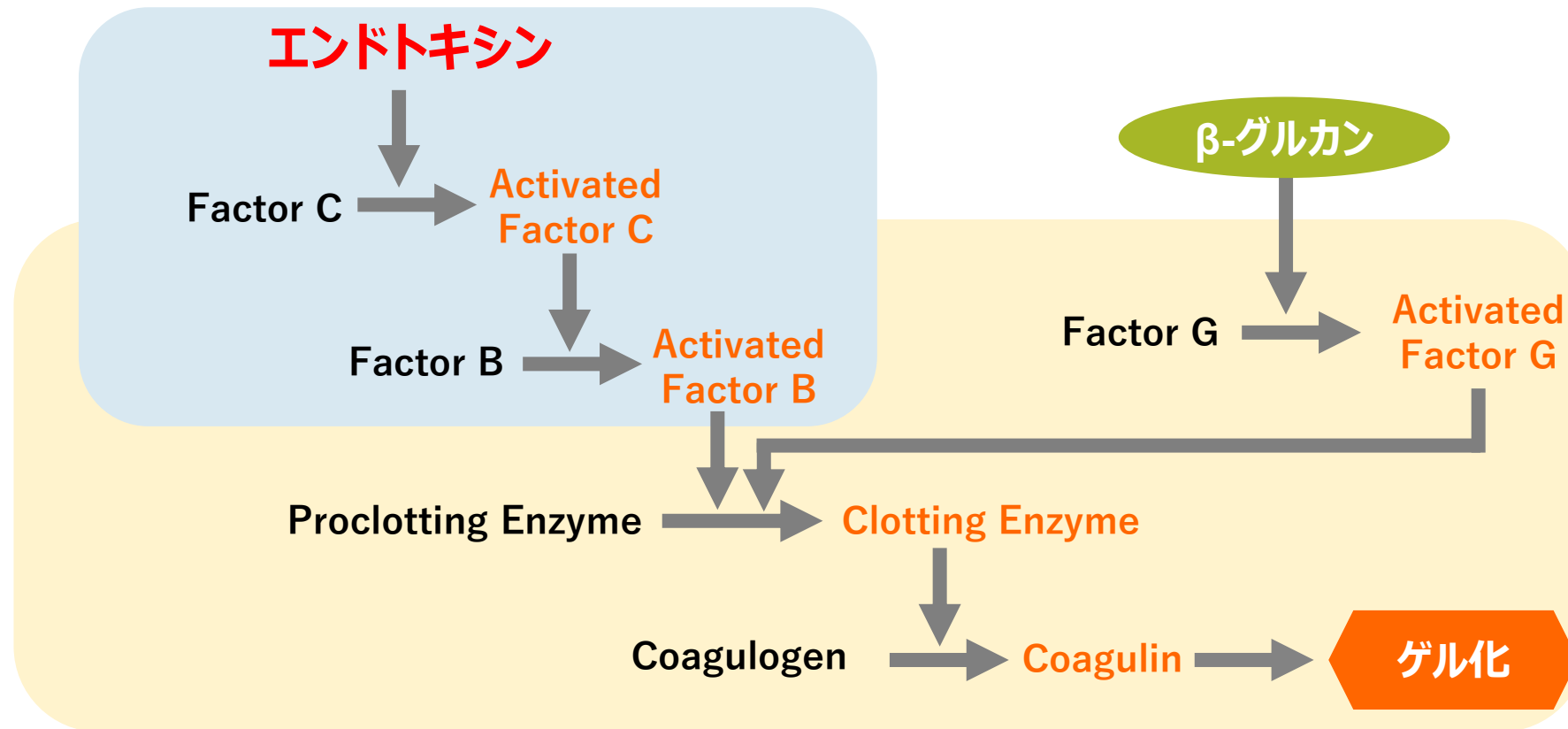
汚染を防ぐ

- 操作に起因する汚染
- 器具に起因する汚染
- 試薬に起因する汚染

影響を取り除く

- ライセート試薬の反応への影響
- エンドトキシン活性への影響

エンドトキシンとβ-グルカン



エンドトキシンや β -グルカンの特徴

環境中のいたるところに存在する

生菌がないところにも存在する

一度汚染すると除去することが難しい

汚染に気付きにくい

微量の汚染で結果に影響を及ぼす

 **できる限り汚染を避ける・少なくすることが重要**

- あらかじめ汚染を確認する
- 十分な条件でのエンドトキシン除去処理をおこなう
 - 乾熱滅菌が第一選択肢
- ライセート試薬メーカーが推奨する器具を使用する

第18改正日本薬局方 4.01エンドトキシン試験法

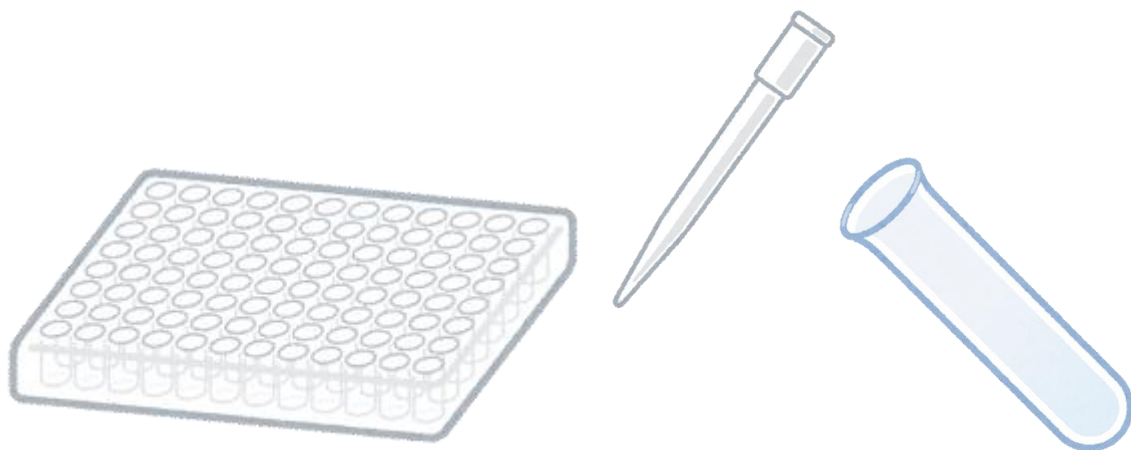
ガラス製及びその他の耐熱性器具

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

プラスチック製品

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

- エンドトキシンや β -グルカンは、毒物や劇物等、国内法規で規制される物質に該当しない
- エンドトキシン標準品やエンドトキシンや β -グルカンが付着した器具は、特別な廃棄方法はない
 - 各施設の実験用器具の廃棄ルールに従って廃棄する



- あらかじめ汚染を確認する
- 試薬の調製にはエンドトキシン試験用水を使用する
- 容器や器具は汚染の少ないものを使用する

エンドトキシンの除去方法

ろ過

低分子のもの：限外ろ過（分画分子量1万程度）

高分子のもの：陽電荷フィルター

高圧蒸気滅菌

耐熱性の試薬で効果的な場合がある

汚染を防ぐ

- 操作に起因する汚染
- 器具に起因する汚染
- 試薬に起因する汚染

影響を取り除く

- ライセート試薬の反応への影響
- エンドトキシン活性への影響

エンドトキシン試験に影響を及ぼす因子

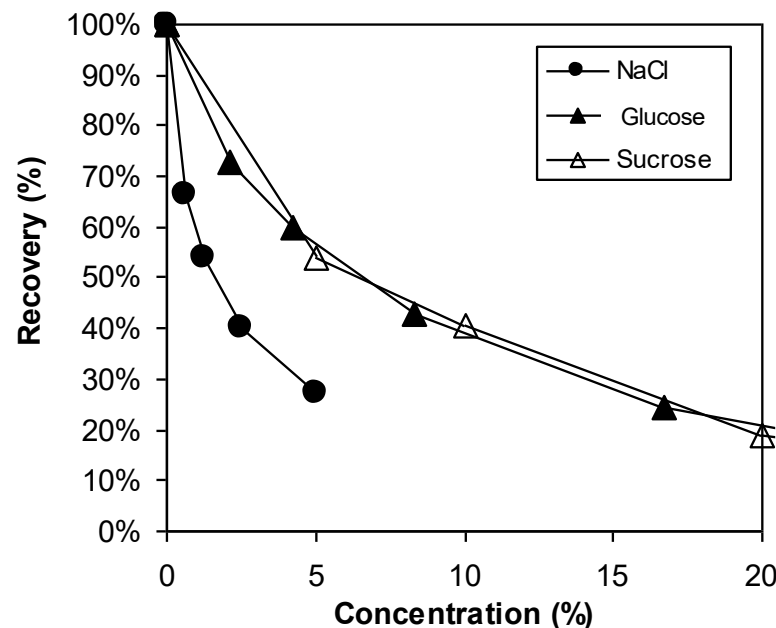
影響因子	エンドトキシンに対する影響	ライセート試薬に対する影響
高濃度の塩・糖	なし	主に阻害
金属イオン	微量で活性低下を起こす場合あり	活性に影響を及ぼす場合あり
界面活性剤	活性変化	活性変化
キレート剤	活性変化	阻害
タンパク質	状態変化、安定化	主に阻害
プロテアーゼ	なし	偽陽性
プロテアーゼ阻害剤	なし	阻害
タンパク変性剤	なし	変性、失活
β-グルカン	なし	偽陽性
LAL反応物質	なし	偽陽性
容器の材質	吸着や溶出物による活性変化	溶出物により活性変化
加熱	活性変化	活性低下

エンドトキシン試験に影響を及ぼす測定条件

影響因子	測定に対する影響
pH	測定値の変化
反応温度	測定値の変化
反応試験管の形状	ゲル化法で感度に影響
振動・衝撃	ゲル化法、試験管を用いた定量法で影響
着色物質、濁り	程度が大きいと測定を妨害

- 高濃度の塩・糖・アミノ酸・核酸などは試験を阻害する場合がある
- デキストランやポリエチレングリコールは比濁法で促進を示す場合がある
- 基本的には希釈によって影響を取り除く

NaCl、グルコース、スクロースの影響



- 微量でエンドトキシンの活性を低下させる場合がある
- 軟質ガラスやステンレス製の容器を使用する場合は注意が必要
- 希釈やキレート剤の添加など、適当な方法によって影響を取り除く

金属イオンによるエンドトキン活性の変化

金属塩	濃度 (μM)	エンドトキシンの回収率 (%)
FeSO ₄	1.0	16
FeCl ₂	1.0	3
AlCl ₃	1.0	35
GaCl ₃	1.0	< 1
NaCl	1.0	102
MgCl ₂	1.0	87
CaCl ₂	1.0	85

Tsuchiya, M.: *J. Antibact. Antifung. Agents*, **6**, 287-294 (1990)より抜粋

- 界面活性剤

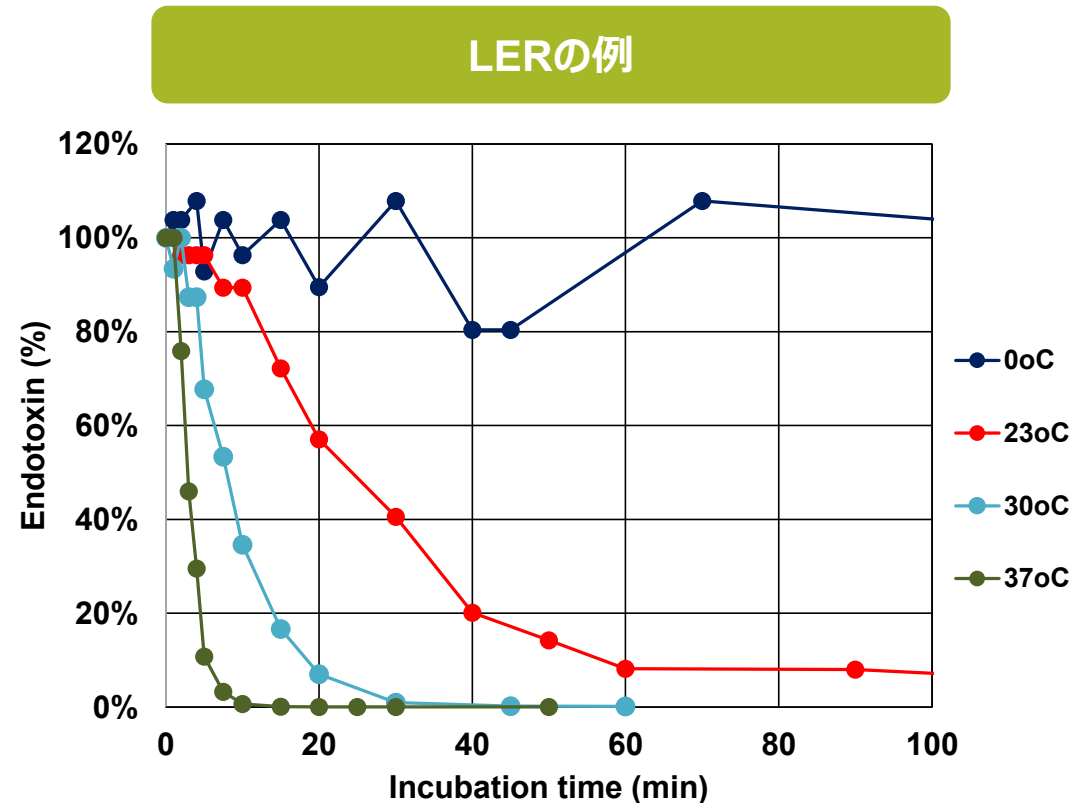
- エンドトキシンのミセルサイズを変化させ、活性を変化させる
- 基本的には希釈によって影響を取り除く

- キレート剤

- ライセート試薬中のマグネシウムイオンなどを奪うことにより、活性を変化させる
- 基本的には希釈によって影響を取り除く

LER (Low Endotoxin Recovery)

- 試料に添加した標準エンドトキシンの活性が低下してしまう現象
- キレート剤と界面活性剤の両方を含む試料で観察される



10 mM Na Citrate, 0.05% Polysorbate (PS) 20, 5 EU/mL RSE

タンパク質、プロテアーゼ、プロテアーゼ阻害剤

- タンパク質

- エンドトキシンに親和性を持つものは、ミセルサイズを変化させて活性を変化させる
- ライセート試薬の活性を変化させる場合もある
- 希釈によって影響を取り除くことが一般的

- プロテアーゼ

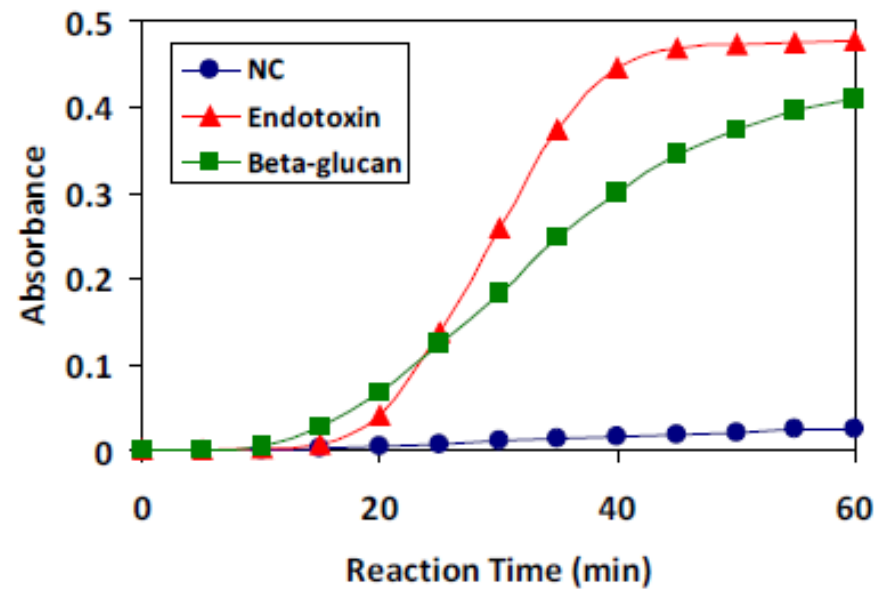
- トリプシン、トロンビン、ペプシンなどはカスケード因子を活性化し、偽陽性を引き起こす
- 加熱処理によって影響を取り除くことが一般的

- プロテアーゼ阻害剤

- アンチトリプシン、アンチトロンビンなどはライセート試薬の反応を阻害する
- 希釈や加熱処理によって影響を取り除くことが一般的

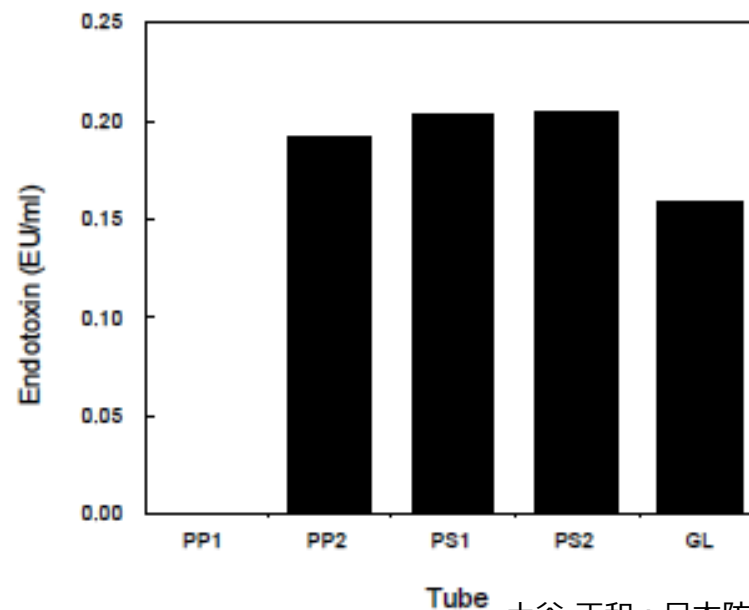
- エンドトキシンとβ-グルカンの両方に反応するライセート試薬を用いる場合は、β-グルカンの影響に注意する
 - β-グルカンブロッカーを使用するとよい

エンドトキシンとβ-グルカンのタイムコースの違い



- エンドトキシンがプラスチック製器具に吸着することがある
 - ポリプロピレン製容器、セルロース系フィルターなどで確認されている
- 容器からの溶出物が測定に影響を及ぼすこともある
 - フリントガラスやソーダライムガラスからのアルカリの溶出

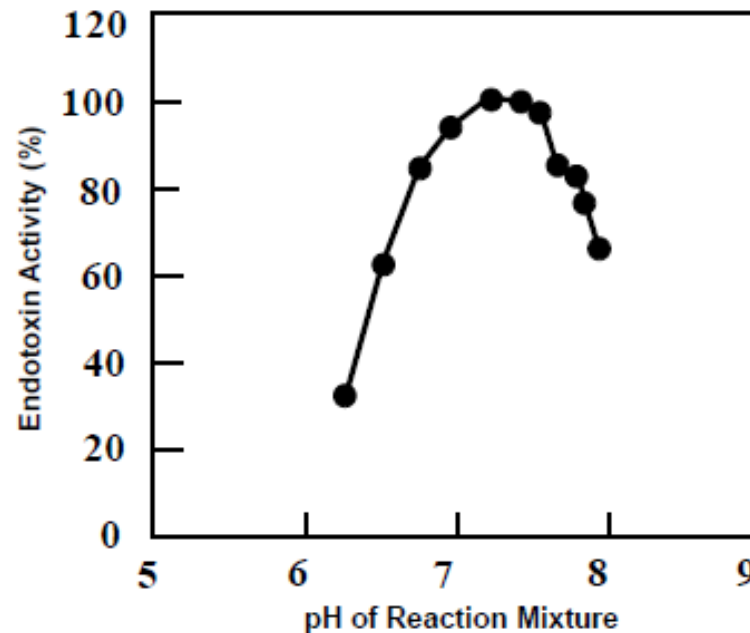
エンドトキシンの容器への吸着



土谷 正和：日本防菌防黴学会誌, 24, 357 (1996)

- ゲル化法、比濁法の至適pH：約7.3~7.5
- 比色法の至適pH：約8.0
- 反応液のpHがライセート試薬の推奨pHからずれる場合は調整が必要

比濁法の至適pH



• 汚染を防ぐ

- できるかぎり汚染を防ぐ操作が重要（一般的な無菌操作が基本）
- エンドトキシン試験に適した器具や試薬を選択する
- 器具や試薬は汚染の程度を把握した上で使用する
- 器具や試薬の材質や特徴を考慮し、適切なエンドトキシン除去をおこなう

• 影響を取り除く

- エンドトキシン試験は試料や測定条件によって影響を受ける
- 影響はライセート試薬に対するものとエンドトキシンに対するものがある
- すでに知られている影響因子の情報を参考に、測定条件を検討する

