

薬局方に適合したエンドトキシンアッセイにおける ライセート試薬の使用量削減

Application Note

イントロダクション

近年、品質検査技術に大きな改善と進歩が見られます。検査項目のひとつに、製薬用水や最終製剤中に含まれる有害なパイロジェンであるエンドトキシンがあります。従来の光学的エンドトキシン試験法（96ウェルマイクロプレートによるカイネティック比濁法 / 比色法など）は長時間の作業が必要です。マイクロ流体技術を使用することで、薬局方に適合しつつ、ライセート試薬とサンプル量を削減し、ピペット操作と作業時間を大幅に削減できます。

薬局方に適合したエンドトキシン試験に必要なライセート試薬の量は？

従来の96ウェルプレートを使ったエンドトキシン試験法では、各ウェルの形状と吸光度の光路長が決まっています。ウェルは円錐形であることが多く、光路長はメーカーにより異なります¹。

試薬メーカーは1:1の比率を維持して正確にエンドトキシンを検出するために、各ウェルのサンプル量と試薬量を指定しています。カイネティック法は、光学濃度（OD）の変化とエンドトキシン濃度が反比例する性質を利用しています。ODとは「分光光度計で測定される、特定の波長で有機分子の懸濁液または溶液に吸収される光量の尺度」²です。

サンプルと試薬の比率（1:1）は非常に重要です。多くの試薬メーカーは、96ウェルマイクロプレートリーダーやチューブリーダーでは、サンプルと試薬を100 μ Lずつ使用することを推奨しています。ウェルの小さいマイクロプレートではサンプルと試薬の使用量が100 μ L未満の場合もありますが、1:1の比率は維持されます。1:1の比率により正確な結果が得られることが知られています。100 μ Lのサンプルと試薬を使用することは薬局方の要件ではありません。むしろ、マイクロプレートリーダーやチューブリーダーのウェルサイズから、ODに達するために必要な光路長と吸光度を考慮し、1:1の比率を満たすために必要な液量を選択することが推奨されています。

マイクロ流体技術による薬局方に適合したエンドトキシン試験：少量の反応液で高精度な測定

近年、エンドトキシン計 Sievers Eclipseのような、新技術を採用した試験法が登場しています。Eclipseはマイクロ流体技術と遠心力を利用し、少量の液体をマイクロプレート上の特定のセグメントに正確に供給することで、試薬量を大幅に削減し、セットアップを簡素化します。マイクロ流体技術は、高感度な化学的・生物学的分析における要件を満たす能力を備えており、正確で信頼性が高く費用対効果が高いため、30年以上にわたって盛んな研究分野となっており、まさにエンドトキシンアッセイで必要とされているものです。

Eclipseマイクロプレートには検量線評価のために標準品が充填された5つのセグメントがあり、各標準品にはネガティブコントロールがあります。サンプルセグメントは21個あり、96ウェルマイクロプレートリーダーと同様に、1枚のプレートで21検体まで測定できます。各サンプルセグメントには反応干渉因子試験用のエンドトキシン標準品が充填されています。

マイクロ流体技術では液量は少なく済みますが、生化学的性質は変化しないため、薬局方に完全適合した測定ができます。Eclipseの経路と光学濃度は、ベールの法則とマイクロプレートの厚さ（光路長）を用いて計算されます。ベールの法則はランベルトベールの法則としても知られ、「溶液の濃度は光の吸収に正比例する」³と述べています。マイクロ流体技術の性質により、Eclipseに必要なライセート試薬は1mLだけで、各アッセイでサンプルとライセート試薬の比率が1:1になるようにします。

96ウェルプレートリーダーと同等性能の確保

Sievers Eclipseの開発段階では、96ウェルマイクロプレートリーダーとの同等性を保証するために様々なテストが行われました。米国薬局方（USP）チャプター<1225>では、分析法バリデーションのためのパラメーターが記載されています。USP<1225>のパラメーターを測定することでEclipseの性能を評価しました。

表1. USP<1225>の要件とSievers Eclipse

バリデーションパラメーター	Sievers Eclipse
精度	✓
再現性	✓
直線性	✓
検出下限（LOD）	✓
最大範囲	✓
特異性	✓
システム適合性	✓
96ウェルプレートとの同等性	✓
ウェルの均一性	✓
バックグラウンド汚染	✓
1：1検証（ロバスト性）	✓

複数のベンダー・ロットのライセート試薬を使って複数年にわたって試験を実施しました。Eclipseと96ウェルマイクロプレートリーダーの両方で試薬調製水と最終製品を測定しました。データからEclipseは従来のマイクロプレートリーダーと同等の性能を持つことが示されました。

まとめ

Eclipseはカイネティック比色法による薬局方に適合したエンドトキシン測定ができます。USP<1225>に従ったバリデーションデータから、Eclipseが96ウェルマイクロプレートリーダーと同等の性能を持つことが示されました。

参考文献

1. Sievers Analytical Instruments. Determining equivalent onset optical density (OD) values on the Sievers Eclipse BET platform.
2. McCullough, Karen Zink. The Bacterial Endotoxins Test: A Practical Approach. DHI Publishing, LLC, 2011.
3. 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）