

Enabling a Healthier World

Lonza

Cell & Gene

PyroCell®
MAT HS Rapid システム
クイックスタートガイド

目次

1 PyroCell® MAT HS Rapid システムの試験概要

- 1-1 被験物質中の発熱性物質混入の *in vitro* 検出
定期試験
- 1-2 試験手順の概要
- 1-3 PyroCell® MAT HS Rapid システムの保存条件

2 試験手順

- 2-1 試験手順 1日目

- 2-1-1 事前準備
- 2-1-2 完全培地の調製
- 2-1-3 エンドトキシン希釈液の調製
- 2-1-4 細胞培養プレートの調製
- 2-1-5 pMAT 細胞の解凍とプレートでのインキュベート
- 2-2 試験手順 2日目
- 2-2-1 ヒト IL6 ELISA 法
- 2-2-2 細胞培養上清の回収、希釈、及び緩衝液の調製

3 ELISA 反応、及び洗浄手順

1 PyroCell® MAT HS Rapid システムの試験概要

1-1 被験物質中の発熱性物質混入の *in vitro* 検出定期試験

PyroCell® MAT HS Rapid システムは、4 人の健康なヒトドナーからプールした凍結保存 PBMC (MAT 細胞、M2016LC)、最適化された MAT ヒト血清サプリメント (M2017LC)、および PeliKine コンパクトヒト IL-6 ELISARapid キット (00296406) から構成されています。自然免疫で重要な役割を果たす単球は、刺激期間に被験物質中の発熱性物質に応答し、IL-6 のような炎症誘発性サイトカインを産生します。次に、放出された IL-6 サイトカインを含む細胞培養上清を PeliKine コンパクトヒト IL-6 ELISA Rapid キットで分析します。

欧州薬局方 (第 2.6.30 章) で概説されているように、規制要件では、MAT アッセイを日常的に使用するため以下のオプションが記述されています。

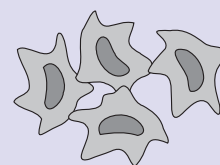
定量試験 (A 法)、半定量試験 (B 法) 及び参照ロット比較試験 (C 法)

このクイックスタートガイドでは、方法 A または B を採用した例を説明しています。PyroCell® MAT Rapid システムの「ヒストリカルな LOD」は 0.02 EU/mL です。試験手順の詳細については、PyroCell® MAT HS System 定期試験ユーザーガイドをご覧ください。

1-2 試験手順の概要

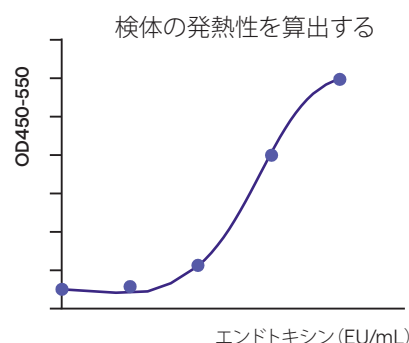
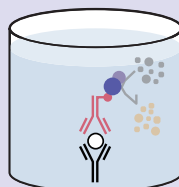
1日目：pMAT細胞の刺激

- エンドトキシン希釈液を調製する。
- 細胞培養プレートに試験検体を調製する。
- pMAT 細胞を解凍し、プレートに移し、18 ~ 24 時間インキュベートする。



2日目：IL-6 ELISA法

- 培養上清を回収する。
- IL-6 ELISA 法で
IL-6 サイトカインを検出する。
- 結果はマイクロプレート吸光度
リーダーによる。



1-3 PyroCell® MAT HS Rapid システムの保存条件

ー pMAT細胞及びMAT用ヒト血清サプリメント

- -80℃以下で保存する。ー 融解後は直ちに使用し、再凍結はしない。
- 使用期限内に使用する。ー pMAT 細胞の有効期限は出荷後、最長 6 ヶ月です。
- pMAT 細胞のバイアルは培地の色がピンク色から黄色に変色しているものは使用しない。
ー 濁りやその他微生物汚染の可能性あります。

ー PeliKineコンパクトヒトIL-6 ELISA Rapidキット (00296406)

- PeliKine Human IL-6 ELISA Rapid Set A (M2018) と PeliKine Human IL-6 ELISA Rapid Set B (M2019) から構成される。ともに 3 試験 (96well × 3 回) 分です。
- PeliKine Human IL-6 ELISA Rapid Set A は -18 ~ -32℃で保存する。
- PeliKine Human IL-6 ELISA Rapid Set B は 2 ~ 8℃で保管する

ー 共通

- 濁りやその他微生物汚染の徴候を示す試薬は使用しない。
- 有効期限が過ぎた試薬は使用しない。

2 試験手順

2-1 試験手順 1日目

2-1-1 事前準備

必要な溶液

- エンドトキシン (RSE) 標準品 1 mL 希釈、
0.64 EU/mL (連続希釈法)。
- エンドトキシン添加希釈液 (2 mL)、
0.32 EU/mL (最大 3 検体)
- 検体希釈液 2.5 mL (最大 3 検体)
- 1 mL の非エンドトキシン発熱性物質 (NEP) 希釈液 (任意コントロール、3 番目のサンプルを交換)。

留意点

- 完全培地または pMAT Cells を含む希釈液はボルテックスしない。
- 実験日に無菌環境 (安全キャビネット等) で細胞培養用の全希釈液を調製します。※ボルテックスも含む
- 発熱性物質を含まない付属品とチューブのみを使用してください。試薬を室温に平衡化してから使用してください。
- 気泡や泡の生成を避けてください。
- プレート上の最高希釈倍数は最大有効希釈倍数 (MVD) を超えてはなりません。
- プレートでの最終希釈 : 全試料で 2 倍。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	0.64 EU/mL (R5)	0.32 EU/mL (R4)	0.16 EU/mL (R3)	S1- 1/2	S1- 1/2	S1- 1/4	S2- 1	S2- 1/2	S2- 1/4	S3- 1	S3- 1/2	S3- 1/4
C												
D												
E												
F	0.08 EU/mL (R2)	0.04 EU/mL (R1)	Blank (R0)	S1- + RSE sp ike	S1- 1/2 + RSE sp ike	S1- 1/4 + RSE sp ike	S2- 1 + RSE sp ike	S2- 1/2 + RSE sp ike	S2- 1/4 + RSE sp ike	S3- 1 + RSE sp ike	S3- 1/2 + RSE sp ike	S3- 1/4 + RSE sp ike
G												
H												

カラム1~3:5ポイントの標準曲線 (0.64~0.32~0.16~0.08~0.04EU/mL) とブランク試料。

カラム4-6, 7-9, 10-12: 対照エンドトキシン添加 (0.32 EU/mL) の有無にかかわらず試験サンプル (各3希釈)。

2-1-2 完全培地の調製

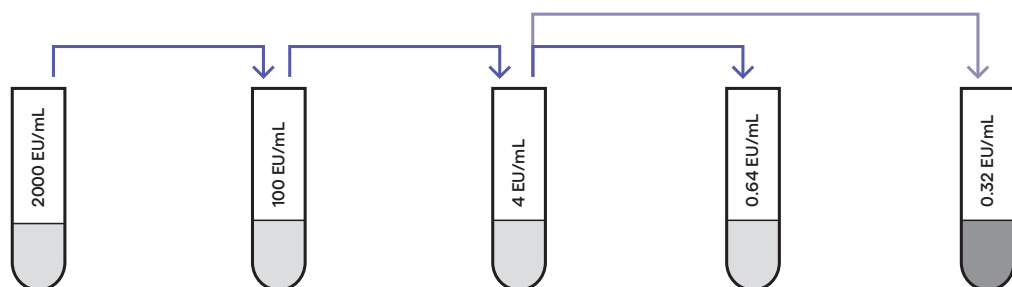
- MAT Human Serum Supplement バイアル（白キャップ）を 37℃ のウォーターバスで解凍します。
- バイアルの全内容物（2 mL）を 33 mL の IMDM を入れたパイロジェンフリーの 50 mL チューブに加えます。
- 密閉した 50 mL チューブを穏やかに 10 回転倒混和する。調製後の完全培地は 8 時間以内に使用します。

※IMDMは未開封のボトルを使用するなど無菌が担保されているものを使用する。完全培地は使用前に室温（18℃～25℃）にて平衡化する。

2-1-3 エンドトキシン希釈液の調製

STEP1：連続希釈

STEP2：スパイク液（注意：4 EU/mLから作製）



RSE (Lonza # E700) を5mL LAL waterで溶解 (2,000 EU/ml)	50 μ LのRSE溶液 (2,000:EU/mL) と 950 μ L IMDM	40 μ LのRSE溶液 (100 EU/mL) と 960 μ L 完全培地	160 μ LのRSE溶液 (4 EU/mL) と 840 μ L 完全培地	160 μ LのRSE溶液 (4 EU/mL) と 1,840 μ L完全培地
ボルテックス30分 ※原液のアリコート 使用の場合、融解後 ボルテックス3分	ボルテックス3分	ピペッティングに より10回混和	ピペッティングに より10回混和	ピペッティングに より10回混和 ※RSE溶液 (4 EU/ mL) を希釈する!!
2,000 EU/m L	100 EU/m L	4 EU/m L	0.64 EU/m L	0.32 EU/m L

2-1-4 細胞培養プレートの調製

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

STEP3：完全培地を移す

- 全ての黄色ウェルに完全培地 100 μ L を加える。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	0.64 EU/mL	0.32 EU/mL	0.16 EU/mL									
C	(R5)	(R4)	(R3)									
D												
E												
F	0.08 EU/mL	0.04 EU/mL	Blank									
G	(R2)	(R1)	(R0)									
H												

STEP4:エンドトキシン標準曲線の作製

- ウェル A1-D1 に 0.64 EU/mL の RSE 希釈液 200 μ L を加える。
- A1-D1 から A2-D2 に 100 μ L 移します。
上下 10 回にピペッティングして混和する。
- 図に示すように、A2-D2 から A3-D3 へ、次に E1-H1 と E2-H2 への混和を繰り返す。
- E2-H2 から 100 μ L 廃棄する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E				S1-1	S1-1/2	S1-1/4	S2-1	S2-1/2	S2-1/4	S3-1	S3-1/2	S3-1/4
F												
G												
H												

STEP5:検体希釈調製

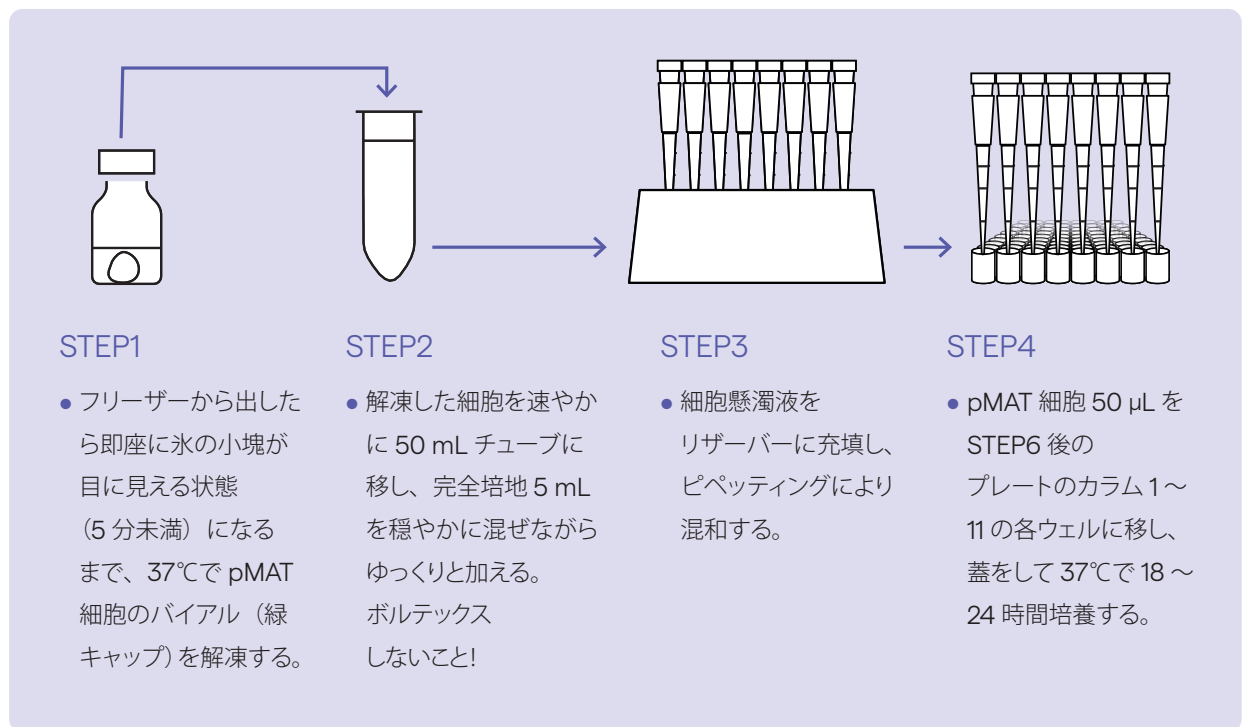
- カラム 4 に試料 S1 200 μ L を加える。
- カラム 4 から 5 へ、そしてカラム 5 から 6 へ 100 μ L 移す。毎回ピペットで上下 10 回ずつ混和する。
- カラム 6 から 100 μ L を廃棄する。
- 他の試験検体、例えば検体 S2 (7-9 列)、S3 (10-12 列) について 2 倍希釈を繰り返す。
- (NEP の場合はオプション) E10-H10 にサンプル S1 を 100 μ L、E11-H11 にサンプル S2 を 100 μ L 加えます。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

STEP6:エンドトキシンスパイク

- 黄色ウェルに完全培地 50 μ L を加える。
- 灰色のウェルにエンドトキシン添加溶液 (0.32 EU/mL) 50 μ L を加える。

2-1-5 pMAT細胞の解凍とプレートでのインキュベート



2-2 試験手順 2日目

2-2-1 ヒトIL6 ELISA法

留意点

- 室温で解凍しておく。
- 使用前に全ての緩衝液および溶液を室温に平衡化してください。（例外：ストレプトアビジン-HRP 試薬は使用直前に解凍する。）
- 20x 濃縮洗浄液は 2 本のため、3 試験分として使用するためには使用量を調製し希釈すること。
- （使用濃度の洗浄液は 2 ～ 8℃で最長 2 ヶ月保存可能）
- 洗浄ステップ中は、最後の洗浄ステップ後にすべてのウェルが完全に空になるようにしてください。

2-2-2 細胞培養上清の回収、希釈、及び緩衝液の調製

- 細胞培養プレート（day1 の STEP4）からの上清（100 µL ～ 150 µL）を新鮮な 96 ウェルプレート（プレート 1）に移す。※懸濁を避け、pMAT セルはプレートの下部に残し、上清のみ採取する。
（次の手順以降に残った上清は予備の試験用として -20℃で保存可能です。）
- 5xHPE 緩衝液（透明キャップ）15 mL を蒸留水 60 mL に溶解する。
- 96 ウェル（可能なら丸底）プレート（プレート 2）の各ウェルに HPE 緩衝液 120 µL を加え、各上清液の希釈液（例えば 1：5 希釈）を調製する。
プレート 1 の上澄み 30 µL をプレート 2 の対応するウェルに移す。
ピペッティングにより混和する。

3 ELISA反応、及び洗浄手順

調製 (1プレート)	各ウェルに添加する	インキュベーション/洗浄
- 採取した上清を 5 回ピペッティングにより均質化する。 ビオチン化 IL-6 抗体 (黄色キャップ) - ビオチン化抗体 120 μL を 1x HPE 緩衝液 9.6 mL で希釈する。 - チューブを 10 回転倒させて混ぜる。	(上清希釈液 : 1 : 5) - プレコーティングプレートに上清を 20 μL 加える。 ※プレートレイアウトは維持する (任意)「空」のウェルに IL-6 標準希釈液 20 μL を加える ※ユーザーガイド参照 - ビオチン化 IL-6 抗体希釈液 80 μL を加え、優しく 3 回ピペッティングにより混和します。 - 粘着シールでプレートを覆う。	18 ~ 25°C で 1 時間 洗浄工程の直前に streptavidin HRP 結合体希釈液を調製する。
洗浄緩衝液で洗浄する	1x 洗浄用緩衝液で洗浄 300 μ L/ ウェル	5 回
streptavidin -HRP 結合体 (褐色キャップ) - streptavidin -HRP 2 μL を 1x HPE 緩衝液 20 mL で希釈する。 - チューブを 10 回転倒させて混ぜる。	- streptavidin -HRP 結合体希釈液 100 μL を加える。 - 粘着シールでプレートを覆う。 - プレートの端を数秒間タップして、プレートをそっと撹拌します。	18 ~ 25°C で 30 分 TMB 基質液を平衡化し、 洗浄工程前に 18 ~ 25°C に平衡化する。
洗浄緩衝液で洗浄する	1x 洗浄用緩衝液で洗浄 300 μ L/ ウェル	5 回
TMB 基質液 使用する準備ができます。	- TMB 基質液 100 μL を加える - 端を数秒間タップして、プレートをそっと撹拌します TMB 基質を光への曝露から保護!	暗所で 18 ~ 25°C で約 10 分、例えば、引き出しを使用する。 プレートをアルミホイルで覆わない!
停止液により反応を止める 使用する準備ができます。	停止液 100 μ L を各ウェル加える。	色は最大 30 分間安定である。

MAT試薬・試験用物品

製品名	製造番号
PyroCell® MAT HS Rapid System	00296408
PyroCell® MAT HS Rapid System S	00296408S
PyroCell® MAT Rapid System	00296407
PyroCell® MAT Rapid System S	00296407S
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	12-722F
エンドトキシン標準品 (RSE-USP)	E700
エンドトキシン試験用水 (100 mL)	W50-100
希釈用キャップなし試験管、 パイロジェンフリー (サイズ:13×100 mm)	N207
試験用リザーバー (マルチチャンネルピペット用)	00190039
エンドトキシン試験用96wellマイクロ プレート<0.00005EU/well	25-340
Eppendorf® Biopurチップ、2-200 µL、 パイロジェンフリー	25-415
Eppendorf® Biopurチップ、50-1000 µL、 パイロジェンフリー	25-417
Nebula® Multimode Reader (450 nm & 540-590 nm)	25-375S
Nebula® Absorbance Reader (450 nm & 540-590 nm)	25-365S

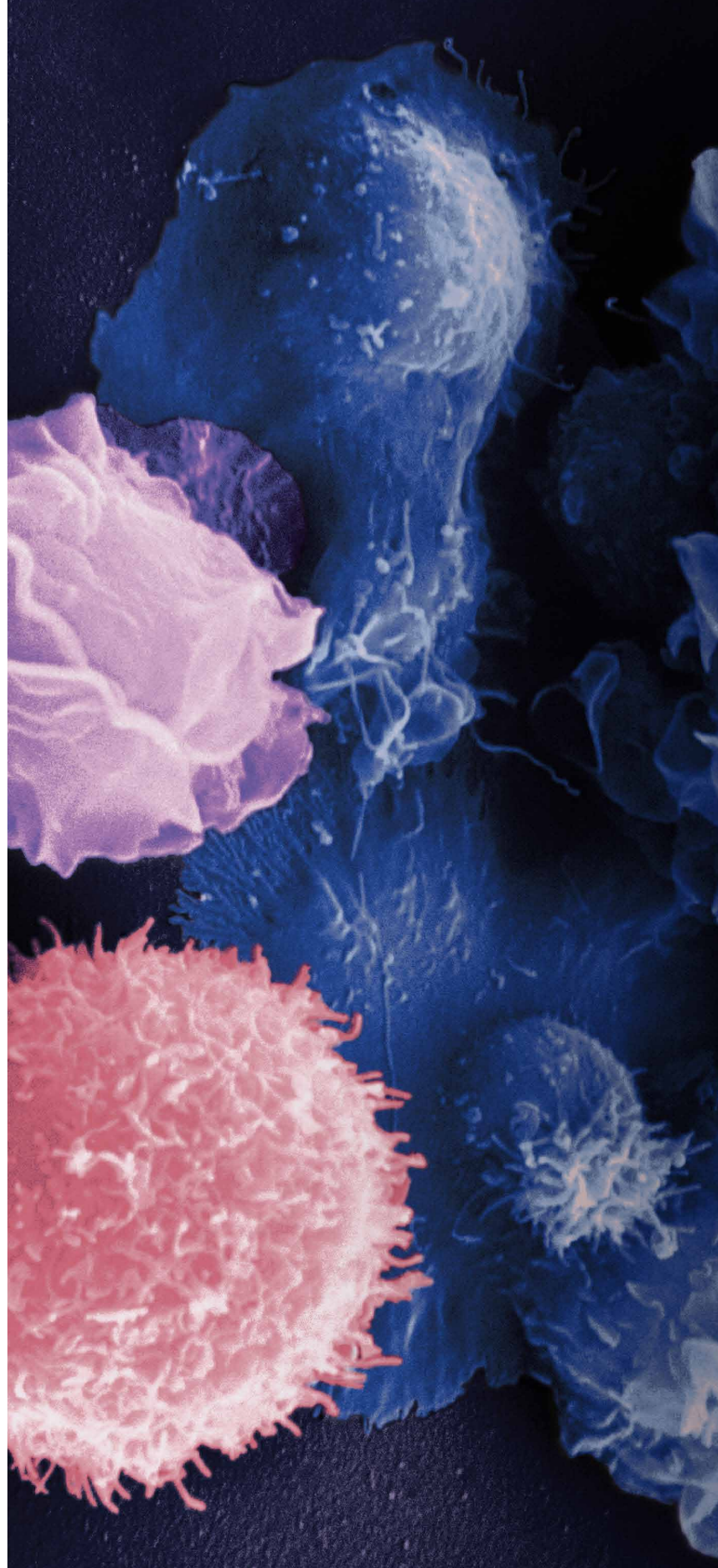
<オプション> 非エンドトキシン発熱物質

その他、ご準備いただく物品

- 50 mL 試験管 (細胞培養グレード、エンドトキシンフリー)
- メスシリンダー及びフラスコ (緩衝液調製用)
- 96well (丸底) プレート (標準品、必要に応じて)
- ピペットチップ、パスツールピペット (エンドトキシンフリー)
- 電動ピペット (パスツールピペット用)
- 自動 96well プレートウォッシャー
- 調整可能なピペット、マルチチャンネルピペット、
- 安全キャビネット (無菌操作用)
- CO² 細胞培養用インキュベーター (37℃、5% CO² 濃度)
- ウォーターバス (37℃)

参考資料

- 分析証明書 (CoA)、www.lonza.com/coa
- PyroCell® MAT HS Rapid システム 定期試験ユーザーガイド
- PyroCell® MAT System FAQs
- 欧州薬局方 第 11 版



ロンザ株式会社

バイオサイエンス事業部

〒103-0027 東京都中央区日本橋2-1-14 日本橋加藤ビルディング9階

受注・在庫紹介 TEL: 03-6264-0620

セールス TEL: 03-6264-0660

E-mail: bioscience.sales.jp@lonza.com

テクニカルサポート TEL: 03-6264-0660

E-mail: lbstesting.jp@lonza.com

<http://www.lonzabio.jp/>