

ADRA 技術セミナー 2019

-プロトコル・手技説明-

2019年6月19日
富士フイルム株式会社
山本裕介

ADRAキットに同梱

- キット用手順書
 - 試薬調製～反応停止操作 (HPLC測定前) の手順、
キット以外に必要な試薬・器具・装置 等が記載

キット専用Web掲載資料 (購入者のみアクセス可能)

- 96ウェルプレート 配置例
- データ解析用シート
- NAC・NAL純度情報
- HPLC条件
- NAC, NAL安定性確認用シート
- 推奨試薬・器具一覧 (掲載予定)

その他

- SOP (ver. 1.2)
http://www.jacvam.jp/files/doc/03_10/03_10_E1.pdf
- テストガイドライン (OECD TG442C)
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en

事前作業

緩衝液の調製、被験物質の溶媒チェック、HPLC溶離液の調製

反応（1日目）

1. 1 mM 被験物質溶液、陽性対照溶液の調製
2. 6.667 μ M NAC, NAL溶液の調製 *1
3. NAC, NAL標準液（std 1）の調製 *1
4. NAC, NAL溶液と被験物質溶液を混合&24時間インキュベート

*1 事前に調製した物を-80°Cで保存することも可能

測定（2日目）

1. 反応停止液（2.5%トリフルオロ酢酸水溶液）の添加
2. NAC, NAL標準液希釈系列の調製 *2
3. HPLCを用いてNAC, NALを定量

*2 反応時（1日目）に調製してもよい

データ解析

NAC, NALの減少率 (Depletion)の算出、結果の判定

ADRAキット

- NAC Buffer (pH=8.0) プレミックス (300 mL用) × 2本
- NAL Buffer (pH=10.2) プレミックス (300 mL用) × 2本
- 0.01 mol/L EDTA溶液 (1 mL) × 2本
- NAC (10 mL用) × 2本
- NAL (10 mL用) × 2本



キット以外の試薬 (別途準備が必要)

- 水 (蒸留水以上のグレード)
推奨製品： ①光製薬 注射用水
②富士フイルム和光純薬 超純水 超微量分析用
- アセトニトリル
- アセトン
- ジメチルスルホキシド(DMSO)
- トリフルオロ酢酸 (TFA)
- 陽性対照 (Phenylacetaldehyde, CAS No. 122-78-1)

試験で使用する器具 (消耗品) は、
PPまたはPE製のディスポーザブル品を用い、
金属イオンの混入をできるだけ防ぐ

マイクロピペット

- マイクロピペット：2～10、10～100 μL 、100～1000 μL の3種類
- 12連マルチチャンネルピペット：50～150 μL 分取可能なもの

消耗品

- 500 mL程度の容量のある容器 (緩衝液調製用)
- 10 mL-100 mLを分取可能なメスピペット
- 遠沈管：10 mL程度、100 mL程度の容量のあるもの
- 96ウェルプレート
- プレートシール：密封性、耐溶剤性の高いもの

- 電子天秤：0.1 mgまで表示されるもの
- pH計：±0.01 pH単位まで読むことが可能なもの
- 試験管ミキサー
- プレートシェイカー
- プレート遠心機
- インキュベーター：25°C設定が可能なもの
- HPLCシステム：流速0.3 mL/minで96ウェルプレートを測定可能なもの
- UV検出器：281 nmで吸光検出が可能なもの
- HPLCカラム

推奨品：① CAPCELL CORE C18 column (2.7 μ m, 3.0 \times 150 mm)
[大阪ソーダ, Cat. 51112]

② Wakopak® Core C18 ADRA Φ 3.0 \times 150mm
[富士フイルム和光純薬, Cat. 233-63991] (6月末発売予定)

③ CORTECS C18 Column (2.7 μ m, 3.0 \times 150 mm)
[Waters, Cat. 186007373]

④ Agilent, Poroshell 120 EC-C18 (2.7 μ m, 3.0 \times 150 mm)
[Cat. 693975-302]

必要に応じて使用

- HPLCガードカラム

推奨品：EXP GUARD CARTRIDGE CAPCELL CORE C18 S-2.7 2.1×5 mm

[大阪ソーダ、Cat. 3643] (ホルダー)

EXP DIRECT CONNECT HOLDER

[大阪ソーダ、Cat. 3640] (カラム)

あると便利な器具

- 1000-5000 μ lを分取可能なマイクロピペット
 - 被験物質溶液、陽性対照溶液の調製に便利
- 12連ピペット操作用リザーバー
 - 6.667 μ M NAC, NAL溶液、反応停止液の分注に便利
- 12連ピペットで作業可能な1.5ml程度の容量のチューブ
 - 被験物質、陽性対照、溶媒を12連ピペットでまとめて添加できる
 - 例. サンプルトラック1.4 ml [Thermo, Cat. 4247JP]
 - セプラシール [Thermo, Cat. 4463] (サンプルトラックのフタ)
 - (96 ディープウェルプレートでも代用可能)

事前作業

緩衝液の調製、被験物質の溶媒チェック、HPLC溶離液の調製

反応（1日目）

1. 1 mM 被験物質溶液、陽性対照溶液の調製
2. 6.667 μ M NAC, NAL溶液の調製 *1
3. NAC, NAL標準液（std 1）の調製 *1
4. NAC, NAL溶液と被験物質溶液を混合&24時間インキュベート

*1 事前に調製した物を-80°Cで保存することも可能

測定（2日目）

1. 反応停止液（2.5%トリフルオロ酢酸水溶液）の添加
2. NAC, NAL標準液希釈系列の調製 *2
3. HPLCを用いてNAC, NALを定量

*2 反応時（1日目）に調製してもよい

データ解析

NAC, NALの減少率 (Depletion)の算出、結果の判定

キット同梱プロトコルの記載内容

- 1) 水300 mLを計量する。
- 2) NAC またはNAL Buffer プレミックスを500 mL容器に移す。
- 3) 1)の水から30 mL取り、プレミックスの容器を洗いこんだ後、500 mL容器に移す。
- 4) 残りの水270 mLを500 mL容器に加え、プレミックスを溶解する。
- 5) プレミックスが溶解した後、0.01 mol/L EDTA溶液を10 μ L添加する。^{*1}
- 6) 調製したBufferの一部を別の容器に移し、pHを確認

改定予定の手順

- 1) 500 mL容器に水を270 mL計量する。
- 2) 上記容器にNAC またはNAL Buffer プレミックスを加え、混合する。
- 3) プレミックスの容器に水を30 mL加え、プレミックスの容器を洗いこみ、500 mL容器に移す。
- 4) プレミックスが溶解した後、0.01 mol/L EDTA溶液を10 μ L添加する。^{*1}
- 5) 調製したBufferの一部を別の容器に移し、pHを確認

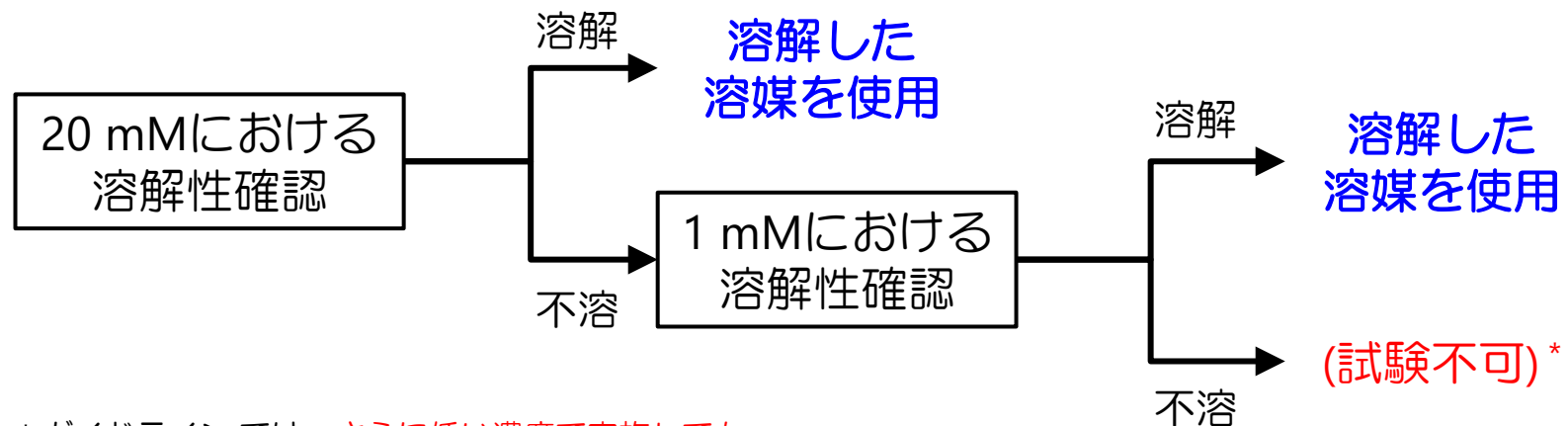
*1 NAC Bufferの調製時のみ実施

ADRAで使用可能な被験物質溶媒

①水、②アセトニトリル、③アセトン、④5%DMSO/アセトニトリル

- 複数の溶媒に溶解する場合は上記の番号を優先順位とする
- 酸無水物は水中で加水分解してしまうため、水以外の溶媒を用いる
- その他上記のいずれかの溶媒中で不安定であることが分かっている場合はそれ以外の溶媒を用いる

溶解性確認の流れ



* ガイドラインでは、さらに低い濃度で実施しても陽性であれば感作性と判定可能と記載。

1. 20 mMにおける溶解性確認

- 1) 15 mLチューブ等に被験物質を秤量する。
- 2) 秤量値から20 mM溶液の調製に必要な溶媒量を計算する。
- 3) 算出した量の溶媒を添加し、20 mMにおける溶解性を目視で確認する。

ポイント

- 溶媒は水、アセトニトリル、アセトン、**DMSO** (5%DMSOではない)。
- すぐに溶解しなくても、超音波処理を5分程度行うことによって溶解した場合は、その溶媒を用いてよい。

2. 1 mMにおける溶解性確認 (20 mMで溶解しない場合)

- 1) 100 mL容量の容器等に被験物質を秤量する。
- 2) 秤量値から1 mM溶液の調製に必要な溶媒量を計算する。
- 3) 算出した量の溶媒を添加し、1 mMにおける溶解性を目視で確認する。

ポイント

- 溶媒は水、アセトニトリル、アセトン (**DMSOは用いない**)。
- すぐに溶解しなくても、超音波処理を5分程度行うことによって溶解した場合は、その溶媒を用いてよい。

事前作業

緩衝液の調製、被験物質の溶媒チェック、HPLC溶離液の調製

反応（1日目）

1. 1 mM 被験物質溶液、陽性対照溶液の調製
2. 6.667 μ M NAC, NAL溶液の調製 *1
3. NAC, NAL標準液（std 1）の調製 *1
4. NAC, NAL溶液と被験物質溶液を混合&24時間インキュベート

*1 事前に調製した物を-80°Cで保存することも可能

測定（2日目）

1. 反応停止液（2.5%トリフルオロ酢酸水溶液）の添加
2. NAC, NAL標準液希釈系列の調製 *2
3. HPLCを用いてNAC, NALを定量

*2 反応時（1日目）に調製してもよい

データ解析

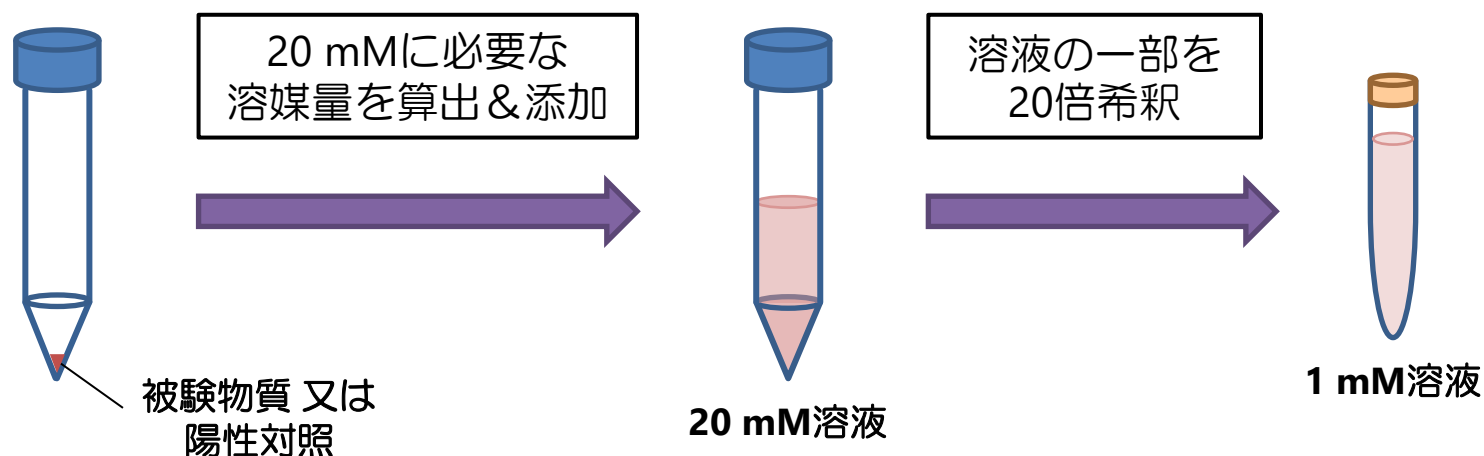
NAC, NALの減少率 (Depletion)の算出、結果の判定

陽性対照、20 mM溶液が調製可能な被験物質

- 1) 15 mLチューブ等に被験物質、陽性対照を秤量する。
- 2) 秤量値から20 mM溶液の調製に必要な溶媒量を計算する。
- 3) 算出した量の溶媒を添加し20 mM溶液を調製する。
- 4) 上記の20 mM溶液の一部を各溶媒で20倍希釈し、1 mMに調製する。

ポイント

- 溶媒が5%DMSO/アセトニトリルの場合は、DMSOで20 mMに調製後、アセトニトリルで20倍希釈する。
- 1 mM溶液はサンプルトラック [Thermo Cat. 4247JP] や96ディープウェルプレート等に調製し、マルチチャンネルピペットで操作できるようにすると良い。



20 mMで溶解しない被験物質

- 1) 100 mL容量の容器等に被験物質を秤量する。
- 2) 秤量値から1 mM溶液の調製に必要な溶媒量を計算する。
- 3) 算出した量の溶媒を添加し1 mM溶液を調製する。

ポイント

- 溶媒は水、アセトニトリル、アセトンの3種類が使用可能 (DMSOは不可)。
- 調製した1 mM溶液はサンプルトラック [Thermo Cat. 4247JP] や96 well ディープウェルプレート等に分注し、マルチチャンネルピペットで操作できるようにすると良い。

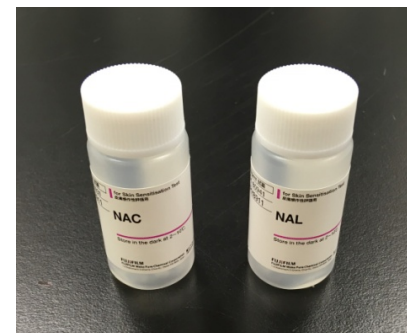


6.667 μ M NAC, NAL溶液の調製

あらかじめ調製しておいた緩衝液 (pH=8.0 for NAC, pH=10.2 for NAL)をそれぞれ10 mLずつNACまたはNALの容器に直接添加し、溶解する。

ポイント

- 激しく混和するとNACが酸化してしまう可能性があるため、穏やかに攪拌する。
- 6.667 μ M溶液の状態でも-80 $^{\circ}$ C下であれば1年程度保存可能 (テストガイドラインに記載)。
⇒ ただし、キットにおいては用時調製を推奨



NAC, NAL標準液 (Std 1)、標準液希釈Bufferの調製

以下の分量に従って、各溶液を混合し、冷蔵または-80 $^{\circ}$ Cで保存する。

NAC, NAL標準液 (Std 1)

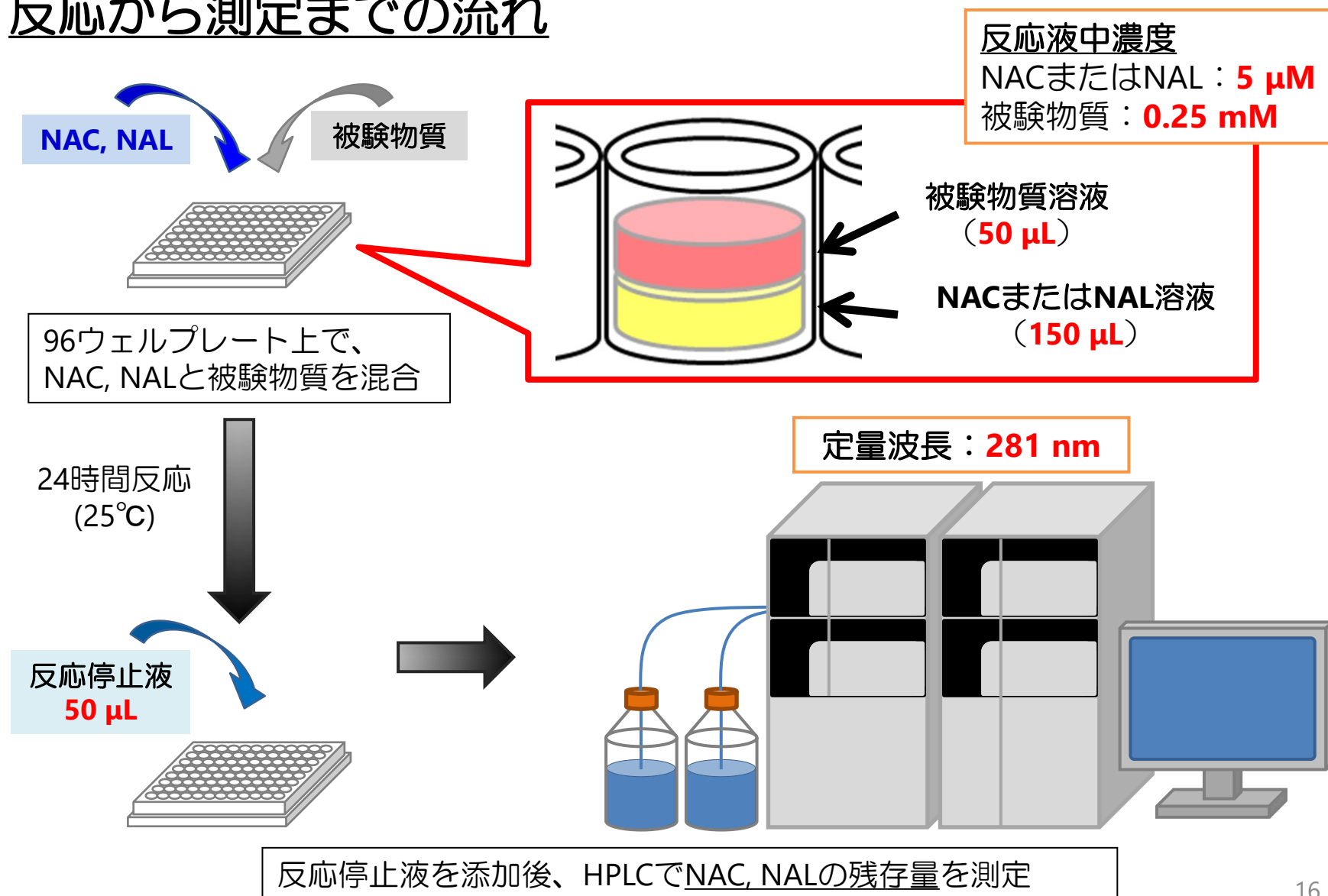
| | |
|------------------------------------|-------------|
| • 6.667 μ M NAC溶液 または NAL溶液 | 300 μ L |
| • 水 | 20 μ L |
| • TFA | 2 μ L |
| • アセトニトリル | 78 μ L |

標準液希釈Buffer

| | |
|---|-------------|
| • NAC Buffer (pH 8.0) または NAL Buffer (pH 10.2) | 900 μ L |
| • 水 | 60 μ L |
| • TFA | 6 μ L |
| • アセトニトリル | 234 μ L |

NAC, NALと被験物質の反応

反応から測定までの流れ



各反応液の調製

以下の表の分量に従い、①6.667 μ M NAC、NAL溶液、②NAC、NAL Buffer、③被験物質溶液、陽性対照溶液、各溶媒、の順に96ウェルプレートに添加する。

ポイント

ピペット操作において、NAC, NAL溶液およびBufferはフォワードピペッティング (1段階吸って出し切る操作)、被験物質、陽性対照および各溶媒はリバースピペッティング (2段階分吸って1段階分出す操作) で分注すると良い (動画参照)。

| | RC-A | RC-B | RC-C | 陽性対照 | サンプル ^{*1} | CC |
|---|-------------|-------------|--------------------------|-------------|--------------------|-------------|
| 6.667 μ M NAC, NAL溶液 | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | |
| NAC Buffer (pH 8.0) NAL Buffer (pH 10.2) | | | | | | 150 μ L |
| アセトニトリル | 50 μ L | 50 μ L | | | | |
| 被験物質溶媒 | | | 50 μ L ^{*2} | | | |
| 1 mM 陽性対照溶液 | | | | 50 μ L | | |
| 1 mM 被験物質溶液 | | | | | 50 μ L | 50 μ L |

*1 以降、被験物質とNAC, NALの反応液を「サンプル」と表現する

*2 陽性対照がアセトニトリル溶媒のため、アセトニトリルRC-Cは必ず用意する

参照コントロールA (RC-A)

HPLC装置の適格性を確認するためのコントロール。被験物質溶液の代わりにアセトニトリルをNACまたはNAL溶液に添加した溶液について、標準液検量線から算出したNAC, NAL濃度が適切な値になるかを確認する。

参照コントロールB (RC-B)

分析時間中の反応液の安定性を確認するためのコントロール。被験物質溶液の代わりにアセトニトリルをNACまたはNAL溶液に添加した溶液について、分析開始時と終了時にn=3ずつ測定し、値のバラつきを確認する。

参照コントロールC (RC-C)

NACおよびNALの減少率 (Depletion) を算出するためのコントロール。被験物質溶液の代わりに被験物質の溶媒を添加する。被験物質によって溶媒が異なる場合はそれぞれの溶媒に対するコントロールを調製する。

共溶出コントロール(CC)

被験物質がNACまたはNALと共溶出していないか確認するためのコントロール。被験物質が281 nmで吸収があるかどうか、また溶出時間がNACまたはNALと同じではないか(共溶出する可能性はないか)を確認する。


96ウェルプレート 配置例


ポイント

- 各列ごとにサンプル、陽性対照、溶媒を揃えて配置するとマルチチャンネルピペットを用いた操作がしやすい (動画参照)。
- 陽性対照がアセトニトリル溶媒のため、アセトニトリルのRC-Cは必ず配置する。

1枚目 (12サンプル実施時)


| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| A | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン |
| B | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル |
| C | No.1 | No.2 | No.3 | No.4 | No.5 | No.6 | No.7 | No.8 | No.9 | No.10 | No.11 | No.12 |
| D | CC-1 | CC-2 | CC-3 | CC-4 | CC-5 | CC-6 | CC-7 | CC-8 | CC-9 | CC-10 | CC-11 | CC-12 |
| E | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン | サン |
| F | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル | プル |
| G | No.1 | No.2 | No.3 | No.4 | No.5 | No.6 | No.7 | No.8 | No.9 | No.10 | No.11 | No.12 |
| H | CC-1 | CC-2 | CC-3 | CC-4 | CC-5 | CC-6 | CC-7 | CC-8 | CC-9 | CC-10 | CC-11 | CC-12 |


 6.667 μM NAC溶液に被験物質、陽性対照または溶媒を添加

 NAC Buffer (pH 8.0)に被験物質を添加

2枚目 (2種の溶媒 (水、アセトニトリル) 使用時)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------|------|------|----------|-----------|------|---|---|---|----|-------|-------|
| A | | | | | | | | | | | Std 1 | Std 5 |
| B | RC-A | RC-B | RC-B | RC-C (水) | RC-C (AN) | 陽性対照 | | | | | Std 2 | Std 6 |
| C | | | | | | | | | | | Std 3 | Std 7 |
| D | | | | | | | | | | | Std 4 | Blank |
| E | | | | | | | | | | | Std 1 | Std 5 |
| F | RC-A | RC-B | RC-B | RC-C (水) | RC-C (AN) | 陽性対照 | | | | | Std 2 | Std 6 |
| G | | | | | | | | | | | Std 3 | Std 7 |
| H | | | | | | | | | | | Std 4 | Blank |

 6.667 μM NAL溶液に被験物質、陽性対照または溶媒を添加

 NAL Buffer (pH 10.2) に被験物質を添加

AN：アセトニトリル

操作

- 1) 各溶液をすべて添加後、プレートシールでふたをする。
- 2) プレートシェーカーで攪拌後、遠心機でスピンドアウンする。
- 3) インキュベーターにプレートを入れ25℃で24時間静置する。

ポイント

- プレートシールは粘着性、耐溶剤性が高いものを用いる。
推奨品：TORAST™ 96well Seal E Type [島津ジーエルシー, Cat. 370-04030-01]
- プレートシールを張る際は隙間がないよう注意する。
 - 隙間があるとインキュベート中に揮発したサンプルや溶媒が他のウェルにコンタミする可能性がある。
 - また、溶媒等が揮発することにより、NACおよびNALの濃度が高くなり、値がばらつく可能性がある。
- シェーカーでの攪拌は600~700rpmで30秒程度でよい。

事前作業

緩衝液の調製、被験物質の溶媒チェック、HPLC溶離液の調製

反応（1日目）

1. 1 mM 被験物質溶液、陽性対照溶液の調製
2. 6.667 μ M NAC, NAL溶液の調製 *1
3. NAC, NAL標準液（std 1）の調製 *1
4. NAC, NAL溶液と被験物質溶液を混合&24時間インキュベート

*1 事前に調製した物を-80°Cで保存することも可能

測定（2日目）

1. 反応停止液（2.5%トリフルオロ酢酸水溶液）の添加
2. NAC, NAL標準液希釈系列の調製 *2
3. HPLCを用いてNAC, NALを定量

*2 反応時（1日目）に調製してもよい

データ解析

NAC, NALの減少率 (Depletion)の算出、結果の判定

反応停止操作

- 1) プレートをインキュベーターから取り出し、遠心機でスピンドウンする。
- 2) 各反応液に反応停止液 (2.5%トリフルオロ酢酸水溶液)を50 μ L添加する。

ポイント

万が一析出が観察された場合、HPLC配管やカラムに詰まる可能性が考えられるので、低速 (100-400g) で遠心分離し、上清を100 μ L程度別のプレートに移して測定してもよい。

標準液希釈系列の調製

事前に調製した標準液希釈Bufferを用いて、下記表に従ってNAC, NAL標準液 (Std1) を希釈していき、6段階の希釈系列を調製する。

| | Std 1 | Std 2 | Std 3 | Std 4 | Std 5 | Std 6 | Std 7 |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------|
| NAC, NAL濃度 | 5 μ M | 2.5 μ M | 1.25 μ M | 0.63 μ M | 0.31 μ M | 0.16 μ M | 0 μ M |
| NAC 標準液 NAL 標準液 | 150 μ L (Std 1) | 150 μ L (Std 1) | 150 μ L (Std 2) | 150 μ L (Std 3) | 150 μ L (Std 4) | 150 μ L (Std 5) | — |
| NAC 希釈 Buffer NAL 希釈 Buffer | — | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L | 150 μ L |

HPLC条件

| | |
|--------|--|
| カラム温度 | 40°C |
| サンプル温度 | 25°C サンプル冷却機能のあるオートサンプラーがある場合、4°Cにすることでサンプルを測定時までより安定な状態で保存できる。 |
| 検出器 | フォトダイオードアレイ検出器 または吸光度検出器 (281nm) |
| 注入量 | 10~20 μ l (HPLC装置によって変わる。ピークがブロードならば、注入量を減らす。) |
| 測定時間 | 20分 |

ポイント

- 各移動相を混合するミキサーの容量が適切でないと、溶出条件通りのグラジエントが得られない場合があるため、あらかじめ確認・調節しておく。
(島津prominenceでは0.5 mlのミキサー容量が適切)
- カラムから検出器までの配管の内径や長さによりピークがブロードになる場合があるため、配管の内径**0.18 mm ϕ 以下**、カラムから検出器までの**距離50 cm以下**にする。

グラジエント条件

| NACグラジエント条件 | | | |
|-------------|-----------|----|-----|
| 時間 | 流速 | %A | %B |
| 0分 | 0.3ml/min | 70 | 30 |
| 9.5分 | 0.3ml/min | 45 | 55 |
| 10分 | 0.3ml/min | 0 | 100 |
| 13分 | 0.3ml/min | 0 | 100 |
| 13.5分 | 0.3ml/min | 70 | 30 |
| 20分 | 終了 | | |

| NALグラジエント条件 | | | |
|-------------|-----------|----|-----|
| 時間 | 流速 | %A | %B |
| 0分 | 0.3ml/min | 80 | 20 |
| 9.5分 | 0.3ml/min | 55 | 45 |
| 10分 | 0.3ml/min | 0 | 100 |
| 13分 | 0.3ml/min | 0 | 100 |
| 13.5分 | 0.3ml/min | 80 | 20 |
| 20分 | 終了 | | |

ポイント

13.5分～20分における6.5分間の再平衡化時間は、装置の違いや装置の混合容積によって長くなったり、短くなったりする可能性がある。NAC、NALの溶出時間が安定すれば、より短い平衡化時間することも可能。

分析シーケンス

以下の順番で各反応液を測定していく。

- ① NAC 標準液希釈系列
- ② NAC RC-A
- ③ (NAC CC)
- ④ NAC RC-B (n=3)
- ⑤ NAC サンプル、陽性対照、RC-Cの n=1
- ⑥ NAC サンプル、陽性対照、RC-Cの n=2
- ⑦ NAC サンプル、陽性対照、RC-Cの n=3
- ⑧ NAC RC-B (残りのn=3)

以下、NALもNACと同様の順番

ポイント

- NACとNALでグラジエント条件が異なるため、NACについてすべて測定を行ってからNALについての測定を行うようにする。
- CCはどのタイミングで測定してもよい。
- サンプル、陽性対照、RC-Cは合わせてn=1ずつ測定する。
- 分析は反応停止後 72時間以内に測定が終了するようにする。

事前作業

緩衝液の調製、被験物質の溶媒チェック、HPLC溶離液の調製

反応（1日目）

1. 1 mM 被験物質溶液、陽性対照溶液の調製
2. 6.667 μ M NAC, NAL溶液の調製 *1
3. NAC, NAL標準液（std 1）の調製 *1
4. NAC, NAL溶液と被験物質溶液を混合&24時間インキュベート

*1 事前に調製した物を-80°Cで保存することも可能

測定（2日目）

1. 反応停止液（2.5%トリフルオロ酢酸水溶液）の添加
2. NAC, NAL標準液希釈系列の調製 *2
3. HPLCを用いてNAC, NALを定量

*2 反応時（1日目）に調製してもよい

データ解析

NAC, NALの減少率 (Depletion)の算出、結果の判定

減少率 (Depletion) の算出

被験物質との反応液におけるNAC, NALのピーク面積と、被験物質と同じ溶媒のRC-CにおけるNAC, NALのピーク面積から以下の式に従い、NAC, NALそれぞれのDepletionを算出する。

$$\text{Depletion (\%)} = \left[1 - \frac{\text{サンプルにおけるNAC, NALピーク面積の平均値}}{\text{RC-CにおけるNAC, NALピーク面積の平均値}} \right] \times 100$$

結果の判定基準

上記で算出したNACとNALのDepletionから平均値を算出し、以下の表に従って陰性、陽性を判定する。

| Depletion 平均値 | 判定 |
|---------------|----|
| 4.9% ≤ | 陽性 |
| < 4.9% | 陰性 |

NAC単独予測モデル

NALにおいて共溶出がみられ、正しくDepletionを算出できない場合は以下の表に従い、NACのDepletionのみを用いて判定することが出来る。

| NAC Depletion | 判定 |
|---------------|----|
| $5.6\% \leq$ | 陽性 |
| $< 5.6\%$ | 陰性 |

ポイント

共溶出していても明らかにRC-Cと比較してNAC, NALのピークが減少している場合は正確なDepletionは算出できないが、陽性と判定してよい。

確認試験の必要性

以下の場合には、確認試験を実施して判定結果の再現性を確認する。
1回目と2回目の判定結果が異なった場合は、さらに確認試験を実施し、3回の判定結果の多数決により判定を決める。

NAC/NAL予測モデル： $3.0\% \leq$ 平均スコア $\leq 10.0\%$

NAC単独予測モデル： $4.0\% \leq$ NACの減少率 $\leq 11.0\%$

標準液希釈系列の各濃度とピーク面積から検量線を作成し、各コントロール、陽性対照、サンプルにおけるNAC, NALの濃度を算出する。
上記の値に対して次の条件を満たしているか確認する。

装置の適合性

- 検量線の直線性 $r^2 > 0.990$
- 参照コントロールAのNACまたはNAL濃度の平均値 = $3.2 \sim 4.4 \mu\text{M}$

分析中の安定性

RC-B (n=6) とアセトニトリル溶媒のRC-C (n=3) の合計n=9における
NAC, NALピーク面積のCV $< 10\%$

RC-Cの安定性

- 各溶媒のRC-C (n=3) におけるNAC, NALピーク面積のCV $< 10\%$
- 参照コントロールCのNACまたはNAL濃度の平均値 = $3.2 \sim 4.4 \mu\text{M}$

サンプルのバラつき

NACおよびNALのDepletionにおけるSD < 10%

陽性対照

- NACおよびNALのDepletionにおけるSD < 10%
- NACおよびNALのDepletionが下記表の範囲内

| NAC Depletion (%) | | NAL Depletion (%) | |
|-------------------|-----|-------------------|-----|
| 下限値 | 上限値 | 下限値 | 上限値 |
| 6 | 30 | 75 | 100 |

ポイント

Depletion等の各値や判定、試験成立条件の合否はADRAキットWebページの「[データ解析用シート](#)」にHPLCにおける各ピーク面積を入力することで確認することが可能。

6.667 μ M溶液におけるNAC, NALの安定性を確認するために、6.667 μ M溶液調製時には必ず以下の操作を実施する。

- 1) 6.667 μ M NAC, NAL溶液を2枚のプレートに各150 μ L、 $n=3$ ずつ分注する。
- 2) 上記のNAC, NAL溶液にアセトニトリルを50 μ Lずつ添加する。
- 3) 2枚のプレートのうち、1枚において反応停止液を50 μ Lずつ添加する。
- 4) それぞれプレートにプレートシールを貼り、攪拌・スピンドウンする。
- 5) 反応停止液を添加したプレートをHPLCで測定する。
- 6) もう一方のプレートは、25°Cで24時間インキュベート後に反応停止液を添加し、HPLCで測定する。

ポイント

- 反応液の組成はRC-A, RC-Bおよびアセトニトリル溶媒のRC-Cと同じ。
- あらかじめ6.667 μ M NAC, NAL溶液を調製して-80°Cで保存する場合は、調製したタイミングで必ず安定性確認を行う。
- 用時調製 (被験物質との反応と同時) の場合は、24時間後測定分の反応液 ($n=3$) を、被験物質等の反応液と同じプレートに調製してもよい。

安定性におけるクオリティ

- 0時間、24時間それぞれにおけるNAC総量 (単体+二量体) に対するNAC単体の割合 $\geq 90\%$
- 0時間におけるNALに対する24時間におけるNALの割合 $\geq 90\%$

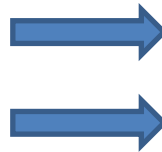
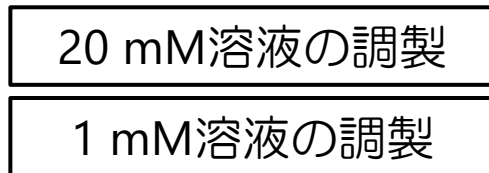
ポイント

- クオリティはADRAキットWebページの「**NAC, NAL安定性確認用シート**」にHPLCにおける各ピーク面積を入力することで確認することが可能。
- 安定性のクオリティを満たさなかった場合、**緩衝液から新たに再調製**する。
→ 緩衝液調製に使用した**水や器具が原因の可能性**があるため。

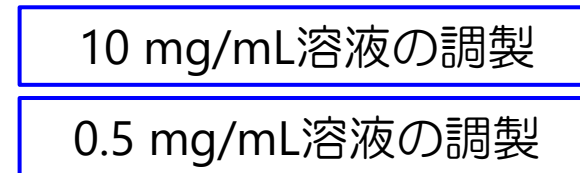
通常の方法 (1 mM) との違い

- 被験物質の溶媒選択、被験物質溶液の調製における濃度が異なるだけ
⇒ そのほかの操作は通常の方法と同じ
- 以下に従って調製濃度を変更して試験を実施すればよい

通常法 (1 mM)



重量濃度法



ご清聴ありがとうございました。