

ENDOSAFETIMES

In Vitro Products and Services Newsletter

찰스리버엔도세이프코리아(주) 서울특별시 서초구 양재동 333-5 한아름빌딩 6층 T:(02)2057-5200, F:(02)2057-5203

CHARLES RIVER
LABORATORIES
Endosafe® Products and Services

찰스리버엔도세이프코리아(주)

Vol. 1, No.2 October, 2007



이번호에서는...

이번 Endosafe Times에서는 최근 FDA의 승인을 받아 이슈가 되고 있는 Endosafe-PTS에 관하여 심층적으로 다루고자 합니다. PTS와 관련하여 가장 자주 받는 질문은 "PTS로 실험함에 있어 실험 결과의 다양성(variability)이 얼마나 되는가?" 하는 것입니다. 얼핏 보기에는 간단한 질문처럼 보일 수 있으나 질문에 대한 답변은 그리 간단치 않습니다. FDA 승인을 받은 모든 LAL 실험 방법은 LAL 시약을 만들에 있어 Standard가 되는 RSE(Reference Standard Endotoxin)에 대하여 최소한의 요구사항인 ± 2 배 오차 범위를 만족해야 합니다. PTS는 이러한 조건을 만족할 뿐 아니라 최소한의 요구사항을 넘어섭니다. 이러한 현상이 왜 발생하는지를 이해하기 위해서는 실험 결과에 어떠한 것이 영향을 미치는지, 그리고 이러한 영향을 최대한 줄이기 위해 PTS 플랫폼을 어떻게 디자인 했는지를 이해하는 것이 중요합니다. 이번 소식지를 통해 LAL 실험에 대해 좀 더 자세히 이해하고, 좀 더 정확하고 정밀한 LAL 실험을 수행하는데 도움이 되기를 기대합니다.

Bacterial endotoxin 실험, LAL(Limulus Amebocyte Lysate) 실험의 다양성

Dr. Hemnalini Kumar, Salesworth India Pvt. Ltd.

서두

고객에 의해 가장 많이 받는 일반적인 질문 중 하나는 실험자, LAL 시약의 제조사, 시약의 감도, 제품의 실험 방법 등의 차이에 의해 실험결과가 얼마나 차이가 나는지 하는 것입니다(실험 결과가 얼마나 다양할 수 있는지 하는 것입니다). 위와 관련하여 쓰여진 책과 다양한 과학 논문들을^{1,2} 살펴보면 실험의 다양성은 주로 3가지 주

된 요인에서 유래한다고 볼 수 있습니다 - 시약, 제품, 실험 방법.

이 소식지에서는 실험의 다양성(variability)의 원인 중 LAL 시약, 엔도톡신 그리고 LAL 실험 자체에 대해 좀 더 깊이 살펴보고자 합니다.

LAL 시약



LAL 실험에 사용하는 LAL 시약은 투구게 (*Limulus polyphemus*)의 면역반응을 이용하여 만든 시약으로서 투구게의 피에서 뽑은 혈구 세포를(amebocyte) 정제하여 만든 생물학제제입니다. 엔도톡신이 시약과 반응하여 gel을 형성하는 과정은 여러 단계의 반응을 거칩니다. 시약은 이러한 반응에 필요한 여러 가지의 효소와 조효소들의 복합물입니다. 시약은 추출물에서 하나의 효소만을 정제한 것이 아니라 투구게의 혈액을 조제한 혼합물이기 때문에 매 lot를 추출할 때마다 lot들의 효소 활성이 일정하도록 정밀하게 조절할 수 없습니다. 투구게의 혈액을 추출하여 제조하는 과정은 모든 LAL 제조사마다 비슷하나, 여러 가지 감도의 시약을 만들기에 있어 각각의 감도에 대한 각 제조사의 제조법(formulation)을 가지고 있습니다. 제조법(formulation)이란 정제한 혈구세포에 버퍼나(buffer), 계면활성제(detergents)등 여러 가지를 추가하는 것을 이릅니다. 이렇게 제조사별로 다른 제조법(formulation)이 다양성의 요인이 될 수 있습니다. FDA승인을 받은 모든 제조사는 시약을 출고(release)하기 위해 USFDA에 그들의 BLA (Biological License Application) fillings를 따라야 합니다. 이

렇게 만들어진 시약의 효소 활성은(시약의 감도 즉 λ 로 표시됨) FDA에서 공급하는 RSE(Reference Standard Endotoxin)를 통해 결정됩니다. 시약의 감도를 결정하는 시험은 RSE를 1EU/ml의 농도에서부터 1/2씩 희석하여 시약과 반응시킵니다. 시약의 감도가 2배수로 결정되기 때문에 여기서 시험상의 다양성이 생길 수 있는 요소를 가지고 있습니다; 예를 들어 시약의 감도가 0.125EU/ml로 결정된 lot의 실질적인 감도는 0.0625EU/ml과 0.125EU/ml 사이인 0.10EU/ml일 수도 있습니다.

그러나 RSE는 비용 면에서 비쌌 뿐 아니라 계속 소진되므로, 보통 LAL실험에는 사용하지 않습니다. 그 대신에 LAL시약 제조사에서는 매 lot의 시약에 대해 RSE와 비교하여 활성이 결정된 CSE(Control Standard Endotoxin)를 제공합니다. 각 lot별 LAL와 CSE의 조합 및 CSE의 활성은 RSE/CSE의 비율을 (EU/ng 값) 결정하는 실험법에 따라 실험하여 결정되어야 합니다. 이는 서로 다른 종류의 엔도톡신과 LAL 시약들을 RSE와 직접 비교 실험함으로써 LAL 실험에서 발생할 수 있는 엔도톡신과 LAL시약들 사이의 반응의 다양성을 초기에 조절함을 의미합니다. RSE/CSE의 비율은 성적서 상에 기재되어 있으며, 모든 LAL 시약과 CSE의 각 조합마다 다릅니다.

LAL 시약은 생물학제제로 만들어진 시약으로 LAL test는 생물학 분석법이라는 것, 그리고 생물학 분석법은 화학 분석법에 비해 보다 훨씬 많은 실험의 다양성이 있음을 항상 유념해야 합니다. LAL 시험이 토끼를 이용한 발열성 실험에 비하여 특이성이 뛰어나므로 실험자나, 검토자 모두 LAL 시험

이 생물학 실험이라는 것을 잊어버리는 경향이 있습니다. 부연 설명하자면, 화학 실험과 생물학 실험과의 차이점 중 하나는 화학 실험의 경우 validation시 요구사항에 대해 시험 방법이 없는 것을 들 수 있습니다. (엔도톡신의 경우 LAL 실험은 토끼 실험을 대체하는 생물학 실험입니다.)

엔도톡신(Endotoxin)

CSE로 사용되는 엔도톡신은 특성이 잘 알려진 적절한 박테리아를(*E. coli*)정제하여 만듭니다. CSE는 아주 순수하게 LPS(lipopolysaccharide)만을 정제한 것으로 특히 단백질을 포함하여, 다른 불순물이 오염되어 있지 않습니다. 이렇게 정제한 LPS에 사람의 혈청 알부민(Human Serum Albumin), PEG, 녹말과 같은 안정화 물질을 넣어 만들어집니다. 이러한 안정화 물질은 양성 대조 실험이나 검량선을 실험함에 있어 결과의 반복성과 재현성을 유지하기 위해 넣어줍니다. 이것은 실험에 있어 모든 변수가 허용된 오차범위 안에 들 수 있도록 하기 위해 아주 중요합니다.

반면에 자연상태의 엔도톡신이나 주위 환경에 존재하는 엔도톡신은 정제된 것이 아니며, LPS, 세포 막 단백질, 지방(phospholipids)들이 복합적으로 결합되어 있는 고분자입니다. 이 고분자는 박테리아의 일상적인 성장 주기에 따라 그람 음성균에서 주위 환경으로 계속적으로 방출됩니다. 주위 환경에 따라 자연상태의 엔도톡신은 서로 뭉쳐서 3차 거대 분자(lamellar, cubic, 6방 입체모양) 구조를 이루거나, 때로는 정제된 엔도톡신보다 단백질과 지질이 더 적게 포함되어 있기도 합니다³.



LPS(모든 그람 음성 균마다 거의 일정하게 있다고 알려져 있습니다.)는 크게 3부분으로 이루어져 있습니다-Lipid A, Polysaccharide, O-specific side chain. 이중 몸에 들어가 활성을 띄는 Lipid A의 독성 및 반응성은 각 박테리아 종이 가진 LPS에 따라 다르다는 학설입니다. 실제 LAL 시약과 반응하는 부분도 이 Lipid A부

분입니다. LPS는 주로 이중 막 구조로 안쪽에 hydrophilic(물에 잘 녹지 않은 성질)한 lipid A가 위치한 lamellar구조를 하고 있어 생물학적 활성이 없거나 거의 없습니다⁴. 이러한 구조적 특성이 자연 상태의 엔도톡신이 LAL 시약과 반응하는데 나타날 수 있는 결과의 다양성에 영향을 주므로 액체 안에 있는 이 거대 엔도톡신 분자의 구조와 준

비 방법이 중요한 요소중의 하나라고 할 수 있습니다. LAL 시약 제조사들은 엔도톡신과 시약이 정확하게 반응하게 하기 위해 시약 제조 시에 +2가 양이온(Mg++나 Ca++) 버퍼나, 계면활성제 등과 같은 물질을 넣어 각 회사만의 고유한 제조법(formulation)을 이용하여 시약을 제조 합니다.

LAL 실험 방법과 실험실에 의한 영향

LAL실험 방법에는 크게 정성 분석 방법인 겔화법(Gel-clot)과 정량 분석 방법인 키네틱 방법(Kinetic method)이 있습니다.

겔화법(Gel-clot Method)

겔화법에는 샘플의 엔도톡신이 적합/부적합인지만을 판단하는 한도시험법과 샘플의 엔도톡신 농도를 대략적으로 판단하는 간이정량법이 있습니다. 두 방법 모두 CSE를 이용하여 시약의 감도를 포함한 연속된 4농도(2λ , λ , $1/2\lambda$, $1/4\lambda$)의 스탠다드를 만들어 실험합니다(감도확인 시험). 이러한 감도 확인 시험은 최소한 1번씩 매일 처음 샘플을 실험할 때 같이 실험하며, 같은 날 실험한다 하더라도 시약의 lot나 CSE의 lot 혹은 실험 조건이 바뀌면 다시 실험합니다. 실험방법과 관련한 자세한 사항은 FDA Guideline(1987)의 부록C 혹은 미국 약전(USP) 85장 박테리아 엔도톡신 시험법(<85> Bacterial Endotoxins Test)을 참조하시기 바랍니다⁵. 겔화법 실험 시 연속된 스탠다드의(2λ , λ , $1/2\lambda$, $1/4\lambda$) 종말 점이 감도의 ± 2 배 범위에

들어가면 유효합니다(이는 LAL실험 자체가 근본적으로 ± 2 배의 오차/변이를 내재하고 있음을 의미합니다). 감도확인 시험결과가 유효하다는 것은 실험에 사용하는 액세서리 및 양성제품대조(PPC-Positive Product Control/ 감도의 2배 농도)가 실험에 적합하다는 것을 의미합니다. 실험은 2반복으로 이루어지며, 모든 겔화법 시험에서 양성제품대조(PPC-Positive Product Control)의 결과는 반드시 양성으로 (겔이 형성됨) 나와야만 결과가 유효합니다.

키네틱 방법(Kinetic Method)

정량 분석 방법에는 엔도톡신 농도에 따른 색(노란색)의 증가를 보는 비색법과 엔도톡신 농도에 따른 탁도의 증가를 보는 비탁법이 있습니다. 두 가지 방법 모두 plate 각 well의 탁도/노란색의 증가를 실시간으로 측정할 수 있는 스펙트로포토미터(Spectrophotometer)와 소프트웨어가 필요합니다. 실험 데이터는 엔도톡신 전용 소프트웨어를 통해 분석되어 엔도톡신 단위로(Endotoxin Unit) 결과가 표시됩니다.

실험 과정은 CSE(Control Standard Endotoxin)를 이용하여 2-log, 3-log 농도의 스탠다드 엔도톡신을 만들어 샘플과 같이 실험합니다. 샘플의 엔도톡신 농도는 이 스탠다드 엔도톡신의 반응 시간 및 농도를 이용하여 도출한 검량선을 기본으로 계산됩니다. 실험은 2반복으로 수행하며, 몇 가지 판정기준(스탠다드의 R값, NWC의 반응 시간, CV%, PPC의 회수율 등)을 만족해야 유효한 결과입니다. 모든 정량 분석 방법에서 양성제품대조(PPC-Positive Product Control)의 회수율은 이론적으로 넣어준 값의 50~200% 사이의 값이 나와야 유효합니다. 일반적으로 RSE(Reference Standard Endotoxin)를 이용하여 실험한 검량선은 CSE나 자연상태의 엔도톡신을 이용하여 실험한 검량선과 기울기면에서 약간의 차이가 있습니다. 이러한 기울기의 차이가 결과의 다양성에 원인이 될 수 있으며, 샘플의 엔도톡신 값이 스탠다드 농도의 가장 높은 농도나 가장 낮은 농도도 가까울수록 더 영향을 받습니다.

액세서리 및 실험자간에 의한 영향



희석 튜브, 반응 튜브(borosilicate 혹은 flint), 피펫, Tip, 96-well plate 등 모든 액

R값) 다르게 나올 수 있습니다.

세서리가 실험 결과에 영향을 줄 수 있습니다. 실험자의 실험 숙련도 또한 실험 결과에 영향을 주는 또 다른 원인입니다. 즉 LAL 시약의 lot, 물(LRW=LAL Reagent Water) 외에 실험에 사용하는 모든 액세서리 및 기자재가 동일하다 하더라도 파이프팅이나 엔도톡신 스탠다드를 준비하는 과정, 희석하는 과정에서의 작은 차이가 겔화법의 감도 확인 시험 시 반응 종말점이(정량 분석의 경우

정량 분석 시험 시 검량선의 범위를 낮은 농도까지 사용할 경우(실험할 수 있는 검량선의 가장 낮은 농도는 0.005EU/ml입니다.) 실험 기자재 및 액세서리, 실험자의 숙련도에 의한 영향으로 엔도톡신 농도가 높게 나올 수 있습니다. 96 well-plate와 tip 또한 영향을 줄 수 있으므로 검증된 제품을 사용해야 합니다. 이외에도 실험자의 숙련도에 의한 영향으로 쉽게 발생할 수 있는 요인으로 양성제품대조(PPC-Positive Product Control)에 엔도톡신을 넣는 과정에서의 파이프팅의 오차(10ul라는 적은 양을 분주하므로 미미한 오차에 의해 회수율이 다르게 나올 수 있습니다.), 시약을 분주하는 과정에서의 well간 교차오염 등이 있습니다.

〈표1 액세서리 재질에 따른 영향〉

	플라스틱재질	유리재질
R값	- 0.9868	- 0.9979
실험 결과 나온 검량선에 각 스탠다드 농도의 반응 시간을 대입하여 다시 계산한 값		
5.0 EU/ml	6.22	4.59
0.5 EU/ml	0.32	0.59
0.05 EU/ml	0.06	0.05
알고 있는 엔도톡신 농도를 샘플처럼 실험하여 얻은 값		
0.5	0.85	0.62
0.06	0.1	0.058

〈표1〉은 액세서리 재질이 실험에 미치는 영향에 대한 예시입니다. 각 액세서리 재질에 따라 스탠다드 농도의 반응시간이 다르고 각 스탠다드에 대비하여 나온 샘플의 엔도톡신 농도 또한 다르게 나온 것을 알 수 있습니다.

제품의 간섭에 의한 영향

제품에 대해 LAL 실험을 하기 위해서는 일상실험을 하기에 앞서 우선 예비 시험을 통

해 제품의 간섭 경향(반응저해 혹은 반응 촉진)을 파악한 후 간섭이 없는 농도(Non-Inhibitory Concentration=NIC)에서 간섭

인자확인시험을 통해 실험 조건을 검증한 후 이 조건에서 일상실험을 수행합니다. 제품 lot간 제조 공정의 변화는(첨가물, 주원



료, 용기 등의 변화) 제품의 간섭 패턴에 영향을 주어 실험결과에 영향을 줍니다.

제품에 엔도톡신이 있을 경우 제품의 특성에 따라 다르게 반응할 수 있습니다. 만약 제품의 특성에 의해 lipid A 부분이 좀더 많이 반응할 수 있도록 구조적 변화가 일어난다면, lipid A가 LAL 시약과 더 많이 반응하여 엔도톡신 농도가 높게 나올 것입니다.

방법적 측면에서의 영향

겔화법의 경우 감도확인 시험 시 반응 종말점의 결과 값을 2λ에서 1/2λ(0.5λ) 사이를 유효한 범위로 보고 있으며, 이는 LAL 실험 자체가 근본적으로 ±2배(50%~200%) 오차를 인정하고 있음을 의미합니다. 그러므로 샘플내의 엔도톡신 농도를 겔화법을 이용하여 간이 정량 함에 있어 좀 더 정확한 엔도톡신 농도를 알고자 희석배수를 2배 이내로 실험하는 것은 무의미 하며, 불필요합니다.

정량 분석의 경우 또한 제품 양성 대조(PPC-Positive Product Control)의 회수율을 50%~200% 사이를 유효한 범위로 보고 있습니다. 어떤 제품의 경우 2가지 방법 즉 겔화법과 정량 분석법으로 실험할 경우 같은 샘플이라 할지라도 회수율이 확연하게 차이가 날 수 있습니다. 겔화법으로 실험한 제품 양성 대조(PPC)의 결과가 양성으로 나왔다 하더라도 정량분석 결과는 이따금 60%밖에 안 나올 수도 있습니다. 비록 60%

가 유효한 범위 안에 들기는 하지만, 이렇게 회수율이 낮게 나올 경우 회수율에 영향을 준 샘플의 간섭 작용에 의해 샘플의 엔도톡신 농도 또한 영향을 받을 수 있습니다(원래의 농도보다 적게 나올 수 있습니다). 이러한 겔화법과 정량분석법간의 결과 차이는 제품 양성 대조(PPC)를 실험하는 방법의 차이에서 기인한다고 볼 수 있습니다. 겔화법의 경우 제품 양성 대조는 시약 감도의 2배가 되는 2λ 농도의 CSE를 넣어주며, 샘플에 간섭이 있어 이 중 λ만이 반응하였다 하더라도 결과는 양성으로 나타날 수 있습니다(1/2λ 농도만이 반응하여도 양성 결과가 나올 수 있습니다). 반면에 정량 분석의 경우 스탠다드의 중간 농도가 되도록 CSE를 넣어준 후 넣어준 농도와 스탠다드를 이용하여 도출된 반응한 농도를 정확하게 계산하여 %로 나타냅니다. 겔화법과 정량분석법간의 실험결과가 차이가 난다면, 겔-키네틱 검용시약인 KTA(0.015EU/ml) 시약을 이용하여 결과를 비교해볼 수 있습니다.

실험 결과가 다양하게 나오는 원인으로 방법적인 측면에서의 영향 중 또 다른 한 가지는 시약의 감도를 바꾸는 경우입니다. 낮은 감도(예를 들어 0.125EU/ml)에서 높은 감도(예를 들어 0.03EU/ml)로 시약의 감도를 바꿀 경우 시약의 제조법(formulation)이 달라지므로 이 제조법(formulation)의 차이로 인해 샘플의 엔도톡신 농도가 다르게 나올 수 있습니다.

결론적으로 비록 LAL 실험적 특성 상 결과변이의 여러 요인을 가지고는 있으나, USP(미국 약적)과 USFDA Guideline 상에는 ±2배 내의 오차만을 허용한다는 것을 유념해야 합니다. 그러므로 제품의 LAL 실험 시 같은 제품을 다른 실험실에서 실험했을 경우 2배 오차 범위를 감안하여 MVD에서 엔도톡신 기준에 정확히 맞추어 실험을 하는 것이 아니라 내부 기준으로 2~4배의 안전요소를 두어 실험할 것을 강력히 추천합니다.

이와 관련하여 Karen McCullogh가 FDA

〈표2〉 제품의 간섭에 의한 영향

회수율 %	0.5EU/ml 샘플의 엔도톡신 값
69 %	0.39 EU/ml
90 %	0.50 EU/ml
101 %	0.56 EU/ml
104 %	0.57 EU/ml

〈표2〉는 제품의 회수율이 실험에 미치는 영향에 대한 예시입니다. 회수율에 따라 엔도톡신 농도가 0.5EU/ml인 샘플의 결과 값이 다를 수 있습니다.

직원 이었던 Terry Munsen 씨에게 질문하였으며, 질문 내용과 답변 내용은 아래와 같습니다.⁶⁾

질문 : 만약 샘플을 제조회사가 다른 3종류의 시약으로 실험했을 때 실험 결과가 최대 8배까지 차이가 난다면 어떻게 해야 하나요?

답변 : 실험함에 있어 3개 시약의 최대 반

응 억제 종말점을 이용하십시오. 만약 결과가 확연히 차이가 난다면 가장 높은 값(최악의 경우를 감안하여)을 취하십시오.

위의 답변은 LAL 실험 시 결과 값이 차이가 나거나 다양한 실험 상황에 대해 적용할 수 있는 가장 좋은 방법이라고 할 수 있습니다. 물론 샘플에 엔도톡신이 없거나 아주 극히 적은 양만이 있다면 이러한 상황은 발생하

지 않습니다. 그러나 샘플에 엔도톡신이 어느 정도 있거나 특히 엔도톡신 기준에 가까운 농도의 엔도톡신이 있다면 이러한 결과의 변이에 관한 문제는 두드러지며 이럴 경우 엔도톡신 결과는 최악의 경우 즉 엔도톡신 농도가 가장 높은 결과를 취하는 것이 좋습니다.

참고 문헌

1. Williams, Kevin L., Endotoxins, Pyrogens, LAL Testing, and Depyrogenation, Second Edition
2. McCulloch, K. C. and C. Weidner-Loeven, Variability in the LAL test : Comparison of Three Kinetic Methods for the Testing of Pharmaceutical Products, J. Parent. Sci. Technol., 1992, 44(1)
3. Brandenburg, K., et al., Conformation of Lipid A, the Endotoxic Center of Macterial Lipopolysaccharide. J. of Endo. Res., 1996, 3(3)
4. Appendix C : 1987 FDA " Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices"
- Appendix B : US Pharmacopoeia <85> Bacterial Endotoxin Test
5. Rietschel and et al., Bacterial Endotoxins : Molecular Relationship of Structure to Activity and Function, FASEB, 1994, Feb 18
6. Munson, Terry E., ex-CDER/FDA, Department of Health and Human Services, 1991, Feb 5 : Answers to LAL Users Forum Questions (c/o Karen McCulloch)

실험과 관련하여...

처음으로 정량 분석을 실험하는 고객이 일반적으로 접하는 문제는 거품에 의한 영향입니다. 정량 분석기기의 원리는 각 96well의 흡광도의 변화를 측정하는 것입니다. 거품은 샘플을 well의 한쪽으로 몰리게 하거

나, well의 중간이 비거나 심지어는 실험하는 동안 거품이 더 커질 수도 있습니다. 그러므로 실험 결과의 재현성을 위해서는 거품이 생기지 않도록 샘플 및 시약을 분주하는 것이 중요합니다. 이러한 사항과 관련하

여 PTS 리더기에 내장된 소프트웨어는 샘플 분주 과정에서 거품이 발생하여 샘플의 적절한 양이 분주 되지 않았을 경우 사용자에게 이러한 정보를 제공하는 기능을 갖추고 있습니다.



Laboratory Notebook

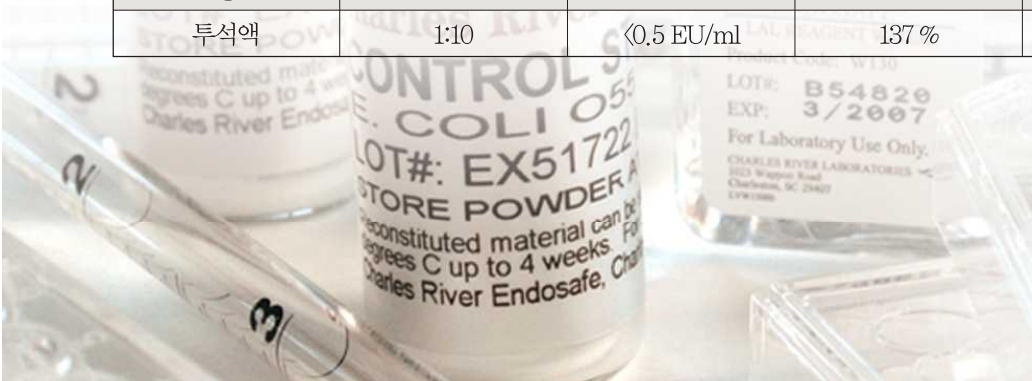
PTS 카트리지가 FDA 승인을 받음에 따라 PTS를 이용하여 최종 생산품에 대하여 엔도톡신 시험을 할 수 있게 되었습니다. 이에 따라 PTS로 엔도톡신 시험을 하고자 할 경우 기존의 제품들에 대해 validation을 수행하여야 합니다. PTS 카트리지에 사용된 시약은 기존의 FDA 승인을 받은 비색법 시약입니다. 그러므로 기존의 엔도톡신 실험을 비색법으로 수행하였다면 비색법으로 validation을 수행한 희석 배수에서 PTS 카트리지를 이용하여 실험하여도 결과가 잘 나올 것이라고 예상할 수 있습니다. 비탁법과 비색법 간에는 시약의 조합이나 실험 원

리가 틀리므로 기존에 비탁법으로 실험하였을 경우 PTS 카트리지를 이용하여 실험한 결과와 차이가 있을 수 있습니다. 기존에 validation을 수행했던 희석배수에서 PTS 카트리지를 이용하여 validation을 수행하고자 한다면 실험 전에 우선 시약의 감도와 엔도톡신 기준을 확인해야 합니다. 비색법을 이용한 스탠다드 범위와 PTS 카트리지의 스탠다드 범위가 다를 경우 MVD(Maximum Valid Dilution- 최대 유효 희석 배수)가 달라지므로 유의해야 합니다. PTS 카트리지를 이용한 샘플 validation은 결정된 MVD를 넘지 않는 희

석 배수에서 3lot를 실험하여 각 샘플이 엔도톡신 기준을 넘지 않고 회수율이 50-200% 사이에서 각 CV%가 25% 이내이면 됩니다. 아래의 <표3>은 PTS 카트리지를 이용한 실험과 기존의 비색법 시약을 이용한 실험을 비교한 것으로 실험 결과가 유사하게 나오는 것을 확인 할 수 있습니다. 샘플에 엔도톡신이 없을 경우 PTS 카트리지를 이용하여 실험한 결과 또한 엔도톡신이 없다고 나오며, 샘플에 엔도톡신 있을 경우 PTS 카트리지로 실험한 결과 값과 비탁법 시약으로 실험한 결과값은 2배 오차 범위내의 값입니다.

<표3> PTS vs 비색법

샘플	희석배수	PTS 결과		비색법 결과	
		엔도톡신 농도	회수율	엔도톡신 농도	회수율
3% NaCl	1:10	<0.5 EU/ml	102 %	<0.5 EU/ml	104 %
PET	1:10	<0.5 EU/ml	82 %	<0.5 EU/ml	118 %
Protein	1:10	0.86 EU/ml	158 %	1.5 EU/ml	143 %
의료용구 용출액	1:1	0.23 EU/ml	81 %	0.46 EU/ml	87 %
HSP 70	1:1000	290 EU/ml	104 %	380 EU/ml	149 %
FBS	1:100	26 EU/ml	108 %	47 EU/ml	184 %
FBS Lactated Ringers	1:1	<0.5 EU/ml	120 %	<0.5 EU/ml	101 %
투석액	1:10	<0.5 EU/ml	137 %	<0.5 EU/ml	113 %



Charles River Endosafe Korea News ...

1. 2007년 11월 9일 고려대학교 BK21 생명공학원 사업단과 한국 바이오 산업협회 주관 및 본사(찰스리버엔도세이프코리아) 후원으로 엔도톡신 시험법 워크샵이 고려대학교 생명과학관에서 열릴 예정입니다. 참가 문의는 홈페이지 <http://www.bioqc.org>를 참조하시기 바랍니다.

2. 보다 빠른 기술지원을 위하여 긴급 기술지원 전화와 이메일을 운영하고 있습니다. 이메일 endo-asia@crl.com, 전화 010-3740-2949와 을 이용하시면 보다 빠른 기술지원을 받으실 수 있습니다.

3. PTS(Portable Test System) 데모를 원하시는 분은 언제든지 연락주시기 바랍니다. 현재 연말까지 PTS 특판 행사를 실시하고 있습니다.

4. 찰스리버엔도세이프코리아의 소식은 인터넷 홈페이지 www.endosafe.kr에서 보실 수 있습니다. 현재 임시 홈페이지로 운영되고 있으며, 조만간 완성된 모습을 보실 수 있습니다. 홈페이지를 통해서 매달 진행되는 Gel-clot LAL Workshop 과 Kinetic LAL Workshop 일정을 확인하시기 바랍니다.

The Endosafe(r)-PTS™ was
licensed by the FDA for
in-process and final product release
of pharmaceutical products.

