国立研究開発法人 産業技術総合研究所

計量標準総合センター 標準物質認証書

認証標準物質

NMIJ CRM 6210-a
No. +++

アミロイドβ

Amyloid β

見本

本標準物質は、ISO 17034 及び ISO/IEC 17025 の要求事項に適合したマネジメントシステムに基づいて生産された、ヒトアミロイドβ(1-42)と同一の配列をもつ合成ペプチドの凍結乾燥品である（以後、アミロイドβ(1-42)はアミロイドβと規定する）。アミロイドβの各種定量分析における分析機器の校正、精度管理及び分析試薬の値付けに用いることができるほか、アミノ酸分析における分析方法や分析装置の妥当性の確認に用いることができる。

【認証値】

本標準物質は合成ペプチドの凍結乾燥品であり、【使用に関する注意事項】に従って調製することで、アミロイドβ類（アミロイドβ及びアミロイドβの酸化体、脱アミド体、異性体の混合物）を含む 0.1 %アンモニア水溶液が得られる。この溶液に含まれるアミロイドβあるいはアミロイドβ類の 20 ℃における各濃度は下記の認証値のとおりである。認証値の不確かさは、合成標準不確かさと包含係数 $k = 2.45$ から決定された拡張不確かさであり、約 95 %の信頼の水準をもつと推定される区間の半分の幅を表す。

物質名	CAS番号	認証値 質量濃度（mg/L）	拡張不確かさ 質量濃度（mg/L）
アミロイドβ	107761-42-2	42.6	7.0

物質名	認証値 質量濃度（mg/L）	拡張不確かさ 質量濃度（mg/L）
アミロイドβ類 （アミロイドβ、及びアミロイドβの酸化体、脱アミド体、異性体の混合物）	46	11

【認証値の決定方法】

本標準物質の認証値は、同位体希釈質量分析法を用いたアミノ酸分析と高速液体クロマトグラフィーにより得られた測定値に対し、振動式密度計を用いて測定した密度とモル質量による換算を行い、質量濃度として決定した。不純物ペプチドについては高分解能質量分析により同定を行った。

アミノ酸分析は、試料溶液に安定同位体標識アミノ酸を添加したのち、下記の 2 つの方法により行った。

1）マイクロ波加熱液相加水分解とプレカラム誘導体化法による逆相クロマトグラフィー/質量分析法：

マイクロ波加熱により 165 ℃で 3 時間塩酸による液相加水分解を行ったのち、*N*-ブチルニコチン酸スクシンイミドエステルをプレカラム誘導体化試薬として用い、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、バリンを定量した。

2）気相加水分解と親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法：

気相による 150 ℃で 24 時間塩酸加水分解を行ったのち、誘導体化を行うことなく、グルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、バリンを定量した。

アミロイドβ 1 分子に含まれる各アミノ酸の個数をもとにペプチド濃度を求め、2 種類のアミノ酸分析による結果の重み付き平均値をアミノ酸分析による定量結果とした。この濃度がアミロイドβ類の濃度（アミロイドβ、

アミロイドβの酸化体、脱アミド体及び異性体の濃度の和）である。
アミロイドβの濃度は、アミロイドβ類の濃度に、高速液体クロマトグラフィーにより求めたアミロイドβ類に対するアミロイドβの比率を掛けることにより決定した。

【計量計測トレーサビリティ】
本標準物質の認証値は、L-アラニン認証標準物質(NMIJ CRM 6011-a)、L-アスパラギン酸認証標準物質(NMIJ CRM 6027-a)、L-グルタミン酸認証標準物質(NMIJ CRM 6026-a)、L-イソロイシン認証標準物質(NMIJ CRM 6013-a)、L-ロイシン認証標準物質(NMIJ CRM 6012-a)、L-フェニルアラニン認証標準物質(NMIJ CRM 6014-a)、L-バリン認証標準物質(NMIJ CRM 6015-a)を基準とした一次標準測定法である同位体希釈質量分析法によるアミノ酸分析法、及び JCSS 密度標準液を用いて校正した振動式密度計により求めた。したがって、本標準物質の認証値は国際単位系（SI）にトレーサブルである。

【参考値】
本標準物質の参考値は、20 ℃におけるアミロイドβ及びアミロイドβ類の物質量濃度であり、認証値にモル質量を加味して決定した。参考値の不確かさは、合成標準不確かさと包含係数 $k = 2.45$ から決定された拡張不確かさであり、約 95 %の信頼の水準をもつと推定される区画の半分の幅を表す。

物質名	CAS 番号	参考値 物質量濃度 (μmol/L)	拡張不確かさ 物質量濃度 (μmol/L)
アミロイドβ	107761-42-2	9.5	1.6

物質名	参考値 物質量濃度 (μmol/L)	拡張不確かさ 物質量濃度 (μmol/L)
アミロイドβ類 （アミロイドβ、及びアミロイドβの酸化体、脱アミド体、異性体の混合物）	10.2	2.3

【有効期間】
本標準物質が未開封で下記の【保存に関する注意事項】の条件で保存された場合、本認証書は出荷日から 6 ヶ月間有効である。

【物質に関する情報】
本標準物質は、ヒトアミロイドβ(1-42)と同一の配列をもつ合成ペプチドの凍結乾燥した白色の粉末で、10 mL のガラスバイアルに約 50 μg ずつ小分けされ、アルミニウムラミネート袋に封入されている。

【保存に関する注意事項】
本標準物質は、遮光し、–80 ℃程度で清浄な場所に保存すること。

【使用に関する注意事項】
1) アミノ酸分析や免疫学的測定法など、アミロイドβとその分子変換体を区別できない分析を使用する場合は、アミロイドβ類としての認証値を使用する。
2) アミロイドβは凝集性があるため、溶解後は 4 ℃以下に保存し 16 時間以内に使用すること。
3) アミロイドβは実験器具類に吸着しやすい性質があるため、低吸着性の器具の使用を推奨する。
4) 以下の指示に従い、溶液を調製すること。

注意：凍結乾燥物が飛散する恐れがあるので、0.1 %アンモニア水に溶解する前にセプタムキャップを外さないこと。

1. アルミニウムラミネート袋に封入されたバイアルを冷凍庫より取り出し、そのまま室温で 30 分以上放置して室温に戻す。

2. アルミニウムラミネート袋よりバイアルを取り出し、バイアル内の白色の凍結乾燥物を確認する。底部からはがれて管壁やセプタムキャップに付着している場合は、バイアルを垂直に立てて軽くたたき、凍結乾燥物を底に落とす。
3. ゴム製のセプタムキャップを外さないように注意して、アルミキャップを開ける。
4. 読み取りの最小桁が 0.1 mg 以下の天秤を用いてバイアルを秤量する。
5. シリンジを用いて、セプタムを通して 0.1 %アンモニア水を 1.00 g 注入する*, **。0.1 %アンモニア水を加えたバイアルの秤量値と上記 4 での秤量値との差が 0.99 g～1.01 g であること。
6. 1 分間超音波処理することによって完全に溶解させる。

*許容誤差±1 %以内のマイクロシリンジの使用を推奨する。あらかじめ、精製水または 0.1 %アンモニア水を用いてシリンジに表示されている目盛と天秤でのはかりとり量を確認しておくとよい。また、溶解液である 0.1 %アンモニア水の注入は、数回に分けて秤量値を確認しながら行ってもよい。

**0.1 %アンモニア水は 1 mol/L アンモニア水（約 1.7 g/dL 相当）を、天秤を用いて精製水で約 17 倍希釈することによって調製する。希釈液は全量 2 mL 以上となるように調製することを推奨する。アンモニア水の濃度範囲は 0.095 g/dL ～ 0.105 g/dL であること。本標準物質の認証時には、ナカライテスク株式会社より販売されている容量分析用 1 mol/L アンモニア水を使用した。

【取り扱いにおける注意事項】

本標準物質は試験研究用であり、生体には使用しないこと。安全データシート（SDS）を参考にして取り扱うこと。

【製造等】

本標準物質は株式会社ペプチド研究所で合成、精製されたアミロイドβを 0.1 %アンモニア水に溶解後小分けし、凍結乾燥後、窒素雰囲気下セプタムで封止したものである。

【参考情報】

1) 本標準物質を【使用に関する注意事項】に従って調製した溶液の 20 °Cにおける密度は 0.9979 g/cm^3 である。
2) 本標準物質はトリフルオロ酢酸塩を含む。【使用に関する注意事項】に従って調製した溶液のトリフルオロ酢酸イオンの濃度は(6.5 ± 0.2) mg/L (± 以下の数値は測定の標準偏差を示す)である。
3) アミロイドβのアミノ酸配列は以下の通りである。
   DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
   アミロイドβの分子量は 4514.37 であり、高分解能の質量分析で得られるモノアイソトピック質量に相当する値は、4511.2696 である。

【生産担当者】

本標準物質の生産に関する技術管理者は加藤愛、生産責任者は七種和美、値付け担当者は七種和美、絹見朋也、水野亮子、惠山栄である。

【情報の入手】

本標準物質に関して認証値の変更等、重要な改訂があった場合、下記ホームページから「標準物質ユーザー登録」を行った購入者に通知する。なお、本標準物質に関する技術情報は、下記連絡先より入手できる。

【認証書の複製について】

本認証書を複製する場合は、複製であることが明瞭にわかるようにしなければならない。

2023 年 2 月 24 日

国立研究開発法人　産業技術総合研究所
理事長　石村 和彦

見本

本標準物質に関する質問等は以下にお問い合わせをお願いします。

国立研究開発法人　産業技術総合研究所　計量標準総合センター
計量標準普及センター　標準物質認証管理室
〒305-8563 茨城県つくば市梅園 1-1-1
電話：029-861-4059、ホームページ：https://unit.aist.go.jp/qualmanmet/refmate/

見本