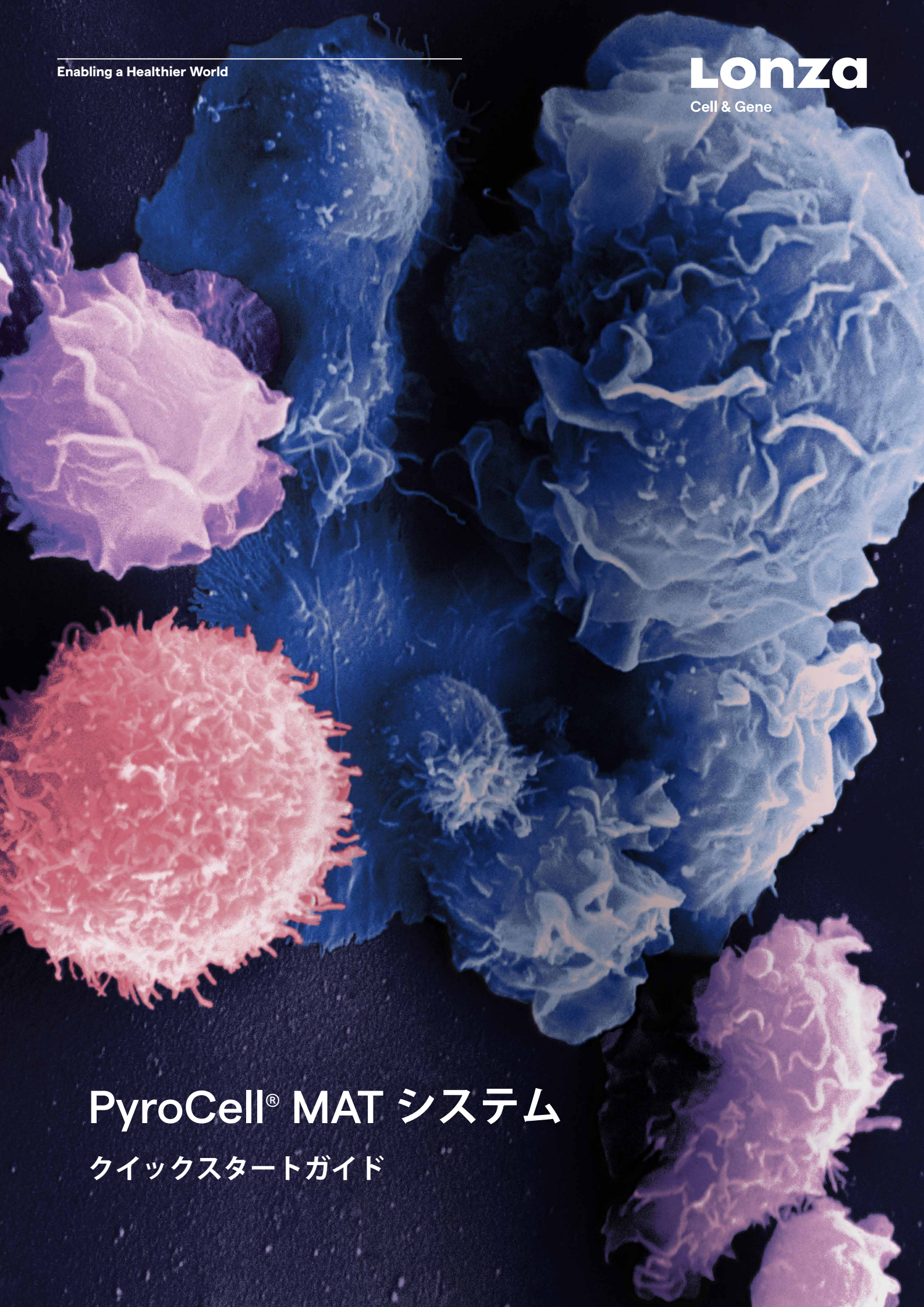
Enabling a Healthier World

Lonza
Cell & Gene



PyroCell® MAT システム

クイックスタートガイド

PyroCell® MATシステムによる被験物質中の発熱性物質の混入の*in vitro*検出の定期試験

PyroCell® MAT システム、IL-6 は、4 人の健康なヒトドナーからプールした凍結保存 PBMC（pMAT 細胞）、最適化された MAT 培養培地サプリメント、およびヒト IL-6 ELISA アッセイシステム（00254714）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 ヒト IL-6 ELISA kit. 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。

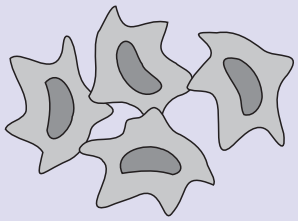
定量試験（A 法）、半定量試験（B 法）及び参照ロット比較試験（C 法）

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 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

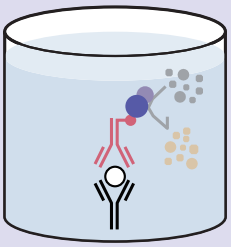
- エンドトキシン希釈液を調製する。
- 細胞培養プレートに試験検体を調製する。
- pMAT 細胞を解凍し、プレートに移し、18 ～ 24 時間インキュベートする。

- ELISA プレートのオーバーナイトコーティング

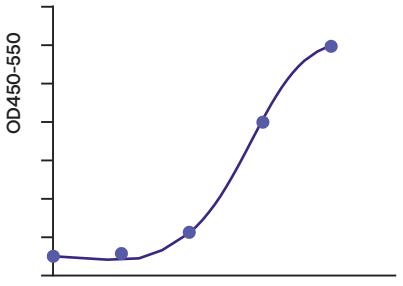


2日目：IL-6 ELISA法

- 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。

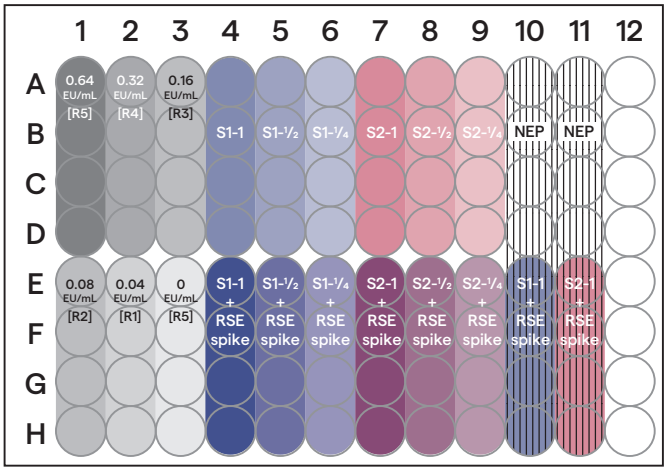


検体の発熱性を算出する



1日目：pMAT細胞の刺激

（5.3.1. Preparation of complete medium）



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

カラム4-6および7-9：対照エンドトキシン添加（最終濃度0.16 EU/mL）の有無にかかわらず試験サンプル（各３段階の希釈）

※PyroCell® MAT HS Systemの場合は標準曲線（0.64～0.32～0.16～0.08～0.04 EU/mL）とブランク資料とし、スパイク液は0.32EU/mLを添加する。

カラム10-12:試験サンプルまたは任意のNEP管理（完全培地およびサンプルS1-1およびS2-1にスパイク）

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。

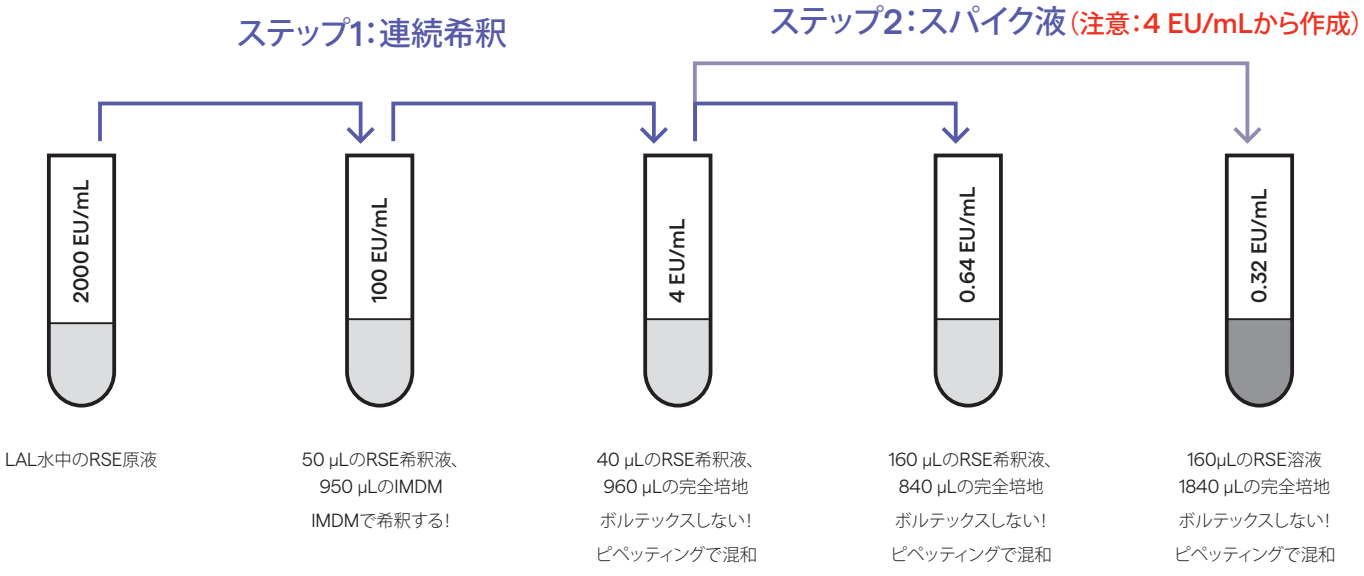
完全培地の調製

（5.3.1. Preparation of completmedium）

- 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 50mL 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。

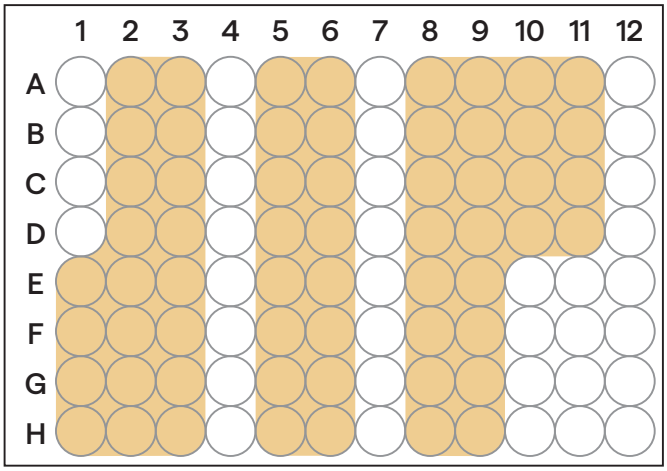
※IMDMは未開封のボトルを使用するなど無菌が担保されているもの使用する。　完全培地は使用前に室温（18℃～25℃）にて平衡化する。

エンドトキシン希釈液　（5.3.2 Preparation of reference endotoxin dilutions）



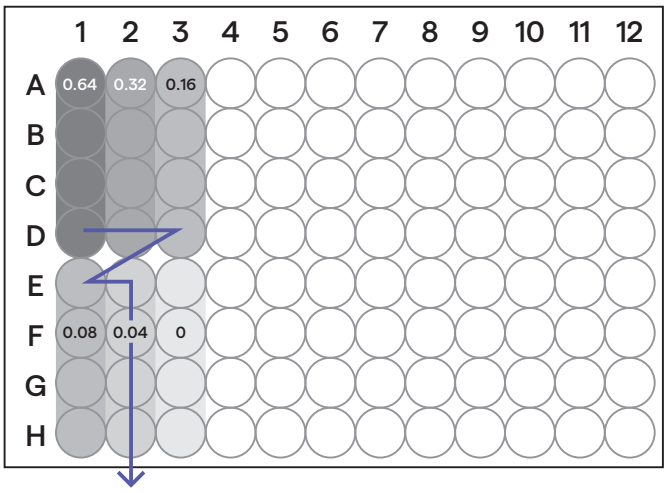
細胞培養プレートを調製する

(5.3.3 Preparation of product sample dilutions)



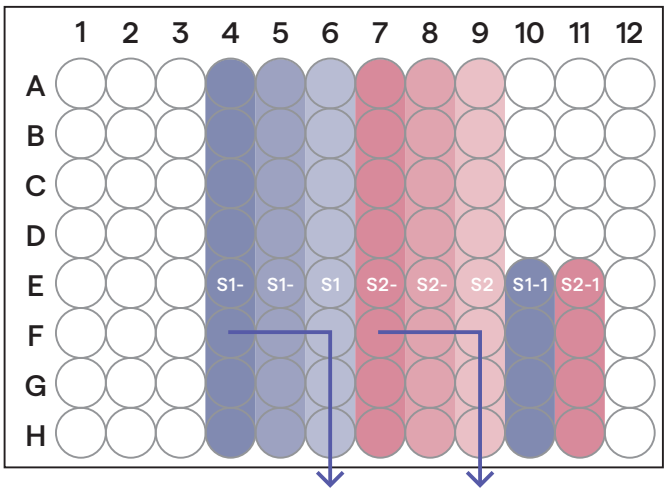
ステップ3：完全培地を移す

- 全ての黄色ウェルに完全培地 100 µL を加える。



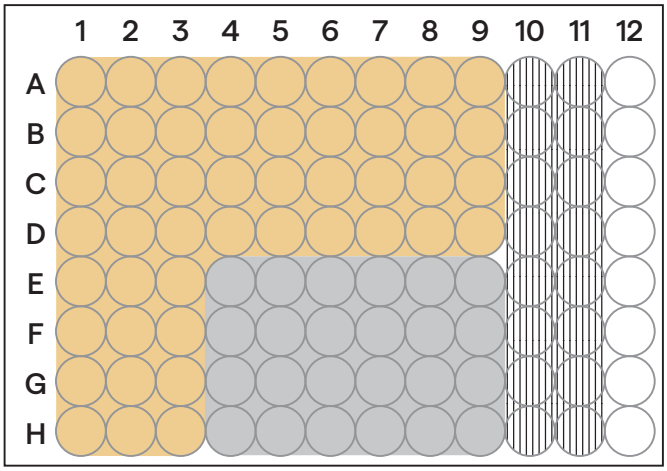
ステップ4：エンドトキシン標準曲線の作成

- ウェル A1-D1 に 0.64 EU/mL の RSE 希釈液 200 µL を加える。
- A1-D1 から A2-D2 に 100 µL 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 µL 廃棄する。



ステップ5：検体希釈調製

- カラム 4 に試料 S1 200 µL を加える。
- カラム 4 から 5 へ、そしてカラム 5 から 6 へ 100 µL 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 µL を廃棄する。
- 他の試験検体、例えば検体 S2（7-9 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 µL、E11-H11 にサンプル S2 を 100 µL 加えます。

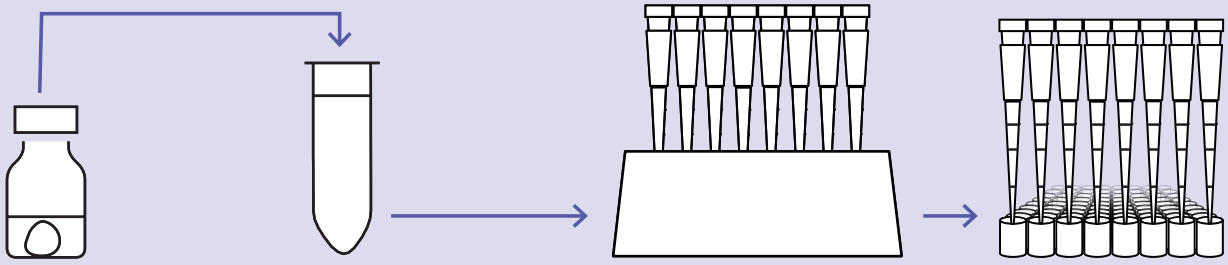


ステップ6：エンドトキシンスパイクとオプション、NEPコントロールを追加

- 黄色ウェルに完全培地 50 µL 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 µL を加える。
- カラム 10 及び 11（ストライプウェル）に NEP 50 µL を加える。

pMAT細胞を解凍し、プレートに移てインキュベートする

（5.3.4 Incubation of test samples with pMAT Cells）



ステップ1

- フリーザーから出したら即座に氷の小塊が目に見える状態（5 分未満）になるまで、37℃で pMAT 細胞のバイアル（緑キャップ）を解凍する。

ステップ2

- 解凍した細胞を速やかに 50 mL チューブに移し、完全培地 5 mL を穏やかに混ぜながらゆっくりと加える。ボルテックスしないこと！

ステップ3

- 細胞懸濁液をリザーバーに充填し、ピペッティングにより混和する。

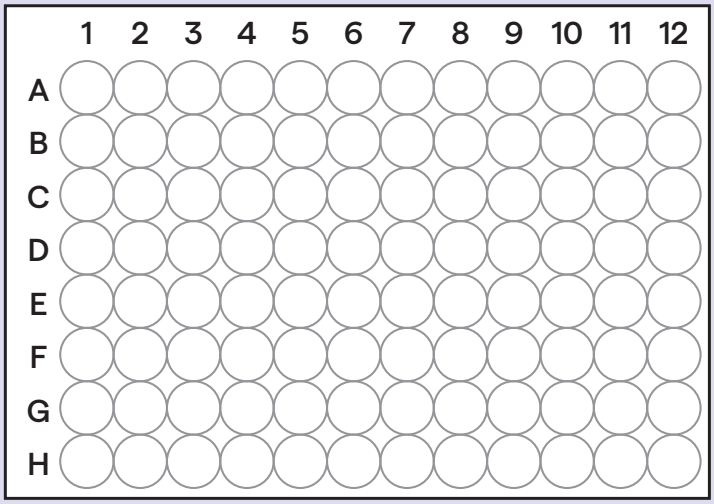
ステップ4

- pMAT 細胞 50 µL をステップ 6 後のプレートのカラム 1 ～ 11 の各ウェルに移し、蓋をして 37℃で 18 ～ 24 時間培養する。

ステップ1:ELISAプレートのオバーナイトコーティング(1日目)

(5.4.2 Overnight coating of the microtiter plate (day 1))

- コーティング緩衝液カプセル(1粒)の内容物のみを 100 mL 蒸留水に入れ、カプセルの内容物を溶かし、5 分間インキュベートする。
- コーティング抗体 120 µL(赤キャップ)をコーティング緩衝液 12mL で希釈し、10 回転倒混和します。
- マイクロタイタープレートの各ウェルに 100 µL のコーティング抗体溶液を加え、室温(18℃〜 25℃)で一晩インキュベートします。

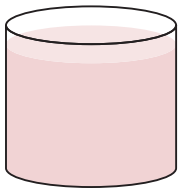


2日目: IL-6 ELISA法 (5.4 Routine testing - IL-6 ELISA)

留意点

- 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。
- 使用前に全ての緩衝液および溶液を室温に平衡化する。(例外:抗 IL 6 抗体およびストレプトアビジン -HRP 試薬)。
- 予め 5xHPE 緩衝液(透明キャップ)を室温で解凍しておく。

ステップ2:細胞培養上清の回収(ステップ4で使用)

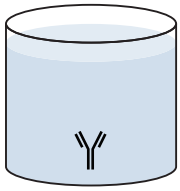


(5.3.4 Incubation of test samples with pMAT Cells:上清の回収)
(5.4.1 Preparation of working strength buffe: HPE 緩衝液の調製)
(5.4.3 Prepare dilutions of the cell culture supernatants: 上清の希釈)

- 細胞培養プレート(day1 のステップ 4)からの上清(100 µL 〜 150 µL)を新鮮な 96 ウェル(可能なら丸底)プレート(プレート 1)に移す。
  (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。(ステップ 4 で使用)

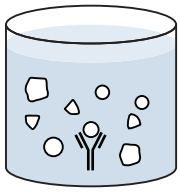
ELISAのために洗浄手順 (5.4.5 ELISA incubation and wash steps)

ステップ3:



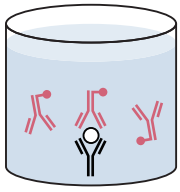
ELISAステップ	洗浄(ステップ1のプレート)	→	非特異的結合部位の遮断
試薬	PBS緩衝液(PBS錠1錠を蒸留水200 mL中に溶解)		ブロッキング緩衝液(500 µL ブロッキング試薬(透明キャップ)を25 mLのPBS緩衝液で希釈し、10回転倒混和する。)
使用	PBS緩衝液で洗浄 300 µL/ウェル × 4回		200 µL/ウェルで加える 18〜25℃で1時間インキュベーション アドヘンシブシールでカバーする

ステップ4:



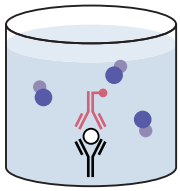
ELISAステップ	洗浄	→	上清からのサイトカインの結合 (オプション、IL-6標準希釈液を加える)
試薬	洗浄緩衝液(50 mL 20 x 濃縮(50 mLボトル)を蒸留水950 mLで希釈)		上清希釈液(プレート2、ステップ2のもの)
プロセス	洗浄緩衝液で洗浄 300 µL/ウェル × 5回		100 µL/ウェルで加える 18〜25℃で1時間インキュベーション アドヘンシブシールでカバーする

ステップ5:



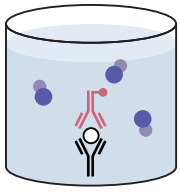
ELISAステップ	洗浄	→	抗サイトカイン抗体の結合
試薬	洗浄緩衝液(ステップ4より)		ビオチン化抗IL-6抗体溶液 (120 µL抗体(黄色キャップ)をHPE緩衝液12 mLで希釈し、10回転倒混和する)
工程	300 µL/ウェル × 5回		100 µL/ウェルで加える 18〜25℃で1時間インキュベーション アドヘンシブシールでカバーする

ステップ6:



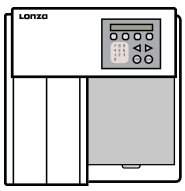
ELISAステップ	洗浄	→	HRP結合体の結合
試薬	洗浄緩衝液(ステップ4から)		ストレプトアビジン-HRP抱合抗体溶液 (1.2 µL抗体(茶色キャップ)をHPE緩衝液12 mLで希釈 し、10回転倒混和する)
工程	300 µL/ウェル × 5回		100 µL/ウェルで加える 18〜25℃で30分間インキュベーション アドヘンシブシールでカバーする

ステップ7:



ELISAステップ	洗浄	→	呈色反応 と 反応停止
試薬	洗浄緩衝液(ステップ4から)		TMB基質液(40 mLボトル)100 µLを各ウェルに加え、18〜25℃で最大10分間暗所でインキュベートアドヘンシブシールでカバーする ※引出利用。アルミホイルは使用しない
工程	300 µL/ウェル × 5回		ストップ液100 µLを各ウェルに加える ※安定した発色は30分以内

ステップ8:



結果を読む

- **プレートリーダー（例 :ELx808 Reader）を用い、30 分以内に波長 450 nm 及び 540 ～ 590 nm における吸光度（OD）を測定する。**
- **結果を分析する。**

MAT試薬・試験用物品

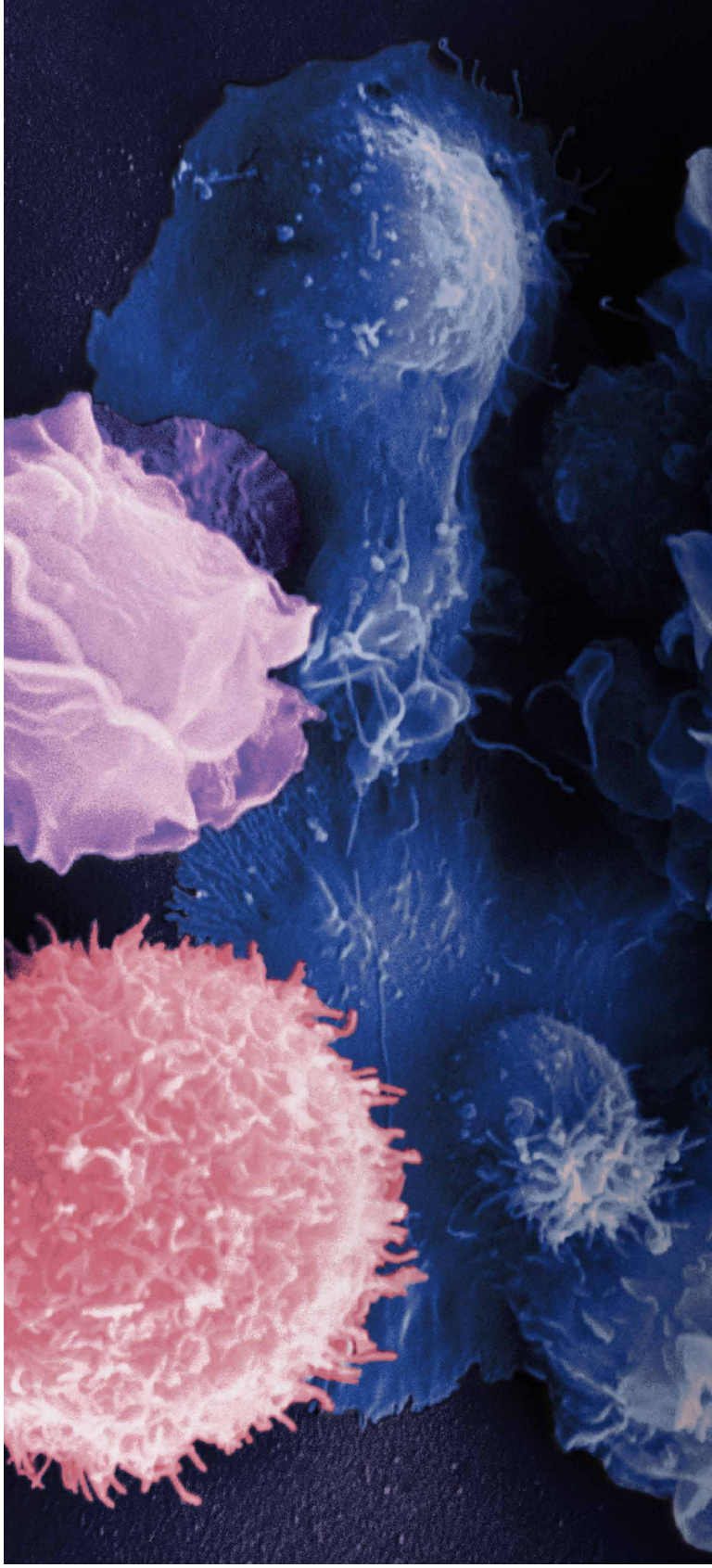
製品名	製造番号
PyroCell® MAT Syetem、IL-6	00254714
PyroCell® MAT HS System	00254715
Iscove's Modified Dulbecco's Medium（IMDM）	12-722F
エンドトキシン標準品（RSE-USP）	E700
エンドトキシン試験用水（100mL）	W50-100
希釈用キャップなし試験管、パイロジェンフリー（サイズ：13×100nm）	N207
試験用リザーバー（マルチチャンネルピペット用）	00190039
エンドトキシン試験用96well マイクロプレート<0.00005EU/well	25-340
Eppendorf® Biopurチップ、2-200µL、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
フィルタ付き ELx808™ リーダー（450nm & 540-590nm）	25-315S
（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

- 50mL試験管(細胞培養グレード、エンドトキシンフリー)
- ビーカー及び試験管(緩衝液調製)
- 容量および血清学的ピペット(必要に応じて)
- 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、
- ピペットチップ(標準品)
- 96well丸底プレート(基準)
- 安全キャビネット(無菌操作用)
- CO_2 細胞培養用インキュベーター(37℃、5% CO_2 濃度)
- ォーターバス(37℃)
- 自動マイクロプレートウォッシャーおよびマイクロプレートシェーカー

参考資料

- 分析証明書(CoA)、www.lonza.com/coa
- PyroCell® MAT HS System 定期試験ユーザーガイド
- PyroCell® MAT System FAQ s
- 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/

RES-LF2310-02