

エンドトキシン計 Sievers Eclipse を使用した ライセート試薬の保存評価

Application Note

目的

ライセート試薬をマイクロチューブに入れて -20°C で2週間保存して、エンドトキシン計 Sievers Eclipse で測定した際の性能を評価しました。この検証で評価したマイクロチューブは、Thermo Scientific[†] スクリューキャップマイクロチューブ（カタログ番号：3488PK、2.0mL）です。エンドトキシン計 Sievers Eclipse では、1回のアッセイに必要なライセート試薬は1mL だけです。ただし、市販のライセート試薬の容量は1mL 以上の試薬調製水（LRW）で再溶解されます。このアプリケーションノートでは、1度に1回のアッセイ（マイクロプレート1枚）のみを行う場合でも、1本のライセート試薬をすべて使うためのデータとガイダンスを提供します。

背景

エンドトキシン計 Sievers Eclipse は、カイネティック比色法により検量線と反応干渉因子（PPC）を含む最大21個のサンプルを分析できます。Sievers Eclipse のマイクロプレートには、あらかじめエンドトキシン一次標準品（USP-RSE）と PPC が充填されており、わずか1mL のライセート試薬で、各アッセイで最大5点（50~0.005 EU/mL）の検量線を検証できます。

ライセート試薬（Endochrome-K[‡] と Chromo LAL[§]）のメーカーの使用説明書（IFU）によると、ライセート試薬は再溶解後は -20°C で2週間冷凍保存できます。今回、Sievers Eclipse で使用するライセート試薬を一度溶解して、2本の Thermo Scientific スクリューキャップマイクロチューブに1mL ずつ入れて -20°C で保存できることを評価しました。

実験計画

評価では、Thermo Scientific スクリューキャップマイクロチューブ（カタログ番号：3488PK、2.0 mL）を使用しました。ライセート試薬は Associates of Cape Cod（ACC）製の Chromo-LAL 試薬（ロット：337082）と Charles River Laboratories（CRL）製の Endochrome-K 試薬（ロット：N4253E）の性能を3つの保存期間（0日目、7日目、14日目）で評価しました。各保存期間において、3枚のマイクロプレートを使って、5点検量線（50 ~ 0.005 EU/mL）とサンプル21検体（サンプルとして試薬調製水（LRW）を使用）を評価しました。

0日目：使用説明書（IFU）に従って Endochrome-K と Chromo-LAL を4本ずつのバイアルに調製しました。各試薬のバイアル1本ずつを0日目の評価に使用しました。残りの6本のバイアルの試薬を1.1 mL ずつ12本の Thermo Scientific マイクロチューブに分注してラベルを貼りました。試薬を分注した12本のマイクロチューブを -20°C で保管しました。0日目のテストは、各試薬（Endochrome-K と Chromo-LAL）において Sievers Eclipse マイクロプレートを3枚ずつ使用し、5点検量線（50 ~ 0.005 EU/mL）とサンプル21検体（サンプルとして試薬調製水（LRW）を使用）を評価しました。0日目の検量線と LRW サンプルの結果については、付録Aを参照してください。

[†] Trademark of Thermo Fisher Scientific Inc.

[‡] Trademark of Charles River Laboratories, Inc.

[§] Trademark of Associates of Cape Cod, Inc.

7日目：−20°Cで凍結した各ライセート試薬を使って6つのアッセイを行いました。6本の試薬を冷凍庫から取り出し、解凍して室温に戻しました。残りの6本の試薬は引き続き−20°Cで保存しました。次に、7日目の試薬を使ってEclipseで測定しました。検量線の結果と7日目のサンプルの結果については、付録Bを参照してください。

14日目：−20°Cで凍結した各ライセート試薬を使って6つのアッセイを行いました。6本の試薬を冷凍庫から取り出し、解凍して室温に戻しました。次に、14日目の試薬を使ってEclipseで測定しました。14日目の検量線とサンプルの結果については、付録Cを参照してください。

この検証の合格基準は以下の通りです。

- 直線性：|r| 値：0.980以上
- 反応干渉因子試験(PPC)：50 ~ 200 %
- 各標準品・サンプルの PPC回収率の変動係数：20%以下
- ネガティブコントロールのオンセットタイム：0.005 EU/mLより遅い

まとめと推奨事項

すべての保存期間（0日目、7日目、14日目）の完了時に、両方のライセート試薬（Chromo-LALとEndochrome-K）についてエンドトキシンの測定結果を調べ、凍結/解凍後のThermo Scientific スクリューキャップマイクロチューブ（カタログ番号 3488PK、2.0 mL）で同等の結果が得られるかどうかを評価しました。14日目のEndochrome-Kのプレート2の1つのウェルで単一の流体障害が検出されたため、この結果は棄却されました。この流体障害はエラーであり、保存条件やライセート試薬の安定性とは関係ありません。

ここに示したデータは、Sievers Eclipseで使用する際、調製してすぐに使用したライセート試薬と−20°Cで最大 14日間凍結保存したライセート試薬の同等性を示しています。これらの結果から、IFUに記載されている通りに、Thermo Scientificマイクロチューブを使用して各試薬を1回だけ凍結/解凍しても測定性能に影響がないことが示されました。Thermo Scientificスクリューキャップマイクロチューブ（カタログ番号：3488PK、2.0 mL）は、試薬を−20°Cで最長 2 週間保存してもエンドトキシンアッセイに影響しないことが証明されています。したがって、Sieversチームは、ライセート試薬の保管、廃棄量の削減のためにこのチューブを使用することを推奨しています。この検証のすべてのデータはリクエストに応じて入手可能です。

付録A：0日目の検量線とサンプル結果

エンドトキシン計 Sievers Eclipseは、アッセイごとに3～5点の検量線を評価できます。この評価では、測定範囲全体を把握するために、各時点で5点の検量線を使用しました。検量線とサンプルの0日目の結果を以下に示します。

表1. 0日目：Chromo-LAL ロット: 337082 検量線

プレート	R値	オンセットタイム CV (%)	ネガティブコントロール 0.005 EU /mL未満	可否
1	1.000	1.0～4.9%	合格	適合
2	1.000	0.8～6.7%	合格	適合
3	0.999	2.3～5.9%	合格	適合

表2. 0日目：Endochrome-K ロット: N4253E 検量線

プレート	R値	オンセットタイム CV (%)	ネガティブコントロール 0.005 EU /mL未満	可否
1	0.999	0.4～8.9%	合格	適合
2	0.999	2.7～5.3%	合格	適合
3	0.997	1.8～5.9%	合格	適合

表3. 0日目：Chromo-LAL ロット: 337082 サンプル

プレート	セグメント	PPC 回収率 (%)	PPC オンセット タイム (%)	PPC回収率 (%) : 50～200%以内?	CV (%) : 20%未満?
1	1～21	91.1～127.9%	0.0～5.7%	適合	適合
2	1～21	74.0～122.1%	0.4～7.6%	適合	適合
3	1～21	75.1～110.2%	0.0～6.6%	適合	適合

表4. 0日目：Endochrome-K ロット: N4253E サンプル

プレート	セグメント	PPC 回収率 (%)	PPC オンセット タイム (%)	PPC回収率 (%) : 50～200%以内?	CV (%) : 20%未満?
1	1～21	83.2～107.5%	0.4～9.0%	適合	適合
2	1～21	93.0～160.3%	0.0～4.0%	適合	適合
3	1～21	60.7～109.5%	0.0～6.6%	適合	適合

付録B：7日目の検量線とサンプル結果

表1. 7日目：Chromo-LAL ロット: 337082 検量線

プレート	R値	オンセットタイム CV (%)	ネガティブコントロール 0.005 EU /mL未満	可否
1	0.998	0.6~7.2%	合格	適合
2	0.999	1.9~11.9%	合格	適合
3	0.999	0.9~8.4%	合格	適合

表2. 7日目：Endochrome-K ロット: N4253E 検量線

プレート	R値	オンセットタイム CV (%)	ネガティブコントロール 0.005 EU /mL未満	可否
1	0.999	1.6~5.7%	合格	適合
2	0.999	1.2~3.2%	合格	適合
3	1.000	0.0~7.9%	合格	適合

表3. 7日目：Chromo-LAL ロット: 337082 サンプル

プレート	セグメント	PPC 回収率 (%)	PPC オンセット タイム (%)	PPC回収率 (%) : 50~200%以内?	CV (%) : 20%未満?
1	1~21	70.3~138.6%	0.0~11.7%	適合	適合
2	1~21	82.7~176.6%	0.0~11.3%	適合	適合
3	1~21	67.2~141.8%	0.5~16.3%	適合	適合

表4. 7日目：Endochrome-K ロット: N4253E サンプル

プレート	セグメント	PPC 回収率 (%)	PPC オンセット タイム (%)	PPC回収率 (%) : 50~200%以内?	CV (%) : 20%未満?
1	1~21	76.5~117.1%	0.0~9.6%	適合	適合
2	1~21	66.5~123.9%	0.0~12.4%	適合	適合
3	1~21	93.1~125.2%	0.0~5.7%	適合	適合

付録C：14日目の検量線とサンプル結果

表1. 14日目：Chromo-LAL ロット: 337082 検量線

プレート	R値	オンセットタイム CV (%)	ネガティブコントロール 0.005 EU /mL未満	可否
1	0.999	1.2~4.6%	合格	適合
2	0.999	2.2~7.6%	合格	適合
3	1.000	2.8~6.5%	合格	適合

表2. 14日目：Endochrome-K ロット: N4253E 検量線

プレート	R値	オンセットタイム CV (%)	ネガティブコントロール 0.005 EU /mL未満	可否
1	1.000	1.7~3.1%	合格	適合
2	1.000	1.1~2.5%	合格	適合
3	1.000	1.1~4.9%	合格	適合

表3. 14日目：Chromo-LAL ロット: 337082 サンプル

プレート	セグメント	PPC 回収率 (%)	PPC オンセット タイム (%)	PPC回収率 (%) : 50~200%以内?	CV (%) : 20%未満?
1	1~21	83.3~179.3%	0.0~9.4%	適合	適合
2	1~21	89.2~147.4%	0.4~8.8%	適合	適合
3	1~21	78.9~137.0%	0.5~14.0%	適合	適合

表4. 14日目：Endochrome-K ロット: N4253E サンプル

プレート	セグメント	PPC 回収率 (%)	PPC オンセット タイム (%)	PPC回収率 (%) : 50~200%以内?	CV (%) : 20%未満?
1	1~21	94.9~107.8%	0.0~3.5%	適合	適合
2	1~21	82.5~109.5%	0.0~4.7%	適合	適合
3	1~21	93.3~104.6%	0.7~4.1%	適合	適合

使用した分析装置とアクセサリー

エンドトキシン計 Sievers Eclipse シリアルナンバー：1811-0006

エンドトキシン計 Sievers Eclipse シリアルナンバー：1911-0025

試薬調製水：Associates of Cape Cod (ACC) ロット：AG29752122

Eclipse マイクロプレート：ロットナンバー：IJ122336

Charles River Laboratories (CRL) Endochrome-K LAL 試薬 ロット：N4253E

Associates of Cape Cod (ACC) Chromo-LAL 試薬 ロット：337082

(翻訳：セントラル科学株式会社)