

エンドトキシン計 Sievers Eclipseにおける 同等性のあるオンセット光学濃度 (OD) 値の決定

Application Note

目的

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で使用されるオンセット光学濃度 (Onset OD値) が96ウェルマイクロプレート試験と同等であることを紹介します。Sievers Eclipseのマイクロプレートは、形状と光路長が従来と異なるため、ランベルト・ベールの法則と吸光度の式を使用してOD値を再計算する必要があります。カイネティック比色法では、標準品とサンプルのオンセット時間を決定するためにオンセットODが使用されるため、これらのOD値の同等性は重要です。

概要

カイネティック比色法では、ODの変化とエンドトキシン濃度が反比例の関係であることを利用しています。ODは「分光光度計で測定した、特定の波長の有機分子の懸濁液または溶液に吸収された光の量を測定したもの」¹で、検出部では標準品またはサンプルとライセート (LAL) 試薬を添加して混合したウェルを光が通過する際のOD値を経時変化に測定します。カイネティックアッセイにおいて、オンセットODは反応開始または反応時間を決定するために使用される定数です。高濃度エンドトキシンを含むサンプルや標準品は、迅速に反応して黄色に変色するため、フォトダイオードに到達する光が少なくなりOD値が上昇します。オンセット時間 (オンセットODに到達するまでの時間) が短いほど、サンプルに含まれるエンドトキシンが多くなります。

各アッセイが完了すると、オンセット時間の対数とエンドトキシン標準品の濃度の対数に関する検量線が作成されます。サンプルと反応干渉因子 (ポジティブコントロール) のオンセット時間と検量線を参照することで、エンドトキシンの測定値を求めます。オンセットOD値は、アッセイ毎に最適化されており、各メーカーの取扱説明書 (IFU) で説明されています。オンセットOD値は、1つの値を設定する方法、値の範囲を決めて構成する方法、どちらも使用可能です。

ランベルト・ベールの法則

OD値は、ランベルト・ベールの法則とマイクロプレートの厚さ (光路長) を用いて決定されます。ランベルト・ベールの法則は「溶液の濃度は光の吸収に正比例する」²と述べています。

ランベルト・ベールの法則

$$A = \epsilon bc$$

A = 吸光度 (単位なし)

ϵ = モル吸光率 ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

b = 光路長 (cm)

c = 化合物濃度 (mol L^{-1})

この式を十分に理解するためには、吸光度の式も理解する必要があります。吸光度は光の強度を利用して測定します。強度は、参照セル (IO) と、サンプルセル (I) で測定されます。吸光度は以下の式で求められます。

吸光度の式

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

吸光度を検討する際には、ウェルの形状や大きさが重要です。同じ溶液を測定しても光路長1cmの立方体のウェル内の溶液は、光が相互作用する分子が少ないため、光路長100cmのチューブ状のウェル内よりも吸光度値が低くなります。Sievers Eclipseマイクロプレートのウェルは、96ウェルマイクロプレートのウェルとは形状と光路長が異なるため、上記の2つの式を使用してオンセットOD値を再計算する必要があります。

Sievers EclipseとのOD同等性

96ウェルマイクロプレートの光路長は、メーカーによってわずかに異なります。これは、96ウェルマイクロプレートのウェルの底が円錐形であることが多いためです。数社のプレートメーカー、機器メーカー、試薬メーカーの96ウェルマイクロプレートのウェルに溶液を200 μ L添加したところ、光路長は5.707mm~6.306mmとなりました。

そこで、各社の96ウェルマイクロプレートを使って測定を行い、光路長を決定しました。そして、以下の式を用いて96ウェルプレート試験のオンセットOD値からEclipseに適したOD値を求めました。

$$OD_{\text{Eclipse}} = OD_{\text{96 well}} \times \left(\frac{\text{Path Length}_{\text{Eclipse}}}{\text{Path Length}_{\text{96-Well}}} \right)$$

96ウェルマイクロプレートとEclipseマイクロプレートのそれぞれの光路長から、EclipseのOD値を求めました (表1)。

表1. Sievers EclipseのオンセットOD値**

96ウェルプレート オンセットOD値	Sievers Eclipse オンセットOD値
0.03	0.01296
0.05	0.0216
0.08	0.03456
0.10	0.0432
0.15	0.0648
0.20	0.0864

** Sievers Eclipseで使用

96ウェルマイクロプレートとEclipseマイクロプレートの並行試験を行い、各OD値によるエンドトキシン濃度、反応干渉因子試験、CV (変動係数) が同等であることを検証しました。試薬メーカーからOD値の範囲が提供されている場合、範囲全体においてSievers Eclipseで検証しました。すべての範囲において同等であることが検証されました。

Sievers Eclipseはアッセイ完了後にオンセットOD値を変更することができないため、現在複数のオンセットOD値を使用している場合は、適切にテストを行い、最適なオンセットOD値を決定することを推奨します。表1を使ってオンセットOD値を決定することができます。

まとめ

96ウェルマイクロプレートとEclipseのオンセットOD値は異なりますが、同等な測定結果を得ることができます。詳細については、最寄りのSieversの担当者またはアプリケーションの専門家にお問い合わせください。

参考文献

1. McCullough, Karen Zink. The Bacterial Endotoxins Test: A Practical Approach. DHI Publishing, LLC, 2011.
2. Helmenstine, Anne Marie. Beer's Law Definition and Equation. ThoughtCo, 2019. <https://www.thoughtco.com/beers-law-definition-and-equation- 608172>

(翻訳：セントラル科学株式会社)