

# サンプル:ライセート試薬の比率 = 1:1の重要性と Sievers Eclipse\* のバリデーションプロセス

## 目的

新たなエンドキシン試験法を導入するためには、新旧測定器の同等性を示すことが極めて重要です。Sievers\* Eclipse 比率検証試験では、一般的に96ウェルマイクロプレートに使用される「サンプルとライセート試薬(LAL試薬)の比率=1:1」を、Eclipseマイクロプレートを使用した場合でも達成できることを検証しました。サンプルとLAL試薬の比率を1:1に保つことで、一貫した生化学的相互作用を維持します。Sievers Eclipseは試薬使用量を減らしながらも、一定の比率を維持することで、既存の方法と同等の測定結果が得られることを確認できます。



## 背景と重要性

96ウェルマイクロプレートを用いたカイネティック比色法では、各ウェル内で標準品とサンプルを試薬と混合し、色の経時変化を観察します。正確な測定結果を得るためには、サンプル量とLAL試薬量を正確に管理する必要があります。USP<85>では、容量比 / 培養時間 / pHなどの特定の試験パラメータに関しては、LAL試薬メーカーの取り扱い説明書(IFU)に従うことが記載されています。

IFUでは、2つの方法でサンプルと試薬の比率を調製する方法を示しています。

- (1) サンプルと試薬の比率を 1:1 にする
- (2) LAL試薬(100 $\mu$ L)を各ウェルに添加した後、エンドキシン試験用水、エンドキシン標準品、製品サンプル、ポジティブコントロールをそれぞれ100  $\mu$ Lずつ添加する

サンプルと試薬の比率を1:1にするように指示するIFUでは、最適な感度を得るために、ウェルの総量を200 $\mu$ Lではなく100 $\mu$ Lのように推奨しています。IFUでは、ウェルの総量ではなく、1:1の比率がこのアッセイにとって最重要であるとしています。各ウェルのサンプルと試薬の比率が1:1であれば、反応は正確に進行し、同等の結果が得られます。

サンプル量と試薬量の比が1:1ではない場合、反応速度と全体的なアッセイ結果に大きな影響を与えます。ウェルの総量に関係なく、反応時間や発色時間が変化して、エンドキシン濃度に影響を与える可能性があります。

比率が一定ではない場合、反応混合物のpHが6~8の推奨範囲外に変化し、アッセイ全体の反応速度に影響を与える可能性があります。

## 1:1比率検証試験

1:1比率検証試験では、Sievers\* Eclipseのマイクロプレートの104ウェルに、LAL試薬とサンプルが正確な比率で分注されることを検証しました。この検証では、Sievers\* Eclipseマイクロプレートと、水バイアルと発色剤バイアルで構成される「Sievers\* Eclipse 1:1比率検証キット(STD 85000-01)」を使用します。分析を開始する前に、Eclipseソフトウェアの指示に従い、対応するセグメントやLALポートへ水と発色剤をセットします。通常の分析と同様に処理しますが、1:1比率検証試験は、カイネティック酵素反応を使用しないため、試験時間が短縮されます。

## 1:1比率検証試験の詳細レポート

Eclipseソフトウェアから分析完了後に出力されるレポートには、一般的な情報(測定器の製造番号、Eclipse マイクロプレートの情報、1:1比率検証サンプル情報など)に加えて、104個のウェルそれぞれの平均光学密度が表示されます。

レポートの下部には、プレートの発色剤部分の全体平均光学濃度とプレートの水部分の全体平均光学濃度が表示されます。プレートの半分を使用して発色剤と発色剤を混合し、残り半分では、発色剤と水を混合することで、この2つの平均値が得られます。以下の式1により比率値を求めて混合が成功したかどうかを判断します。比率値は通常分析時にサンプルとLAL試薬がどのように混合されるかを示します。

式1:

$$\frac{\text{発色剤の平均値}}{\text{水の平均値}} = \text{比率値}$$

発色剤と発色剤を混合したウェルでは、理想比率値は1(発色剤の平均値)です。発色剤と水を混合したウェルでは、発色剤を2倍希釈した濃度となり、理想比率値は0.5(水の平均値)です。発色剤の比率値を水の比率値で割った際の、理想比率値は2です。これは、各ウェルへの発色剤と水の添加量が全く同じであることを示します。エンドトキシンの全体的な反応速度曲線および回収率には影響を与えない比率値の合格基準は1.90~2.10です。

## 結論

Sievers Eclipseマイクロプレートは、独自の流路形状と計量チャンバーにより、サンプルとLAL試薬を正確にウェルへ分注できます。すべてのアッセイにおいて、104個のウェルに、1:1の比率でサンプルとLAL試薬が正確に分注されます。

LAL試薬メーカーのIFUでは、サンプルと試薬の比率を1:1にするか、一定量のサンプルと試薬を添加するように記載されていますが、必ずしも200 µLが総量とは限りません。通常、光路長を長くするか、より大きい容量を正確にピペティングすることで精度を向上させるために、推奨容量が設定されています。また、一般的な96ウェルマイクロプレートのウェルサイズで推奨される容量は、75~200 µLです。「効率的で現実的な測定を行うためのマイクロプレートウェルに推奨される最小容量は、ウェルの最大容量の1/3以上です。」<sup>1</sup>これにより、ウェルの総量ではなく、すべてのウェルでサンプルとライセートの比率が1:1であることが重要であると言えます。

Sievers Eclipseの1:1比率検証試験では、ウェルの総量が大幅に少ない場合でも、すべてのウェルにおいて重要な1:1の比率が常に達成されることが検証されました。生化学的相互作用が維持され、試験結果が有効であると言えます。本検証試験は、毎年の定期点検時の実施が推奨されています。

### 参考文献

1. Pusterla, Tobias, PhD. "Which is the best microplate for my assay?" BMG Labtech, 2018 May 30. <https://www.bmglabtech.com/which-is-the-best-microplate-for-my-assay/>

(翻訳: セントラル科学株式会社)