

ADRA 技術講習会

-プロトコル・手技説明-

2023年1月19日

富士フイルム株式会社

山本 裕介

**NEVER
STOP**

FUJIFILM
Value from Innovation

各種入手可能な手順書等

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

- ・ 96ウェルプレート 配置図
- ・ HPLC条件
- ・ データ解析用シート (UV用・FL用)
- ・ 96ウェルプレート 操作用シート
- ・ NAC, NAL安定性確認用シート

その他

- ・ SOP (ver. 2.0)
https://www.jacvam.jp/files/list/05/05_07_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

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)

富士フイルムでの使用品を緑字で記載

- ・ 水 (蒸留水以上のグレード)
推奨製品： ①光製薬 注射用水
②大塚製薬 大塚蒸留水 (日本薬局方 注射用水)
- ・ アセトニトリル [富士フイルム和光; Cat#015-08633]
- ・ アセトン [富士フイルム和光; Cat#016-00346]
- ・ ジメチルスルホキシド(DMSO) [富士フイルム和光; Cat#043-07216]
- ・ トリフルオロ酢酸 (TFA) [富士フイルム和光; Cat#204-02743]
- ・ 陽性対照 (下記2種のうちどちらか1つあればOK)
 - ①Phenylacetaldehyde, CAS No. 122-78-1 [SIGMA; Cat#107395, Alfa Aesar; Cat# A14263]
 - ②Squaric acid diethyl ester, CAS No. 5231-87-8 [東京化成; Cat.#D3253, SIGMA; Cat#310778]

器具

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

富士フィルムでの使用品を緑字で記載

- ・500 mL程度の容量のある容器（緩衝液調製用） [サンセイ医療器材; Cat#07-004-01]
 - ・10 mL-100 mLを分取可能なメスピペット（緩衝液、NAC, NAL溶液調製用）
[Falcon; Cat#356551(10mL), 356525(25mL), 356550(50mL), 357600(100mL)]
 - ・遠沈管：10 mL程度、100 mL程度の容量のあるもの
[Falcon; Cat#352196(15mL), Watson; Cat#536-150S(100mL)]
 - ・96ウェルプレート（非滅菌のものを推奨*） [Thermo (NUNC); Cat#267245]
 - ・プレートシール：密封性、耐溶剤性の高いもの [島津ジーエルシー; Cat#370-04030-01]
- } ポリスチレン製でもOK

* γ 線滅菌や電子線滅菌により、素材に含まれる添加剤（酸化防止剤等）の変化物が生成することが報告されており、それらが試験結果に影響を及ぼす可能性有

装置

- ・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℃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（PDAの方が望ましい）
- ・蛍光検出器（必須ではないが、UVで共溶出がみられるサンプルの測定に必要）
- ・HPLCカラム
推奨品：
 - ① Wakopak® Core C18 ADRA Φ 3.0 × 150mm
[富士フイルム和光純薬, Cat. 233-63991]
 - ② CAPCELL CORE C18 column (2.7 μ m, 3.0 × 150 mm)
[大阪ソーダ, Cat. 51112]
 - ③ CORTECS C18 Column (2.7 μ m, 3.0 × 150 mm)
[Waters, Cat. 186007373]
 - ④ Agilent, Poroshell 120 EC-C18 (2.7 μ m, 3.0 × 150 mm)
[Cat. 693975-302]

必須ではない器具・装置

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

富士フィルムでの使用品を緑字で記載

- ・ 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 [Corning; Cat#4870]
→ 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)
- ・ キャップリムーバー [Thermo; Cat#4469]
→ 上記セプラシールを着脱するための道具。1度に最大8個外すことが可能。

試験の流れ

事前作業

緩衝液の調製、HPLC溶離液の調製、被験物質の溶媒チェック

反応（1日目）

1. 4 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℃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

試験の流れ

事前作業

緩衝液の調製、HPLC溶離液の調製、被験物質の溶媒チェック

反応（1日目）

1. 4 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℃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

各緩衝液およびHPLC溶離液の調製

各緩衝液(NAC Buffer, NAL Buffer)の調製

- 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を確認する。

*1 NAC Bufferの調製時のみ実施

HPLC溶離液の調製（各1L調製する場合）

- 1) 1000 mL容器に水またはアセトニトリルを1000 mL計量する。
- 2) トリフルオロ酢酸（TFA）を1mL添加し混和する。

被験物質の溶媒選択

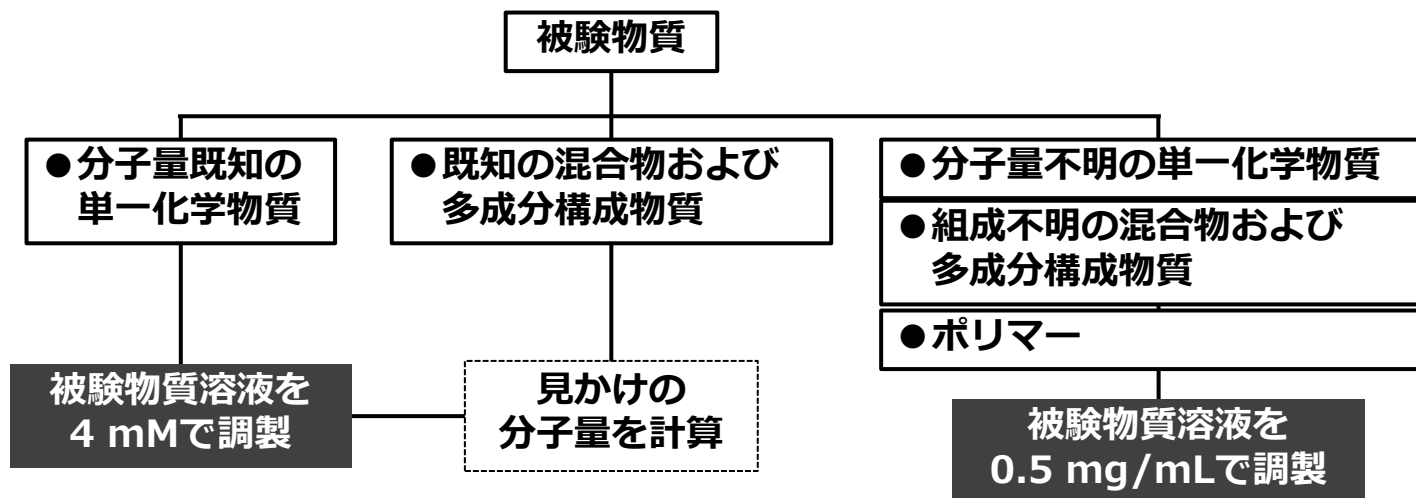
ADRAで使用可能な被験物質溶媒

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。

調製濃度について

下記フローに従って調製濃度（モル濃度 or 重量濃度）を決定する。



重量濃度による試験について

通常の方法 (4 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 (4 mM)

20 mM溶液の調製

4 mM溶液の調製



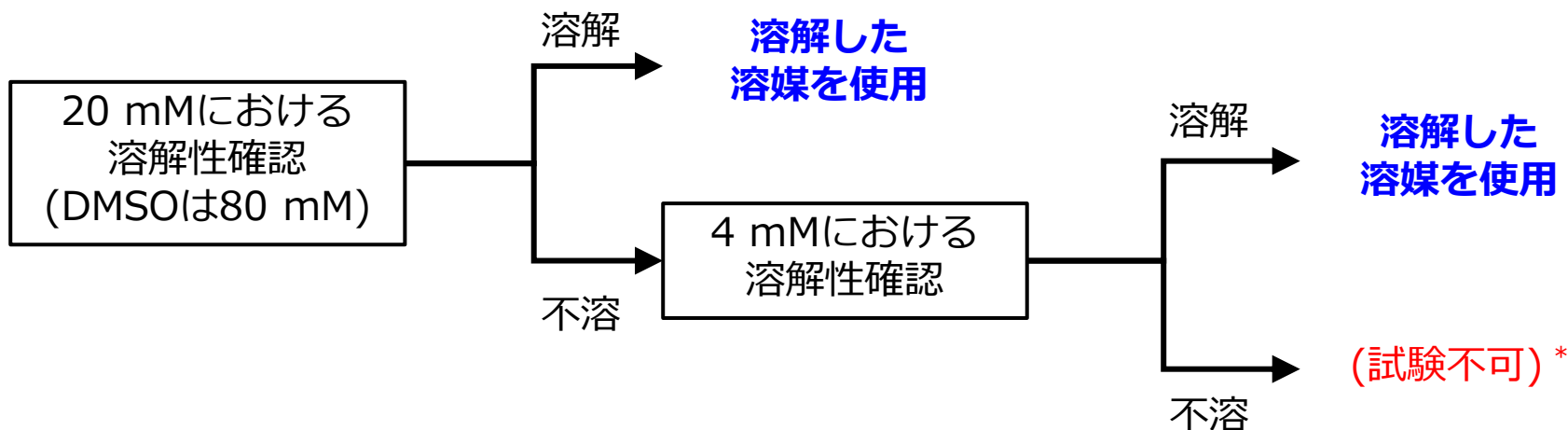
重量濃度法

10 mg/mL溶液の調製

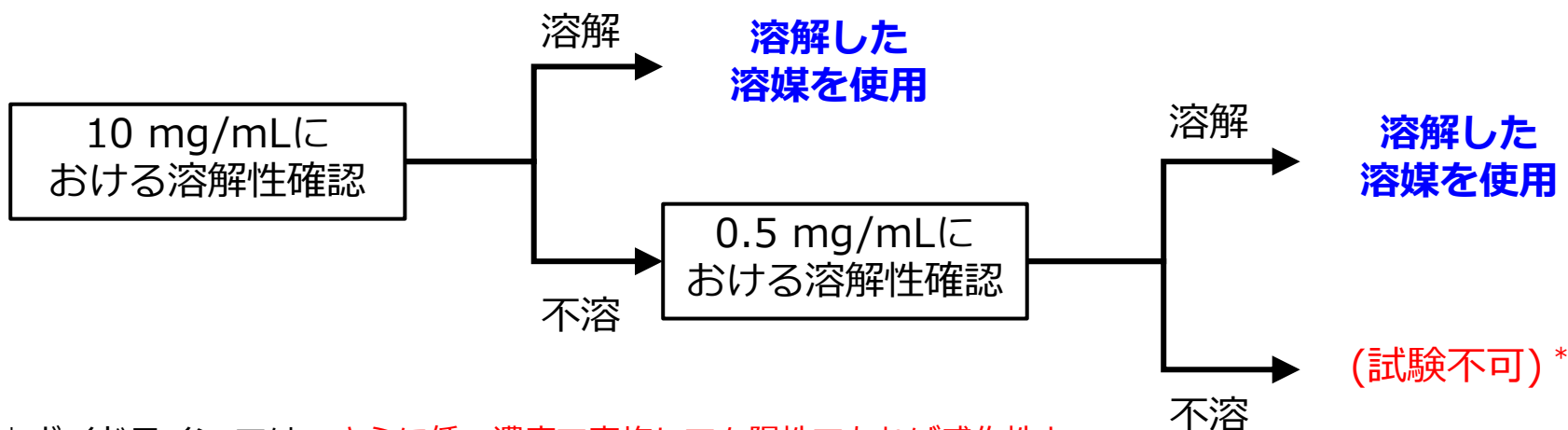
0.5 mg/mL溶液の調製

溶解性確認の流れ

分子量既知の被験物質の場合



分子量不明の被験物質の場合



* 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。また、上記以外でもNAC、NAL、被験物質の安定性が確認できる他の溶媒があれば使用可能となっている。

溶解性確認の手順（分子量既知の被験物質の場合）

1. 20 mM（80 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（DMSOは80 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（80 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. 4 mMにおける溶解性確認（20 mM（80 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4 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、4 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。

溶解性確認の手順（分子量不明の被験物質の場合）

1. 10 mg/mL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10 mg/mL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、10 mg/mL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. 0.5 mg/mLにおける溶解性確認（10 mg/mL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0.5 mg/mL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、0.5 mg/mL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。

試験の流れ

事前作業

緩衝液の調製、HPLC溶離液の調製、被験物質の溶媒チェック

反応（1日目）

1. 4 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℃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

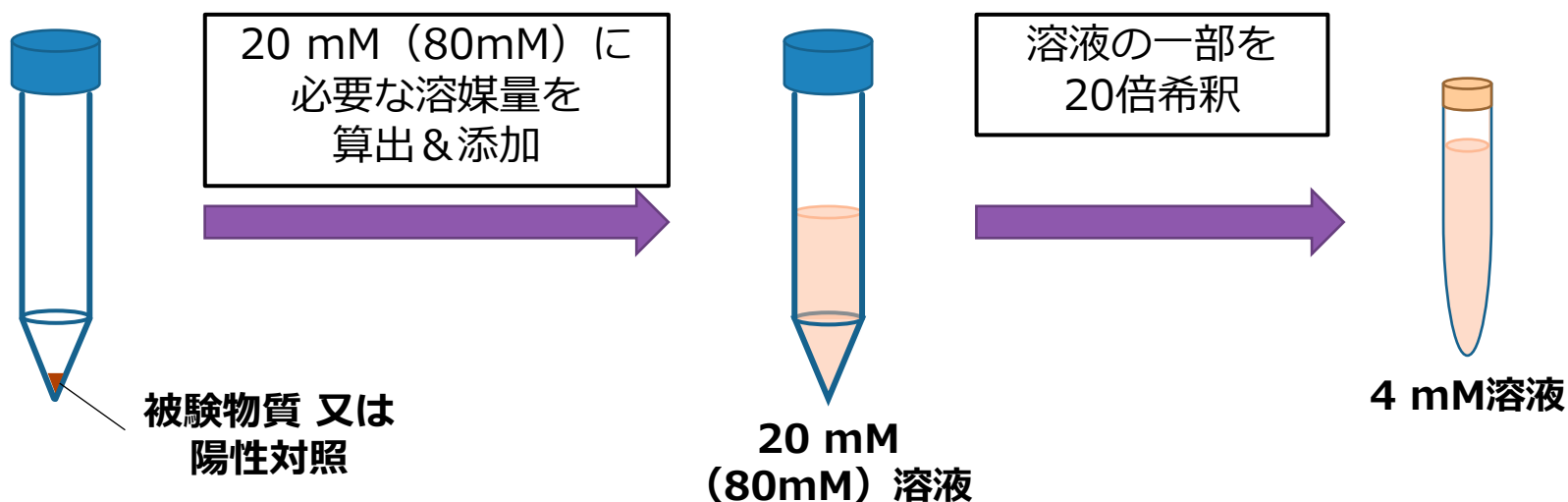
被験物質溶液（分子量既知物質）、陽性対照溶液の調製

陽性対照、20 mM溶液（80 mM）が調製可能な物質

- 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5倍希釈し、4 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80 mMに調製後、アセトニトリルで20倍希釈する。
- 4 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。



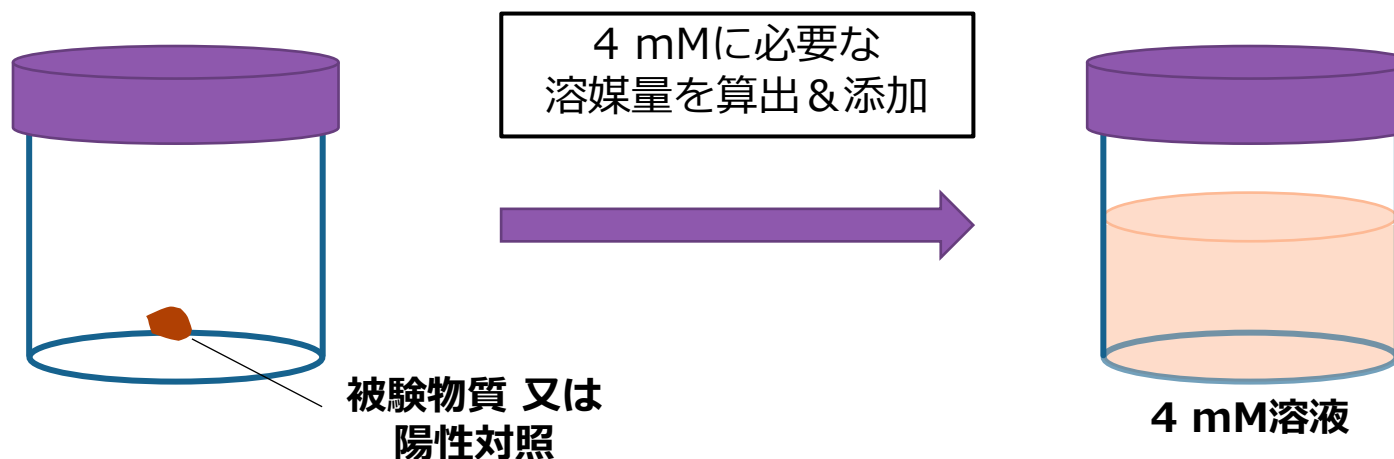
被験物質溶液の調製（分子量既知物質）

20 mM（80 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4 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4 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4 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。



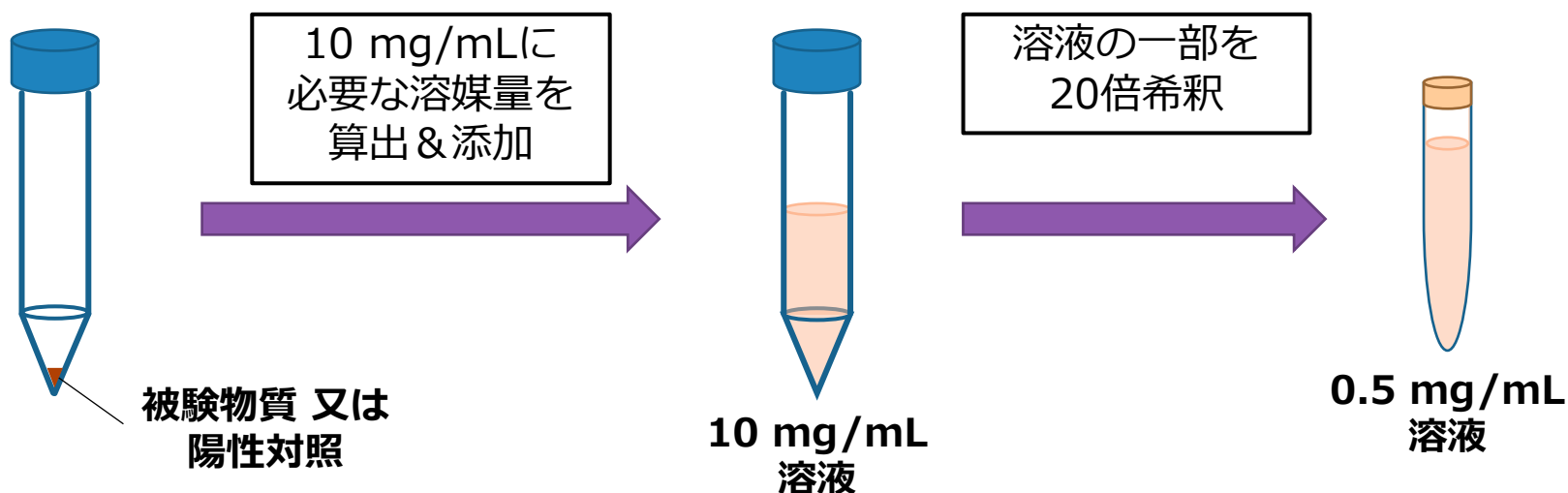
被験物質溶液（分子量不明物質）の調製

10 mg/mL溶液が調製可能な物質

- 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10 mg/mL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10 mg/mL溶液を調製する。
- 4) 上記の10 mg/mL溶液の一部を各溶媒で20倍希釈し、0.5 mg/mL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10 mg/mLに調製後、アセトニトリルで20倍希釈する。
- 0.5 mg/mL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。



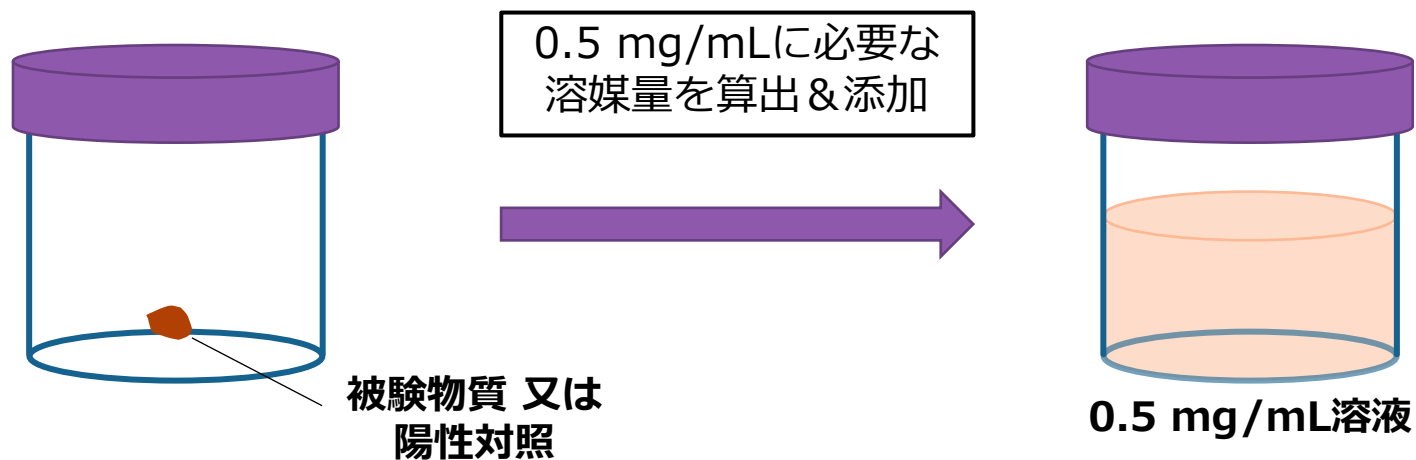
被験物質溶液の調製（分子量既知物質）

10 mg/mL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0.5 mg/mL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0.5 mg/mL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0.5 mg/mL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。



NAC, NAL溶液、標準液の調製

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-75 $^{\circ}$ C以下であれば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-75 $^{\circ}$ C以下で保存する。

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の安定性確認

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-75°C以下で保存する場合は、調製したタイミングで必ず安定性確認を行う（以後解凍して使用する際は確認不要）。
- ・ 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。
- ・ 安定性確認ではNACの二量体も定量する必要があり、NAC二量体は蛍光検出では定量できないため、必ずUV検出で測定する。

NAC, NALの安定性確認

安定性におけるクオリティ

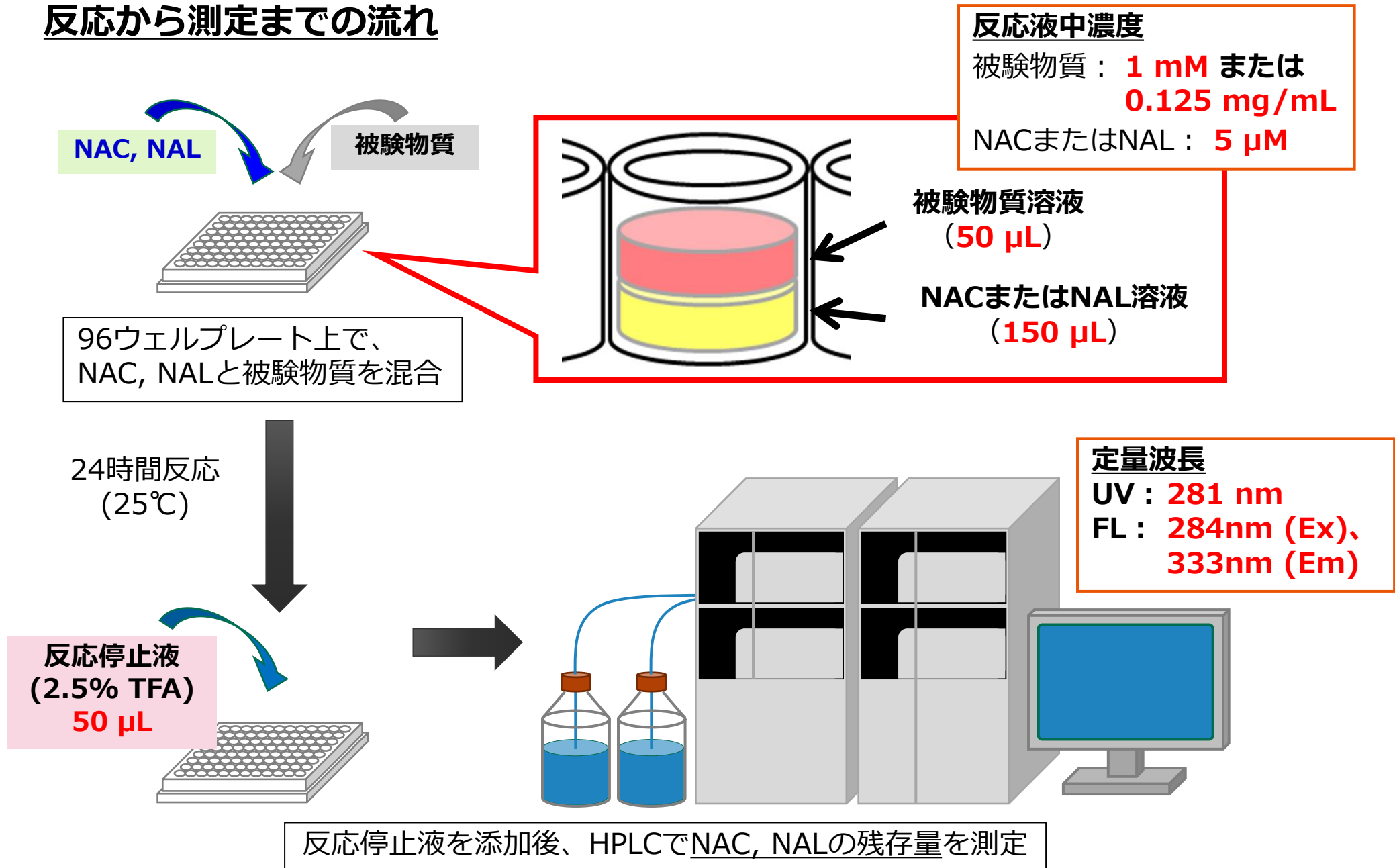
- 0時間、24時間それぞれにおけるNAC総量 (単体+二量体) に対するNAC単体の割合 $\geq 90\%$
- 0時間におけるNALに対する24時間におけるNALの割合 $\geq 90\%$

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、再度安定性確認試験を行い、再試験においても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。

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およびNAL溶液、NACおよびNAL Buffer、②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。

	RC-A	RC-B	RC-C	陽性対照	被験物質 *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			
4 mM 陽性対照溶液				50 μ L		
4 mM 被験物質溶液					50 μ L	50 μ L

RC : 参照コントロール、CC : 共溶出コントロール

*1 以降、被験物質とNAC, NALの反応液を「被験物質」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

各コントロールの定義

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。
- 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

 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

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

AN : アセトニトリル

反応液調製後～インキュベート

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。

試験の流れ

事前作業

緩衝液の調製、HPLC溶離液の調製、被験物質の溶媒チェック

反応（1日目）

1. 4 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℃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、標準液希釈系列の調製

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。遠心で析出が沈殿しない場合はフィルター処理 [Merck Millipore; Cat#MSRLN0410等] によって析出を除くこともできる (ガイドラインに記載はないがSOPに記載有)。

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測定

HPLC条件

カラム温度	40℃
サンプル温度	25℃ 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℃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） 蛍光検出器
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 mmφ以下**、カラムから検出器までの距離**50 cm以下**にする。
- ・蛍光検出器は必須ではないが、UV検出で共溶出がみられた場合必要。UV検出器と直列でつないで測定することで、一度にUVと蛍光の両方のデータを採取することができる。

HPLC測定

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。

HPLC測定

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。

試験の流れ

事前作業

緩衝液の調製、HPLC溶離液の調製、被験物質の溶媒チェック

反応（1日目）

1. 4 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℃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

試験結果の判定

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。

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

ポイント

UV検出と蛍光検出を同時に行った場合、UV検出において特に共溶出が見られない場合はUV検出のピーク面積をDepletion算出に用い、共溶出が見られた場合は蛍光検出のピーク面積をDepletion算出に用いる。

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

試験結果の判定

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 $\leq 11.0\%$

試験成立条件

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 = $3.2 \sim 4.4 \mu\text{M}$

試験成立条件

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
(PhenylacetaldehydeおよびSquaric acid diethyl esterのどちらも同じ範囲)

NAC Depletion (%)		NAL Depletion (%)	
下限値	上限値	下限値	上限値
30	80	70	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。