



***Quantitative Analysis
by Ligand Binding Assay
(Method Development)
DG2015-19***

 **JBF** *Summary*

The ligand binding assay (LBA) is commonly used for quantitative measurement of biotechnology-based drugs including antibody drugs. The best of the various LBA platforms needs to be selected in the method development. Furthermore, the method needs to be highly sensitive, efficient, and reliable. Method developers also select a calibration standard for the biomarker analysis, measure the drug concentration in tissue, and train staff members through trial and error.

This DG mainly focused on development of a method including experimental procedures for three LBA platforms (MSD, Gyrolab, and ELISA), selection of a calibration standard for biomarker analysis, measurement of drug concentration in tissue, training of staff members, and verification of the equivalence of data from different staff members. The approaches and related issues were discussed.

This presentation provides the overview of our discussion to facilitate an efficient analysis by LBA.



1. MSDにおける分析法構築

- 1.1 MSDの選択基準
- 1.2 MSDの分析法の高感度化, 最適化



1.1 MSDの選択基準 目次

- **背景**
 - 近年, 様々なLBAプラットフォームが登場してきており, 分析法の高感度化, ハイスループット化が達成されてきている.
- **議論した内容**
 - どんなときにMSDを使用するか, また, LBAの定量で, MSD, Gyrolab, ELISA, その他の比率をDG内で調べた.



1.1 MSDの選択基準

どんなときに使用するか？ プラットフォームの比率は？

- 測定レンジを広くしたいとき (TK/PK)
- 高感度が必要なとき (Biomarker)
- サンプル量を少なくしたいとき

	MSD	Gyrolab	ELISA	その他
Aさん	50	0	50	0
Bさん	30	0	70	0
Cさん	50	40	5	5 (RIA)
Dさん	80	20	0	0
Eさん	55	40	5	0
Fさん	65	30	0	5

(%)

1.2 MSD（高感度化，最適化） 目次

● 背景

- 分析法を高感度化，最適化する際には様々な検討項目が存在すると考えられる.
- MSDではどのような条件検討を行い，分析法を高感度化，最適化していくかDG内で議論した.

● 議論した内容

- 固相抗体・検出抗体の希釈緩衝液，種類，濃度，添加容量，反応温度・時間等について
- サンプル（検量線，QCサンプル，実試料）の希釈緩衝液，種類，検量線の濃度点数，添加容量，反応温度・時間等について
- Read bufferの濃度等，重要試薬の組み合わせ，MSDプレートを選択について
- マトリックスの影響，バリデーション前に確認しておきたい事項について



1.2 MSD (高感度化, 最適化)

固相抗体

- 固相抗体

議論した内容	DG内での意見
希釈に用いる緩衝液の種類	1~2種類(PBS又はTBS, 炭酸Na緩衝液)
検討する固相抗体の種類	1~3種類(保有する全ての場合もあり)
検討する固相抗体の濃度	1~4点(うまくいかなければさらに追加)
添加容量	25 μ L, 50 μ L, 100 μ L
固相化の温度, 時間, 振とう	冷蔵で終夜, 室温で1~2時間(状況で使い分け)
固相化後の洗浄	PBS-T, TBS-T (200~350 μ L) \times 3回
洗浄後の除液	ペーパータオルにたたきつけ, ECO-spinで遠心除去

<http://bioanalysisforum.jp/>



1.2 MSD (高感度化, 最適化)

サンプル (検量線, QCサンプル, 実試料)

- サンプル (検量線, QCサンプル, 実試料)

議論した内容	DG内での意見
希釈に用いる緩衝液の種類	1~6種類 (基本的に1種類の意見もあり)
検討する検量線の濃度	7~11点 (検討初期, 後期で点数を変える場合あり)
再現性QCサンプルの濃度	3~5点 (10点の意見もあり)
添加容量	25 μ L, 50 μ L, 100 μ L
固相化の温度, 時間, 振とう	冷蔵で終夜, 室温で1~2時間 (感度を上げたい場合は時間延長を検討)
固相化後の洗浄	PBS-T, TBS-T (200~350 μ L) \times 3回
洗浄後の除液	ペーパータオルにたたきつけ, ECO-spinで遠心除去



1.2 MSD (高感度化, 最適化)

検出抗体①

● 検出抗体

議論した内容	DG内での意見
希釈に用いる緩衝液の種類	1~2種類(サンプル希釈に用いるものと同じが多い)
検討する検出抗体の種類	1~3種類(保有する全ての場合もあり)
検出に用いるSULFO-TAG標識体の比率は?	次ページ参照
ビオチン標識, SULFO-TAG標識抗体の安定性, 標識率	安定性: 確認しないことが多い(反応性で確認) 標識率: 確認しないことが多い
検討する検出抗体の濃度	1~4点(うまくいかなければさらに追加)
添加容量	25 μ L, 50 μ L, 100 μ L
反応の温度, 時間, 振とう	室温で1~2時間(感度を上げたい場合は時間延長を検討)
反応後の洗浄	PBS-T, TBS-T (200~350 μ L) \times 3回
洗浄後の除液	ペーパータオルにたたきつけ, ECO-spinで遠心除去

<http://bioanalysisforum.jp/>



1.2 MSD (高感度化, 最適化)

検出抗体②, Read buffer

- 検出抗体に用いるSULFO-TAG標識体の比率は？

	非標識抗体+ SULFO-TAG標識抗体	ビオチン標識抗体+ SULFO-TAG標識ストレプトアビジン	SULFO-TAG 標識抗体
Aさん	10	40	50
Bさん	45	40	15
Cさん	0	50	50
Dさん	0	0	100
Eさん	0	60	40
Fさん	0	100	0

(%)

<http://bioanalysisforum.jp/>

- Read buffer

議論した内容	DG内での意見
検討する濃度, 添加容量	1x, 2x(どちらかしか用いない場合もある), 150 μ L
添加後の振とう	ゆるく攪拌する場合もある



1.2 MSD (高感度化, 最適化)

重要試薬の組み合わせ, MSDのプレート

- 重要試薬の組み合わせは(抗体医薬の場合)?

	ターゲット+ 抗体医薬+ 抗ヒト抗体	ターゲット+ 抗体医薬+ 抗idiotype抗体	抗idiotype抗体+ 抗体医薬+ 抗ヒト抗体	抗idiotype抗体+ 抗体医薬+ 抗idiotype抗体
Aさん	25	0	50	25
Bさん	40	0	40	20
Cさん	35	0	0	65
Dさん	10	0	0	90
Eさん*	55	0	5	5
Fさん	50	0	0	50

*その他の組み合わせ:35% (%)

- MSDのプレート

議論した内容	DG内での意見
Plate typeの選択	Standardが第一選択. 感度を上げたいときはHi-bindを検討.

<http://bioanalysisforum.jp/>



1.2 MSD (高感度化, 最適化)

マトリックスの影響, バリデーション前に確認しておきたい事項

• マトリックスの影響

議論した内容	DG内での意見
バックグラウンドを下げるための工夫	感度が許す限りサンプルの希釈倍率を上げる. 緩衝液の種類を検討する. 固相抗体や検出抗体を検討する. Plate typeを変更する.
選択性を基準内に収めるための工夫	上記に加えて, Heterophilic antibodyの存在が疑われる場合は, これを抑える抗体を添加する.

• バリデーション前に確認しておきたい事項

議論した内容	DG内での意見
再現性	2回程度
選択性	6~10個体
その他	希釈直線性, 凍結融解1~2回, ECLシグナルのイメージを確認

2. Gyrolabにおける分析法構築

- 2.1 Gyrolabの選択基準
- 2.2 Gyrolabの分析法の高感度化, 最適化



2.1 Gyrolabの選択基準 目次

- **背景**
 - 最近, Gyrolabを用いた分析が増えてきている.
- **議論した内容**
 - Gyrolabの使用経験等について, また, どんなときに Gyrolabを使用するかDG内で調べた.



2.1 Gyrolabの選択基準 使用経験について

- DG内6社中5社が保有. 使用頻度に差はあるが稼働中.
- 保有していないところもデモ等の経験があるなど, 興味あり.



2.1 Gyrolabの選択基準

どんなときに使用するか？

- 感度があまり必要ないとき.
- 検体数が多いとき.
- 本測定を外部委託したいとき.
- あまり希釈せず測定したいとき (PD) .
- 第一選択.
- 固相抗体-検出抗体の組み合わせ検討 (種類が多いとき).
- 検体量 (volume) が少ないとき (非臨床).
- 委託者からの依頼に応じて.

2.2 Gyrolab (高感度化, 最適化) 目次

● 背景

- 十分な実績のあるMSD, ELISAに比べGyrolabは新規な分析法であり, 未知な部分も多い. 高感度化, 最適化に際しては特有の検討項目や課題があると考えられる.
- Gyrolabではどのような条件検討を行い, 分析法を高感度化, 最適化していくかDG内で議論した.

● 議論した内容

- 固相抗体・検出抗体の希釈緩衝液, 種類, 濃度等について
- サンプル(検量線, QCサンプル, 実試料)の希釈, 緩衝液, 種類, 検量線の濃度点数, アンカーポイント, 再現性QC, ばらつき対策等について
- 重要試薬の標識法及び安定性, 添加剤の種類と濃度, Discの選択等について
- 解析ソフトウェア, PMT(%), ウィザードの選択等について
- マトリックスの影響, バリデーション前に確認しておきたい事項, メンテナンス, トラブルと対策, 各種工夫等について



2.2 Gyrolab (高感度化, 最適化)

重要試薬① 基本項目

- 固相抗体

議論した内容	DG内での意見
希釈に用いる緩衝液の種類	PBS(その他PBS-T, TBS, TBS-T等MSDで使用する緩衝液がベースのことが多い)
検討する固相抗体の種類	MSD同様(保有する全て)
検討する固相抗体の濃度	第一選択700nMが主流, 場合により70nM程度から数点検討

- 検出抗体

議論した内容	DG内での意見
希釈に用いる緩衝液の種類	Rexxip F 一択が主流
検討する検出抗体の種類	MSD同様(保有する全て)
検討する検出抗体の濃度	第一選択10nM前後が主流, 場合により200nM程度まで数点検討



2.2 Gyrolab (高感度化, 最適化)

重要試薬② 標識について

- 抗体の標識

議論した内容	DG内での意見
ビオチン標識	標識試薬: 1-数種類, 担当者または依頼者による
Alexa標識	標識試薬: Alexaが主流, 他の試薬を使う人もいる
標識率と安定性等	<p>標識率: biotinは実シグナルでの確認が主流, Alexaは標識率確認/非確認が半々程度</p> <p>安定性: 確認しない</p> <p>保存と使用: 小分け分注凍結, 一回使い切りが主流</p>



2.2 Gyrolab (高感度化, 最適化)

サンプル (検量線, QCサンプル, 実試料)

- サンプル (検量線, QCサンプル, 実試料)

議論した内容	DG内での意見
希釈に用いる緩衝液の種類	Rexxipが主流 (種類はサンプルに応じ使い分け)
n=いくつで測定するか	duplicateが主流. 初期検討のみsingleで当たりつけを実施
検討する検量線の濃度	7点以上 + blank, アンカーポイントを取る場合は9点以上 + blank, 担当者による
再現性QCサンプルの濃度	3-5点が主流
複数枚測定時の検量線・QCサンプル	過半数が検量線・QCともDisc毎に置く. その他QCのみDisc毎に置く, 最初の1枚のみ置く, が各1名
複数枚測定時のcalibration control	使わない
アンカーポイントの設置	バリデーションを取る場合は必須, それ以外は担当者による

<http://bioanalysisforum.jp/>



2.2 Gyrolab (高感度化, 最適化)

解析・ウィザードの選択

• 解析について

議論した内容	DG内での意見
付属のソフトウェア(Gyrolab Evaluator)で行っているか	付属ソフトウェアが主流, 別ソフトで解析する方もあり.
PMT(%)は何%を採用しているか? 基準は?	1%と5%がほぼ半々. ばらつき, 感度, S/N比などを考慮. LLOQ・ULOQ等のIntensityで基準を設定する場合も.

• ウィザードの選択について

議論した内容	DG内での意見
Wizardはどれを使用していますか?	Disc 200: 200-3W-001-A, または200-3W-002-A Disc 1000: 1000-3W-006-A 2washのほうがばらつきが小さくなることが多い?
Wizardをカスタマイズしたことがありますか?	そのまま使うのが主流. カスタマイズを試したが難しく良い結果が出なかったとの経験談あり



2.2 Gyrolab (高感度化, 最適化)

Disc typeの選択, マトリックスの影響

• Disc typeの選択

議論した内容	DG内での意見
どのように選択していますか？基準は？	PK/TKではBioaffy200が主流. 高感度化が必要なときにもBioaffy1000を試すことも. PD(free antigen)ではBioaffy1000という意見もあり.

• マトリックスの影響

議論した内容	DG内での意見
バックグラウンドを下げるための工夫	希釈倍率, キャプチャー・検出抗体の濃度, REXXIPの種類, wash bufferのTween濃度を再検討
選択性を基準内に収めるための工夫	上記に加えて, 測定感度を再検討する, Heterophilic antibodyの存在が疑われる場合は, これを抑える抗体を添加する.



2.2 Gyrolab (高感度化, 最適化)

高感度化, バリデーション前に確認しておきたい事項

- 高感度化

議論した内容	DG内での意見
感度を上げるためには何か工夫をしていますか？	MRDを上げる, REXXIP Maxの使用, Disc1000を使用, CaptureとDetectorを使用前に遠心, 抗体の種類を変える, REXXIP以外の添加剤やAlexa以外の試薬を検討

- バリデーション前に確認しておきたい事項

議論した内容	DG内での意見
確認したい事項	MSDと同様の日内再現性, 選択性, フック効果, 希釈直線性に加えてCarry over



2.2 Gyrolab (高感度化, 最適化) トラブルシューティング

議論した内容	DG内での意見
Method Dev時duplicateのばらつきが大きいときの最適化	Rexxipの種類, MRD, キャプチャー・検出試薬濃度やbufferを変更, wash2にpH11を試す, など
carry overの経験・発生頻度	capture, analyte, detector により様々
carry over時の最適化	Needle desorb, wash2にpH11, Rexxip変更, Wash bufferのTween濃度変更など
2 nd washの有無	pH11派が多数. 20%EtOH, 0.1%Tween-PBSの経験も
Rexxipの添加基準	Needleへの吸着防止のため検量線・サンプルともほぼすべて入れる
RexxipのLot差	経験なし
DiscのLot差	ほぼ気にしていないが, 不良品には注意する, 同一試験ではLotを揃える
シグナル異常値の経験と対応	基本は外れた点を除外して再解析. 実試料は棄却して再測定する方も. キムワイプ等を無蛍光タイプに変更.
上記外れ値判断の基準	3D viewer, 見た目, CV等. クライテリア策定検討中.



2.2 Gyrolab (高感度化, 最適化)

メンテナンス, その他

議論した内容	DG内での意見
メンテナンス	汚れやcarry overが気になるとき, 重要試験の前などにpH11でNeedle Desorbするのが主流.
日常点検	Functional check kitを使用する場合もあり.
o/n運転の有無	月～金で利用(週末はまたがない)
使いかけCDの保存	重要試験は推奨通り, 検討実験は自己責任で4°C1か月まで保存経験あり.
系の移管	スムーズに移管できた. 微調整が必要な程度.
ADAのDiscの使用経験	cut off値のばらつきで苦勞など, おおむね不評.
濃度測定以外の使い方	1名のみKD測定経験あり.
故障やエラーの経験	故障の内容は, アーム異常, コンプレッサー異常, シリンジ摩耗, ニードルアーム不具合など.
マトリクス効果はMSDと比較してどうか	概ね差を感じない. 1名のみGyrolabが良好と感じる.
系の頑健性	概ね問題ないが, 並行して実施中の他の試験系が影響する場合もある.

3. *ELISA*における分析法構築

- 3.1 ELISAの選択基準
- 3.2 ELISAの分析法の高感度化, 最適化



3.1 ELISAの選択基準 目次

- **背景**
 - MSDやGyrolabをはじめとする様々なLBAプラットフォームが登場しているが、従来から存在するELISAにおいても、現在も様々な場面で選択されている。
- **議論した内容**
 - どんなときにELISAを使用するかをDG内で調べた。



3.1 ELISAの選択基準

どんなときに使用するか？

- 広い測定レンジがあまり必要ないとき
- 感度があまり必要ないとき
- 試薬のラベル化が難しいとき
- ペプチドなどの低分子で、競合法でしか測定できないとき
- 既にELISAの測定法があるとき
- ECLを所有していない施設に外部委託するとき

3.2 ELISA（最適化） 目次

- 背景

- 従来より使用されてきたELISAは、各社のノウハウやコツが多く蓄積されている。今までの経験をもとに、DG内で測定法の最適化について議論した。

- 議論した内容

- Plate・ELISA kit, 検出抗体・基質の組み合わせや検出方法について
- 吸着性物質, 分解され易い物質, エッジ効果, コンタミの対応策について
- 検量線範囲を最適化するための工夫について
- トラブルシューティング, その他, 気になる点について



3.2 ELISA (最適化)

Plate, ELISA kit

- Plate

議論した内容	DG内での意見
検討する種類	1種類(うまくいかなければさらに追加する場合も)
特殊なPlateの使用経験	アミンやカルボン酸が結合したPlate(感度が低い時) ハーフエリアPlate(サンプル量が少ない時)

- ELISA kit

議論した内容	DG内での意見
高濃度の標準品が付属していない場合の高濃度QCの調製について	ELISA kitに付属している標準品をマトリクスで直接溶解させて高濃度QCを調製した。 調製可能な濃度の試料で希釈直線性を確認し、後日高濃度内因性を含む試料を確認された希釈倍率で希釈後に更に確認すべき希釈倍率を検討した。



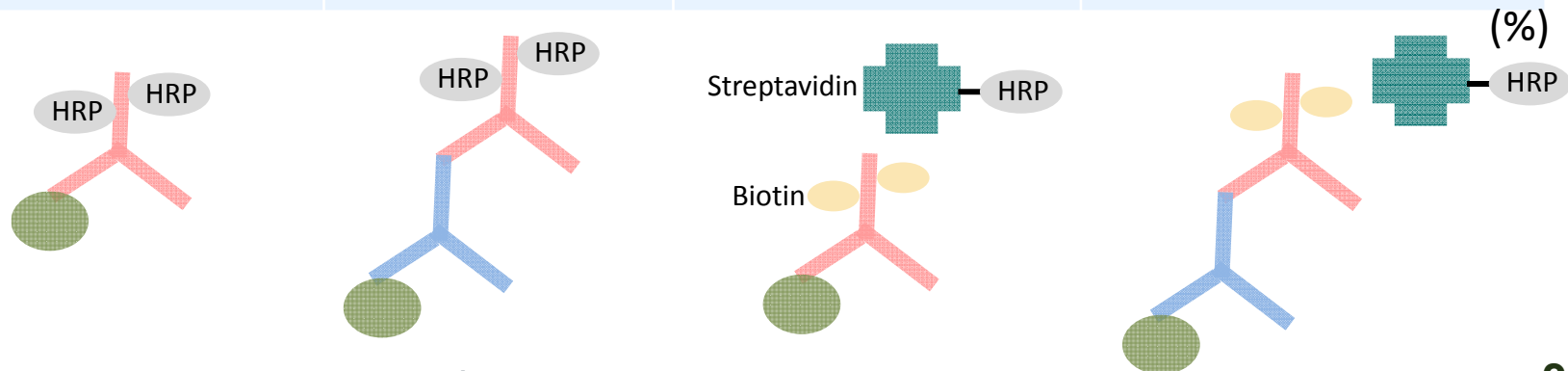
3.2 ELISA (最適化)

検出抗体

- 使用する検出抗体の比率は？

	蛍光色素や酵素が標識された抗体のみ	1次抗体 + 蛍光色素や酵素が標識された2次抗体	ビオチン標識抗体 + 酵素標識ストレプトアビジン	1次抗体 + ビオチン標識2次抗体 + 酵素標識ストレプトアビジン
Aさん	60	20	20	0
Bさん	40	20	40	0
Cさん	25	25	25	25
Dさん	50	0	50	0
Eさん	90	0	10	0
Fさん	比率は不明	0	比率は不明	0

<http://bioanalysisforum.jp/>





3.2 ELISA (最適化)

検出方法 (基質)

- 検出 (基質) の比率は？

	吸光	蛍光	発光
Aさん	100 (TMB, OPD)	0	0
Bさん	95 (TMB, OPD, ABTS)	5 (AP-BBT)	0
Cさん	90 (TMB, OPD, ABTS, ALP, β -galactosidase)	10 (不明)	10 (不明)
Dさん	80 (TMB, OPD)	20 (β -galactosidase-4- Methylumbelliferyl- β - D-galactopyranoside)	0
Eさん	100 (TMB)	0	0
Fさん	100 (TMB)	0	0

(%)



3.2 ELISA (最適化) サンプルの取り扱いや検量線範囲

議論した内容	DG内での意見
吸着物質の取扱い	低吸着チューブやチップの使用. 界面活性剤の種類や濃度, Wash bufferの検討. ボルテックス操作を一定にする.
分解され易い物質の取扱い	阻害剤の添加, 氷冷下でのサンプル調製.
前処理抽出の経験	低分子化合物測定時の固相抽出や液-液抽出, マトリクス中内因性物質の除去の際に経験あり.
感度を上げるための工夫	ECLや全自動ELISAへ変更. 抗体濃度, ブロッキング溶液や希釈液, インキュベート条件の検討. 検出方法の変更. シグナル増強剤の使用.
測定レンジを広げるための工夫	ECLや全自動ELISAへ変更. 抗体, 検出方法の変更.
フック効果を改善するための工夫	抗体濃度・種類, 抗原濃度, 2 step法へ変更.



3.2 ELISA (最適化) トラブルシューティング, その他

議論した内容	DG内での意見
コンタミの防止策	ピペット類の動線, サンプルの添加順序やレイアウトに注意を払う.
エッジ効果の防止策	検量線をプレートの中央, QC試料を両端に設置. エアコンの風が当たらない場所での操作. プレートを液層(温浴)でインキュベートし, 温度を一定に保つ. 湿度が保たれるような工夫をし, 密閉容器内でインキュベート
一度に何Plate測定できるか?	3 plate. 検討時は6 plateの場合もあり. 複数枚測定する時は, plateが乾燥しないように複数人で流れ作業する場合も.

<http://bioanalysisforum.jp/>



4. バイオマーカー標品の選択

- 4.1 バイオマーカー/抗原測定一般
- 4.2 標品について(実験手法)





4.1 バイオマーカー／抗原測定一般 目次

- **背景**
 - 最近, バイオマーカー／抗原測定が増えてきている.
- **議論した内容**
 - どのプラットフォームを用いて分析するか, DG内で議論した.



4.1 バイオマーカー/抗原測定一般

- DG内では基本的にはECL (MSD) を使用することが多かった. キットの場合はELISAが主流. 一部, immunoPCR, Gyrolab, Luminex, RIAを使用するメンバーもいた.



4.2 標品について（実験手法）目次

- 背景
 - 標品, キットの選択基準, また妥当性に関してDG内で議論した.
- 議論した内容
 - 検討する標品, 市販キット
 - 実験方法
 - 標品の妥当性
 - 値の妥当性
 - その他



4.2 標品について（実験手法）

検討する標品, 市販キット

議論した内容	DG内での意見
標品は何種類試しますか？	市販品は2種類以上検討. 自社で調製, 外注することもある. 市販キットを主に使用するメンバーも多かった.
標品選択で気をつけていることは？	単一組成であること. 信頼できるメーカーから購入.
市販キットは何種類試しますか？	実績のあるメーカーなら1種類. 実績のないメーカーの場合数種類検討. キットは購入せず, 自作するメンバーもいた.
市販キット選択で気をつけていること	メーカーの信頼度, 感度, 標準品を単体で売っていること, 文献報告の有無を確認.



4.2 標品について（実験手法） 実験方法

議論した内容	DG内での意見
検量線のマトリクスは何を使いますか？	1%BSA/PBS, 1%Casein/PBSなどのBufferがメイン. 一部のメンバーは内因性物質除去マトリクスを使用.
内因性物質を除去したマトリクス、代替マトリクスで問題となったケースはありますか？	大きな問題となったケースはDG内ではなかった.
市販キットを使用して問題となったことはありますか？	市販キット使用者は全員経験あり.
市販キットでの問題はどのようなものですか？	バラツキが大きい, QC基準が入らない, MRDが記載通りではない, 再現性, 回収率が悪い.

<http://bioanalysisforum.jp/>



4.2 標品について（実験手法） 標品の妥当性

議論した内容	DG内での意見
内因性物質と標品が同等であることを示すために何を検討しますか？	MRD, 希釈再現性, 希釈直線性, 希釈並行性, 回収率
多量体測定の実験がある場合, 標品はどう選択しましたか？	市販品があれば購入. ない場合は調製.
多量体の安定性をどう評価しますか？	凍結融解の影響を確認. 患者サンプル等で確認する場合もある.
安定性が著しく悪い標品の場合, どう対処しましたか？	氷冷でサンプル調製, 安定化できる条件を探す, 溶解後分注凍結し使いきりにする.
凍結融解, 保存安定性に著しく問題があった場合, バイオマーカ一候補から外れますか？	使用用途にもよるが, 1回の凍結融解が担保できない場合, 一定の冷蔵保存が困難の場合, 候補から外れる可能性が高い. 採材時のartifactで測定値が変動する場合も同様.



4.2 標品について（実験手法）

値の妥当性, その他

- 値の妥当性

議論した内容	DG内での意見
自ら測定した値と文献値が異なるときの対応は？	使用する抗体が異なる場合は特に検証しない
複数の方法で定量し, 値が異なったときの対応は？	使用する抗体が異なる場合は特に検証しない. 一部メンバーはSDS-PAGE等で分子量を確認.
LBA以外で値の確認をすることはあるか	LBAのみが大半. 一部メンバーはLC/MSやHPLCで検討.

- その他

議論した内容	DG内での意見
大腸菌からのリコンビナントタンパク, 細胞からのリコンビナントタンパクのどちらを優先して使用しますか？	カルタヘナ法を考えると大腸菌からのリコンビナントタンパクを使用したいが, 実際は由来は気にしない. 生物活性があれば大腸菌でも問題ないという意見もあった.

5. LBAによる組織中濃度

- 5.1 実施経験と前処理について
- 5.2 測定値に対する所感

5.1 実施経験と前処理について 目次

- **背景**
 - LBAを用いた組織中濃度測定はノウハウが必要と考えられ、経験と前処理法についてDG内で議論した。
- **議論した内容**
 - LBAを用いた組織中濃度測定の経験
 - 測定機器
 - 測定対象組織
 - バリデーション経験の有無
 - 検量線マトリックス
 - 抗原に結合しているものに対する対応
 - 安定性の確認
 - 灌流について
 - 前処理法
 - 血液のコンタミネーションについて



5.1 実施経験と前処理について

経験, 対象組織, 測定法, バリデーションについて

議論した内容	DG内での意見
組織中濃度測定の実験の有無	全員 有り
対象組織	各種臓器, xenograftの腫瘍, 網膜, 硝子体, 結膜, 骨格筋, 脳,
測定法	ELISA, ECL, RI
バリデーション経験の有無	3/6 が有り と回答.
血漿のバリデーションと異なる部分について	<ul style="list-style-type: none"> ・多種臓器でバリデーションを取る場合, 一種類の臓器でのみ再現性/安定性等を確認しその他の臓器は同じ検量線で選択性のみ確認. ・多種臓器でバリデーションを取る場合, 検量線の雰囲気似ている臓器で分けてそれぞれでバリデーションをした. ・組織中の安定性は測定不可であるため, ホモジネート溶液中のみ安定性試験を実施.



5.1 実施経験と前処理について

マトリックス, 抽出率, その他について

議論した内容	DG内での意見
検量線マトリックス	<ul style="list-style-type: none"> ・各種臓器測定の場合、肝臓など特定の臓器のみを使用. ・代替マトリックスを使用する場合もあり.
抽出率の確認	<ul style="list-style-type: none"> ・確認していない. ・ホモジネート前に添加し, 組織によって差があるのかどうかは確認.
抗原と結合している薬物について	<ul style="list-style-type: none"> ・抗原に結合しているものは検出できていないとしている. ・ホモジネート調製の際に抗原-抗体が解離していない保証がないと考える.
安定性	<ul style="list-style-type: none"> ・確認していないという意見多数. ・組織採材直後とすぐ凍結したもので結果が変わらないことを確認したという例もあり.
灌流の有無, 血液のコンタミネーションについて	<ul style="list-style-type: none"> ・脱血、PBS洗浄が多. 実験者にもよる. (3人/6人中) ・灌流有り無しであまり結果に変化がなかったという意見あり. ・逆に、灌流をしないと意味がないため基本は必須という意見もあり.



5.1 実施経験と前処理について 前処理条件

- 基本的にホモジネートまたはその遠心上清を使用。

ホモジネート条件について	詳細(理由)
ホモジネート作製方法	<ul style="list-style-type: none"> ・ビーズ式ホモジナイザー. ・ポリトロンホモジナイザー.
ホモジネート時の温度	<ul style="list-style-type: none"> ・氷冷下でホモジネート. ・ビーズを冷凍庫に入れている. ・冷凍切片をそのままホモジネートする場合もある. ・液体窒素で組織を冷凍後、液体窒素で冷やした乳鉢で細かくすり潰す. <p>(常温との比較をしたことはないが低温の方が安定と考えたためという意見が多数.)</p>
ホモジネートのbuffer	<ul style="list-style-type: none"> ・プロテアーゼインヒビター入りのbuffer. <p>(インヒビターがないと全く回収されなかったという意見もあり.)</p>

<http://bioanalysisforum.jp/>

5.2 測定値に対する所感 目次

- **背景**
 - LBAを用いた組織中濃度測定に対する所感について、DG内で共有した。
- **議論した内容**
 - 絶対値として正確に測れていると考えているか。

5.2 測定値に対する所感 絶対値の信頼性

- 絶対値として正確に測定できているかは疑わしいという意見が多数.
- 一方で, 絶対値の正確さについては測定法をQCで保証するのみ, 検証はしていない.

疑わしいと考える意見

- 肝臓の複数部位で測定した場合に4~5倍濃度値が異なった経験あり.
- 血液の影響が拭えないため, 同じ処理をして臓器間/個体間での比較をする程度.
- 最低でも組織中にあるかないか位はわかると考える.

ある程度信頼性があるという意見

- QCの真度(±30%)や精度(30%以内)が基準内だったことから, ある程度絶対値に近い値が得られていたと推測している.
- 灌流をすると, 投与直後の血中濃度が高いときでも臓器中濃度は非常に低い値となるので, 灌流をすれば信頼性が上がる可能性がある.



6. *LBA*担当者の育成

- 6.1 教育
- 6.2 試験の実施



 **6.1 教育 目次**

- **背景**
 - LBA未習熟者に対する各施設の機器操作法習得, 知識習得及び技術習得の方法についてDG内で議論した.
- **議論した内容**
 - LBA未習熟者に対する機器操作法習得, 知識習得及び技術習得の方法はありますか？
 - LBAでは種々の測定法がありますが, 技術習得時には全ての分析法で確認されますか？

	機器操作習得	知識習得	技術習得
施設A	熟練者のもとでSOPに従った操作ができることを確認。施設内で習得に対する承認がある。	基礎知識及びガイドライン等をもとにした資料による座学研修を受講。施設内で習得に対する承認がある。	施設内構築のELISAを使用して検量線とQC試料による再現性で評価。施設内で習得に対する承認がある。
施設B	熟練者のもとでSOPに従った操作ができることを確認。施設内で習得に対する承認がある。	基礎知識及びガイドライン等をもとにした資料による座学研修を受講。施設内で習得に対する承認がある。	施設内構築のELISAを使用して検量線とQC試料による再現性で評価。施設内で習得に対する承認がある。
施設C	固定された方法はない。熟練者のもとでSOPに従った操作を施設内で習得に対する承認はない。	固定された方法はない。基本的に個人で知識習得をする。施設内で習得に対する承認はない。	施設内構築の系を使用して検量線とQC試料による再現性で評価。施設内で習得に対する承認はない。

<http://bioanalysisforum.jp/>

- いずれの施設でも技術習得のプラットフォームは1種類(ELISA法又はECL法)であり, プラットフォーム毎に技術習得を行う施設はなかった。

6.2 試験の実施 目次

- 背景

- 分析者間の差異に関して、バリデーション実施前後の確認及びその許容範囲についてDG内で議論した。

- 議論した内容

- バリデーション実施前に分析者間の差異を確認していますか？確認する項目は何ですか？
- バリデーション試験内で分析者間の差異を確認していますか？確認する項目は何ですか？
- 実試料測定時にはバリデーションで同等と確認された分析者のみが実試料分析に従事されますか？
- 上記で同等が確認された分析者以外が実試料分析に従事する場合、部分バリデーションを実施されていますか？また許容範囲はありますか？
- Gyrolab使用時でも分析者間の差異を確認していますか？（バリデーション時又は実試料測定時）



6.2 試験の実施 分析者間の差異

- バリデーション実施前における分析者間の差異の確認及び許容範囲

	差異の確認	許容範囲
施設A	確認する場合がある.	検量線及び再現性
施設B	確認する場合がある.	検量線及び再現性
施設C	確認する場合がある.	検量線及び再現性
施設D	確認していない.	—
施設E	確認している.	検量線及び再現性
施設F	確認していない.	—

<http://bioanalysisforum.jp/>



6.2 試験の実施 分析者間の差異

- バリデーション内における分析者間の差異の確認及び許容範囲

	差異の確認	許容範囲
施設A	確認する場合がある.	分析単位間再現性を2分析者以上で確認し, 真度と精度, トータルエラーが許容範囲内にあることを確認する.
施設B	確認する場合がある.	分析単位間再現性を2分析者以上で確認し, 真度と精度, トータルエラーが許容範囲内にあることを確認する.
施設C	確認していない.	-
施設D	確認していない.	-
施設E	確認する.	分析単位間再現性を2分析者以上で確認し, 真度と精度, トータルエラーが許容範囲内にあることを確認する.
施設F	確認していない.	-



6.2 試験の実施 分析者間の差異

- バリデーション実施者による実試料分析及び部分バリデーションの実施

	バリデーション実施者による 実試料分析	部分バリデーションの実施
施設A	バリデーション実施者で分析を行う。	部分バリデーションを実施。分析単位内再現性が許容範囲にあることを確認する。
施設B	バリデーション実施者で分析を行う。	実試料分析における検量線、精度管理QCサンプルを分析し、許容範囲内にあることを確認する。
施設C	バリデーション実施者で分析を行う。	実施しない。
施設D	該当なし。	—
施設E	バリデーション実施者で分析を行う。	部分バリデーションを実施。分析単位内再現性が許容範囲にあることを確認する。
施設F	バリデーション実施者以外でも分析する場 合がある。	—

http://bioanalysisforum.jp/



6.2 試験の実施 分析者間の差異

- Gyrolab使用時における分析者間の差異

	Gyrolab使用時における分析者間の差異と実施内容
施設A	確認する場合もある. 真度と精度, トータルエラーが許容範囲内にあることを確認する.
施設B	実施経験はないが確認することになる. 真度と精度, トータルエラーが許容範囲内にあることを確認する.
施設C	実施経験なし.
施設D	実施経験なし.
施設E	実施経験なし.
施設F	実施経験なし.

<http://bioanalysisforum.jp/>



DG2015-19 Members

- Hiroyuki Shimizu *Toray Research Center, Inc.*
- Hiromi Okamoto *Daiichi Sankyo Co. Ltd.*
- Hiroko Shigemizu *CMIC Pharma Science Co., Ltd.
and CMIC Co., Ltd.*
- Mari Masumoto *Astellas Pharma Inc.*
- Shinro Moromasa *Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.*
- Yukitaka Yoshikawa *Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.*

Acknowledgment

- Takahiro Nakamura *Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.*

Let's discuss the method development of LBA!

