

(109 × 210mm Size)

Code No. 299-54501

Wako

Limulus PS Single Test *Wako*

20 Test

Instruction

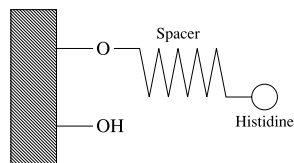
[Preface]

Endotoxin is lipopolysaccharide derived from cell membranes of Gram-negative bacteria and is the representative pyrogen. The administration of endotoxin contaminated blood, saline solution and injectants into the human body may induce serious effects such as fever and acute shock. Therefore, it is imperative for therapeutics to be tested for endotoxin contamination. Since reports about coagulation of Limulus amoebocyte lysate (LAL) induced by endotoxin derived from bacteria by F. B. Bang in 1965¹⁾ and J. Levin & F. B. Bang in 1964²⁾, detection of endotoxin using LAL has been widely used as a rapid and sensitive method. The method measuring endotoxin with LAL is already filed by US Pharmacopoeia in 1980, and by Japanese Pharmacopoeia in 1988³⁾⁴⁾.

It has become obvious that LAL is reactive to some limited substances besides bacterial glycolipid. Kakinuma reported that LAL reacts with β -1,3-glucan⁵⁾ and Iwanaga verified a system activating LAL coagulation with β -1,3-glucan apart from that with endotoxin⁶⁾⁷⁾. Moreover, there are reports that some active substance to LAL is eluted from cellulose-based membranes⁸⁾. All of the examples described above indicate that a special concern must be taken in specificity of LAL to endotoxin. LAL ES reagent used in the test is prepared as endotoxin specific LAL reagent by inactivating β 1,3-glucan induced cascade by adding an excess of a β -1,3-glucan derivative.

Pyrosep used in the test is an affinity resin specific to endotoxin, which is composed of water-insoluble support and histidine as a ligand conjugated through a spacer. This resin, developed by Tanabe Pharmaceuticals, Ltd, is useful for removal of endotoxin from macromolecule solutions and complicated solutions⁹⁾¹⁰⁾.

<Schematic figure of Pyrosep>



Condition of absorb: pH 3 ~ 8, $\mu \leq 0.1$

Capacity of absorb: 0.31mg (*E. coli* UKT-B,LPS)/g absorbant

Dissociation constant (Kd): 7.3×10^{13} M (*E. coli* UKT-B,LPS)

This test is composed of LAL ES reagent and Pyrosep suspension described above. Affinity concentration of endotoxin from sample is done with Pyrosep resin column chromatography in capillary as the first step, followed by measurement of endotoxin by time resolved turbidimetric assay using LAL ES reagent, which allows measurement of endotoxin in much smaller amount than conventional methods allow, even in fatty samples.

<Note>

This test is not permitted as a replacement for pyrogen test using rabbits.

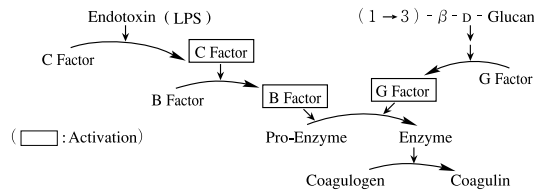
[Characteristics]

1. The test measures very small amounts of endotoxin in complicated samples such as kidney artificial dialysis solution without pronounced interference with endogenous materials in the samples, due to affinity concentration of endotoxin by Pyrosep before LAL reaction.
2. The test can be applied to fatty materials such as fat-soluble vitamins if the material is soluble in ethanol because Pyrosep works as affinity resin to endotoxin even in ethanol.
3. The test is cost-conscious because LAL reagent is efficiently used, depending on the numbers of samples to be assayed.

[Principle]

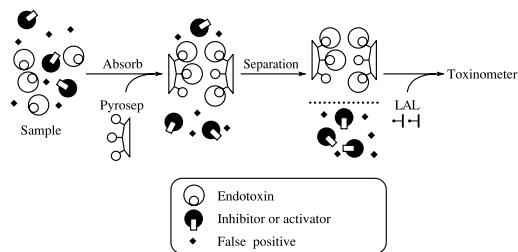
The coagulation mechanism of LAL is summarized in the following figure. Endotoxin triggers the first step of serine proteinase cascade in LAL. Eventually, coagulogen, at the very end of the cascade, is hydrolyzed into coagulin which forms a soluble gel. β -1,3-glucan also initiates gelation of LAL through another cascade in dose-dependent manner, and high concentrations of glucan inhibits LAL activation without pronounced interference to endotoxin-initiating cascade. LAL ES reagent provided in the test is prepared as a LAL reagent specifically reactive to endotoxin by adding excess β -1,3-glucan derivative¹¹⁾.

Time resolved turbidmetric assay of endotoxin with a Toxinometer stoichiometrically determines the concentration of endotoxin in samples based on measurement of gelation time (Tg) between turbidity changes from initiation of the reaction to the threshold of the predetermined transmittance level.



Coagulation mechanism of LAL

In the first step of the test, endotoxin in the sample is specifically concentrated by passing the sample through Pyrosep resin packed in glass capillary column. Absorbed endotoxin on the resin is directly conducted to LAL ES reagent and the coagulation level specifically induced by endotoxin is measured with a Toxinometer.



[Content]

1. LAL ES reagent, *Limulus polyphorus* amoebocyte lysate lyophilized (containing Tris-HCl buffer and β -1,3-glucan derivative) 20 vials for 0.3 mL
2. Pyrosep resin suspension (containing in phosphate buffer) 20 vials 0.77 mL
3. LAL reconstitution solution 2 vials (7 mL)
4. Wash solution 4 vials (11 mL)
5. Sample diluent 4 vials (10 mL)
6. Glass capillary column (having a filter at the connected end with silicon tube, endotoxin free 20 pieces

(Necessary materials and instruments to be prepared)

- 1) a syringe with 10-20 mL capacity (without needle) 1 piece
- 2) a Stopcock with a 3 ways 1 piece
- 3) a syringe fitting for 1.5 mmID tube 1 piece
- 4) a size 10 binder clip (about 51 mm binding site) as indicated in the below figure 4 1 piece
- 5) Toxinometer 1 instrument

[Assay procedure]

I. Preparation of assay sample

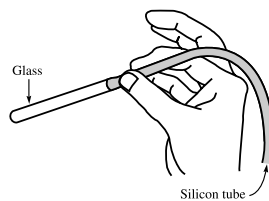
Using sample diluent, adjust the pH of the sample to about 5. Generally, pH in most of the samples and endotoxin solutions for the standard curve can be adjusted, simply by adding sample diluent with 1/10 volume of the sample. If buffer action of the sample is relatively strong, concentrated acid solution can be used for pH adjustment. The final sample volume should not be increased significantly for the subsequent experiment.

II. Procedure

1. Open Pryrosep resin suspension vial by removing aluminum cap. Suspend Pyrosep resin in the vial by several shaking and inverting.
2. Pick up a glass capillary attached with silicon tube at their connection site. Do not touch glass capillary part after removal of aluminum foil, as shown in figure 1.

(Fig 1)

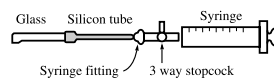
Handling of a glass capillary



3. Place the free end of the glass capillary into the suspension, and connect the free end of silicon tube to a syringe via a 3 way stopcock and a syringe fitting prepared as shown in figure 2.

(Fig 2)

Fitting



4. Gently agitate the suspension and draw all of the suspension into the capillary column by drawing the pestle of the syringe. Then switch the stopcock to close the channel connecting to the capillary and to open another channel to drain the solution in the syringe, as shown in figure 3. For this step, Pyrosep resin is packed in the capillary column by stacking the resin to the filter integrated inside the capillary.

5. Carefully transfer and place the end of the glass capillary into the sample solution in the sample tube without touching the glass part. Extract all of the solution after turning the stopcock to open the capillary channel as indicated in figure 3.

<Notes>

- A binder clip, as indicated in figure 4, is useful to fix the plunger in place, as illustrated in figure 4.
 - It takes about 20 minutes to transfer 5mL of sample to the column.
6. Discard the solution in the syringe by switching the stopcock to drain and pushing the plunger.

<Note>

The sample applied resin column should be washed with 1-2 mL of wash solution provided in the test if the sample is feared to contain some factors activating or inhibiting gelation of LAL.

In the same manners as described in 5 and 6.

7. Reconstitute LAL ES reagent with 0.3 mL of reconstitution solution provided.

<Note>

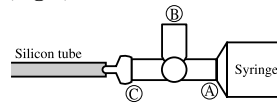
Preferably, LAL ES reagent should be reconstituted just before use. It should be used within 1 hour after reconstitution.

8. Transfer the capillary end to the LAL reagent, and draw it slowly by drawing the plunger, while observing the solution rising inside the capillary.
9. Turn the stopcock off the channel connecting to the capillary just when the LAL reagent reaches the position at about 6 cm beneath the capillary-silicon tube connection site, and intrude the air through another channel into the syringe cavity. Then, return the stopcock to connect the syringe and the capillary, pushing back the resin and the LAL with the air into the LAL ES vial.

<Notes>

- On extruding the resin from the capillary column, the free end of the capillary should be placed in the position of the vial inner wall, 1 cm above the surface of the residual LAL reagent in order to avoid creating bubbling the LAL reagent, as shown in figure 5.

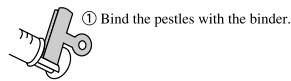
(Fig 3)



- ▶ When suck of Pyrosep resin suspension, sample and reconstitute LAL ES. → Close ①
- ▶ When it drain the solution in the syringe or intrude the air into the syringe. → Close ②

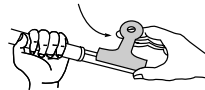
(Fig 4)

How to use of a file binder



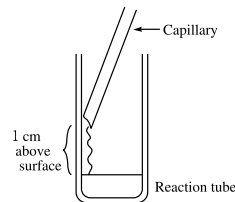
① Bind the pestles with the binder.

② Bind the pestles with the lateral side of the binder and then pull the pestles bending the binder to stop to move in side.



(Fig 5)

How to push back the LAL



- b) Abrupt extrusion of the resin and LAL reagent from the capillary may cause the filter integrated inside the capillary to slip out.
 - c) Immediate extrusion of the LAL reagent and the resin is required after turning the stopcock to close the capillary. Incomplete switching from the LAL reagent extraction to the air intrusion may cause continued rising of the LAL reagent in the capillary, causing it to reach the syringe fitting which may be contaminated with endotoxin.
 - d) A small quantity of the resin remaining in the capillary will not cause problems in results of the assay. LAL extraction and extrusion should be repeated if a large quantity of the resin is retained in the capillary.
10. Check the LAL-resin suspension whether or not the suspension contains bubbles, and eliminate bubbles of more than 2 mm in diameter by tapping the vial wall with finger if necessary.
11. After vortexing the vial for about 5 seconds, apply it to Toxinometer to determine gelation time¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾.

<Note>

Generally, the threshold value is determined at the level of transmittance of light at 94.9%. (Wait time 5.0 min.)

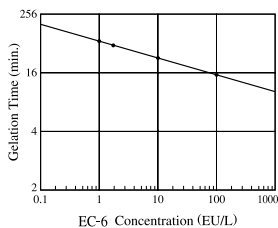
12. Calibrate the concentration of endotoxin in the sample using the standard curve plotted with value obtained from measurement of endotoxin solutions reference in the same manners as described above.

<Notes>

The standard curve of endotoxin is plotted as X bar: log(Endotoxin concentration); Y bar: log[log (gelation time)], to determine the concentration with linear regression. Refer to the leaflet, "Toxinometer Standard Assay Procedure" for details.

For example : Standard curve (Sample : 5.0 mL)

Curve : $\log\log (Tg) = -0.08530 \log (C) + 0.2364$
 $r = -0.9996$
 range : 14.60 - 53.60
 Unit : EU/L Th = 94.9%



No.	Concentration (EU/L)	Tg (min.)	Average Tg (min.)
1	1.000	53.0	53.60
		53.4	
		54.4	
2	2.000	41.6	41.53
		41.2	
		41.8	
3	10.00	26.6	26.07
		26.0	
		25.6	
4	100.0	14.6	14.60
		14.8	
		14.4	

[References]

1. Bang, F.B. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **98**, 325 (1956).
2. Levin, J. and Bang, F.B. : *Ibid.*, **115**, 265 (1964).
3. *The United States Pharmacopeia 22th, the National Formulary 17th, Supplement 8*, p.3349, U.S.Pharmacopeial Convention Inc. (1990).

4. *Japanese Pharmaceutical Codex 13*, 26 (1996).
5. Kakinuma, J., Asano, T., Torii, H., and Sugino, Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434 (1981).
6. Nakamura, T., Mori, R., Hiranaga, M., Miyata, T. and Iwanaga, S. : *J. Bacteriol.*, **38**, 781 (1983).
7. Iwanaga, S., Morita, T., Miyata, T., Nakamura, T., Hiranaga, M. and Ohtsubo, S. : *Bacterial Endotoxin*, Eds. Homma, J. Y., Kanegasaki, S., Luderitz, O., Shiba, T. and Westphal, O., p365, Verlag Chemie (1984).
8. Peason, F. C., Weary, M. and Bohon, J. : *Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test*, Eds. Watson, S. W., Levin, J. and Novitsky, T. J., p.247, Alan R. Liss, Inc. (1982).
9. Minobe, S., Nawata, M., Watanabe, T., Sato, T. and Tosa, T. : *Anal Biochem.* **198**, 292 (1991).
10. Masuda, M., Minobe, S., Fukui, T., Nawata, M., Watanabe, T., Sibaya, T. and Ogawa, Y. : *J. Bacteriol.*, **115**, 136 (1995).
11. Tuchiya, M., Takaoka, A., Tokioka, N. and Matuura, S. : *J. Bacteriol.*, **45**, 903 (1990).
12. Ohishi, H., Hatakeyama, Y., shiraishi, H., Yanagisawa, K., and Sakata, Y. : *J. Bacteriol.*, **105**, 300 (1985).
13. Oishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39**, 194 (1985).
14. Oishi, H., Fusamoto, M., Hatayama, Y., Tsuchiya, M., Takaoka, A. and Sakata, Y. : *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3012 (1988).
15. Ohishi, H., Wada, S., Shiraishi, H., Koshindou, T. and Tujino, R. : *Japanese Society for Bacteriology 116*, **100**, (1996).

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

Wako Chemicals USA, Inc.

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : +1-804-271-7677
Facsimile : +1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

Wako Chemicals GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : +49-2131-3111-0
Facsimile : +49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

(109 × 210mm Size)

Code 299-54501

エンドトキシン検出用

Limulus PS Single Test Wako

リムルス PS シングルテストワコー 20回用

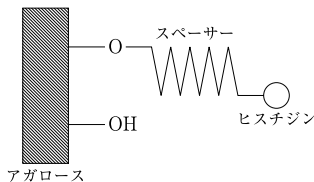
使用説明書

〔はじめに〕

エンドトキシン(内毒素)は、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖(LPS)であり、代表的な発熱性物質(ピロジェン)です。エンドトキシンにより汚染された血液、輸液、注射薬が体内に入ると発熱やショックなどの重篤な副作用を引き起こすため、これらの医薬品のエンドトキシンによる汚染はきびしく検査する必要があります。1965年、F. B. Bangが、グラム陰性菌によるカプトガニ体液の凝固を報告し¹⁾、さらに、1964年、J. LevinとF. B. Bangが、Limulus Amebocyte Lysate (LAL)の凝固がエンドトキシンによってひき起こされることを発見して以来²⁾、LALを用いたエンドトキシン検出法は、鋭敏で簡便な方法として広く用いられております。リムルステストとして知られるこの方法は、1980年、すでに米国薬局方に記載され、1988年には、日本薬局方にも記載されました³⁾。

KakinumaらはLALが β -1,3-グルカンにも反応することを報告し⁴⁾、さらにIwanagaらは、LAL中にはエンドトキシン以外に β -1,3-グルカンで活性化が起る系があることを明らかにしました⁶⁾。また、セルロース系の膜よりLALに反応する物質が溶出することも報告され⁸⁾、LALのエンドトキシンに対する特異性が問題となっています。

パイロセップは、水不溶性担体にスパーサーを介してヒスチジンを結合させたアフィニティー吸着体であり、エンドトキシンを特異的に吸着します。本品は、田辺製薬によって開発され、高分子物質等からのエンドトキシンの特異的除去に有効です⁹⁾¹⁰⁾。



吸着条件: pH 3 ~ 8、 $\mu \leq 0.1$
吸着容量: 0.31mg (*E. coli* UKT-B, LPS)/g (湿重量)吸着体
解離定数 (Kd): 7.3×10^{15} M (*E. coli* UKT-B, LPS)

パイロセップの模式図

本キットは、エンドトキシンに特異的なLAL ES試薬と、このエンドトキシン吸着剤であるパイロセップから成り、試料中のエンドトキシンをパイロセップに吸着・濃縮させた後LAL ES試薬と反応させ、比濁時間分析法により試料中のエンドトキシンを特異的に検出および定量するものです。通常のリムルステストでは検出不可能な、ごく微量のエンドトキシンや脂溶性物質中のエンドトキシンの検出に有効です。

なお、本品による試験をウサギによる発熱性物質試験の代用とすることは認められていませんので注意してください。

【特 長】

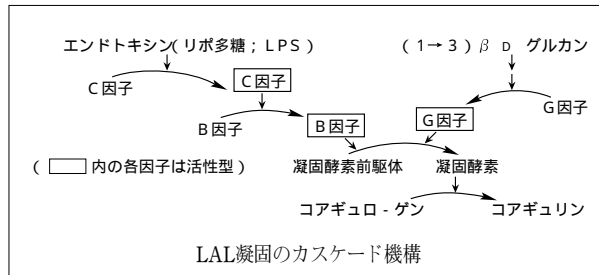
1. パイロセップにより試料中のエンドトキシンを特異的に吸着させ濃縮しますので、共存物質の影響を受けずに微量のエンドトキシンが測定可能です。
2. エンドトキシンはエタノール中でもパイロセップに吸着するため、通常のリムルステストでは不可能な脂溶性物質でもエタノールで溶解できればエンドトキシンの測定が可能です。
3. 測定に必要な数だけLALを使用できますので、無駄がありません。

【原 理】

(カプトガニ体液凝固のカスケード機構)

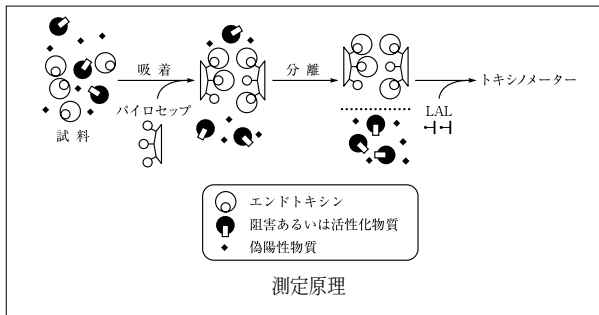
エンドトキシンによるLALのゲル化機構は、下図のように考えられています。すなわち、LAL中に含まれるセリンプロテアーゼが順次活性化され、最後に凝固性蛋白前駆体(コアグ્યローゲン)が水解されてコアグ્યリンとなり、不溶性のゲルを形成するというものです。一方、 β -1,3-グルカンもLALの活性化を引き起こしますが、濃度依存性があり、高濃度では逆にLALの活性化を阻害します。かつ、エンドトキシンによるLALの活性化には影響を与えません。本キットに含まれているLAL ESは反応系に β -1,3-グルカン誘導体を高濃度共存させており、エンドトキシンを特異的に測定することができます¹⁾。

トキシノメーターを用いた比濁時間分析法では、ゲル化にともなう生じる濁度を透過光量比としてとらえ、透過光量比が前もって設定したしきい値に達するまでの時間をゲル化時間(Tg)とし、Tgとエンドトキシンの濃度の関係からエンドトキシン濃度を算出します。



(測定原理)

エンドトキシン吸着剤であるパイロセップをつめたキャピラリーカラムに、試料中のエンドトキシンを吸着させ、試料を洗い流した後、吸着したエンドトキシンをLAL試薬と反応させることによって、試料中のエンドトキシンの定量を行います。測定はトキシノメーターで行います。



〔内 容〕

1. LAL ES試薬, 米国産カプトガニ (*Limulus polyphemus*) 血球抽出物の凍結乾燥品(トリス塩酸緩衝液, β -1, 3-グルカン誘導体を含む) 20バイアル(0.3 mL 用)
2. パイロセップ懸濁液(りん酸緩衝液に懸濁)…………… 20バイアル(0.77 mL)
3. LAL溶解液…………… 2バイアル(7 mL)
4. 洗浄液…………… 4バイアル(11 mL)
5. 検体希釈用緩衝液…………… 4バイアル(10 mL)
6. キャピラリー(シリコンチューブ付き、シリコンチューブとの接続部分には、グラスフィルター製のプラグが入っています。エンドトキシンプリー)…………… 20本

(キット以外に必要な機器)

- ・注射器(針ナシ, 10~20 mL 容) 1本
- ・3方コック
- ・アダプター(注射器とシリコンチューブを接続するもの 1.5 mm IDチューブ用, 日計製作所 TOPカタログ 1617-01等)
- ・目玉クリップ(口幅寸法 51, 大きさ中)
- ・トキシノメーター

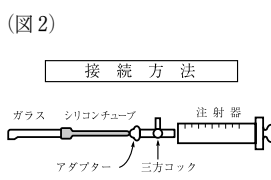
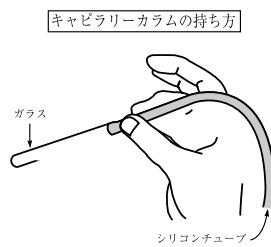
〔使用方法〕

I. 試料の調製

検体希釈用緩衝液で試料のpHは5付近に合わせて下さい。緩衝能の強いものについては酸でpH調整して下さい。その時なるべく液量を増やさない様に注意してください。通常の試料や検量線作成用標準エンドトキシン溶液では、検体希釈用緩衝液を10分の1量加えて下さい。

II. 操作手順

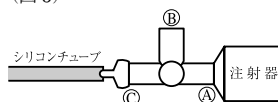
1. パイロセップ懸濁液を4~5回転攪拌転倒し、アルミキャップをはずします。
2. キャピラリーの入ったアルミホイ (図1) ルをはがし、キャピラリー(ガラス)の部分に手指が触れないようにキャピラリーとシリコンチューブの接続部分を持って取り出します(図1)。
3. パイロセップ懸濁液分注品にキャピラリーカラムの先端を入れ、3方コックとアダプターを介して注射器を接続します(図2)。
4. パイロセップ懸濁液をゆるく振り混ぜながら、内容液全量をキャピラリーカラムで吸引し、吸引が終わったら3方コックを切り替えて、注射器内に貯まった溶液を廃棄します(図3)。



※この時、パイロセップゲルは、グラスフィルターのプラグにトラップされてキャピラリー内に充てんされません。

5. キャピラリーのガラス部分に触れないように注意して検体を入れた試験管中にキャピラリーを入れ、3方コックを切り替えて検体を吸引します(図3)。吸引が終了したら、4.と同様に注射器内に貯まった溶液を廃棄します。

(図3)



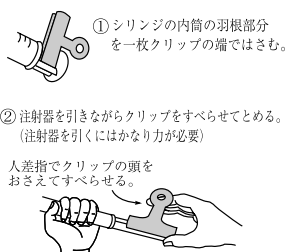
- ▶ パイロセップ懸濁液や検体、リムルス試液の吸引時→ ②を閉じる。
- ▶ 注射器内の液を捨てる時、注射器内に空気を導入する時→ ③を閉じる。

※この時、目玉クリップで注射器の内筒を止めておく事をお勧めします(図4)。
※5 mLの検体を吸引するのに約20分かかります。

6. LAL ES試薬をLAL溶解液 0.3 mLで溶解します。

(図4)

目玉クリップの使い方

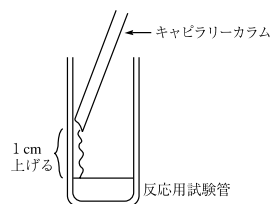


※LAL ESの溶解は使用直前に行ってください。すぐに使用できない場合には、冷蔵保存して、少なくとも1時間以内に使用して下さい。
※リムルス反応に阻害、促進などの影響を与える検体の場合は、洗浄液を適量(通常2~2 mL)吸引することによりゲルの洗浄を行って下さい。

7. 検体を吸引し終わったキャピラリーをLAL ES試液中に入れ、液面上昇してくるのを観察しながら注射器でゆっくりとLAL ES試液を吸引します。

(図5)

リムルス試液を吹き出す時



8. 液面がシリコンチューブとガラスキャピラリーの接続部から6 cmほど上がってくると直ちに3方コックを切り替えて外部から空気を注射器内に導入し、続いて3方コックを戻し注射器を押して注射筒内の空気でLAL ES試液をゲルと共にゆっくりと吹き出します。

※LAL ES試液をゲルと共に吹き出す際、キャピラリーの先端はLAL ES試液の液面から1 cmほど上の、試験管の壁面につけて、泡を入れないようにして下さい(図5)。また、LAL ES試液はゆっくりと吹き出して下さい。強く吹き出すと、キャピラリーカラムに詰めてあるガラスフィルターのプラグがはずれる可能性があります。
※3方コックを切り替えてもおおLAL ES試液の液面は上昇し続けますので、すばやく次の吹き出す操作に移って下さい。LAL ES試液が未滅菌のアダプターに接触しないようにして下さい。
※キャピラリーに少しゲルが付着して残っても問題ありません。また、検体毎に同じ程度の残存量にすれば問題ありませんが、もし多量にキャピラリー内にゲルが残った時は、もう一度内容を吸引して吹き出して下さい。

9. キャピラリー内のゲルをほぼ吹き出した後、気泡が試験管内に入っていないか確認し、大きい気泡(おおむね 2 mm以上)があれば指ではじいて壊してください。
10. 試験管の内容液をボルテックスミキサーで約 5 秒間攪拌し、トキシノメーター¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾を用いてゲル化時間を測定します*。(しきい値は通常 94.9%とします。) Wait time 5.0分に設定して下さい。
11. 試料と同様に測定した標準エンドトキシン溶液のゲル化時間を用いて検量線を作製します。Y軸にゲル化時間の2回対数値、X軸にエンドトキシン濃度の対数値をプロットし、最小自乗法で直線回帰を行います。

* 詳しくは「トキシノメーターの標準操作法」をご請求ください。

検量線例 (検体量 : 5.0 mL)

■線情報

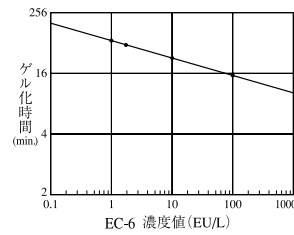
回帰式 : 一次式 Tg軸座標系 : loglog Tgデータ扱い : 全点使用

カーブ : $\log\log (Tg) = -0.08530 \log (C) + 0.2364$

r : -0.9996

範囲 : 14.60 - 53.60

単位 : EU/L Th = 94.9%



No.	設定濃度値(EU/L)	Tg(min.)	平均Tg(min.)
1	1.000	53.0	53.60
		53.4	
		54.4	
2	2.000	41.6	41.53
		41.2	
		41.8	
3	10.00	26.6	26.07
		26.0	
		25.6	
		25.6	
4	100.0	14.6	14.60
		14.8	
		14.4	
		14.4	

[参考文献]

1. Bang, F.B. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **98**, 325 (1956).
2. Levin, J. and Bang, F.B. : *Ibid.*, **115**, 265 (1964).
3. *The United States Pharmacopeia 22th, the National Formulary 17th, Supplement 8*, p.3349, U.S.Pharmacopeial Convention Inc. (1990).
4. 第十三改正日本薬局方, 26 (1996).
5. Kakinuma, J., Asano, T., Torii, H., and Sugino, Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434 (1981).
6. 中村隆範, 森田隆司, 平永万寿代, 宮田敏行, 岩永貞昭 : 日本細菌学雑誌, **38**, 781 (1983).
7. Iwanaga, S., Morita, T., Miyata, T., Nakamura, T., Hiranaga, M. and Ohtsubo, S. : *Bacterial Endotoxin*, Eds. Homma, J. Y., Kanegasaki, S., Luderitz, O., Shiba, T. and Westphal, O., p365, Verlag Chemie (1984).
8. Peason, F. C., Weary, M. and Bohon, J. : *Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test*, Eds. Watson, S. W., Levin, J. and Novitsky, T. J., p.247, Alan R. Liss, Inc. (1982).
9. Minobe, S., Nawata, M., Watanabe, T., Sato, T. and Tosa, T. : *Anal Biochem.* **198**, 292 (1991).
10. 舩田 誠, 美濃部敏, 福井知美, 縄田雅谷, 渡辺泰三, 柴谷武爾, 小川義之 : 薬学雑誌, **115** 136 (1995).

11. 土谷正和, 高岡 文, 時岡信之, 松浦脩治 : 日本細菌学雑誌, **45**, 903 (1990).
12. 大石晴樹, 畑山泰道, 白石浩己, 柳沢和也, 佐方由嗣, 薬学雑誌, **105**, 300 (1985).
13. Oishi, H., Takaoka, A., Hatayama, Y., Matsuo, T. and Sakata, Y. : *J. Parenter. Sci. Technol.*, **39**, 194 (1985).
14. Oishi, H., Fusamoto, M., Hatayama, Y., Tsuchiya, M., Takaoka, A. and Sakata, Y. : *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3012 (1988).
15. 大石晴樹, 和田正悟, 白石浩己, 小新堂 透, 辻野隆三 : 日本薬学会第116年会, 100, (1996).

製造発売元

和光純薬工業株式会社

大阪市中央区道修町3-1-2
電話 (06) 6203-3741 (代表)

1305K03