



フローサイトメトリー及びLuminexを用いた 定量におけるバリデーションの考え方

Considerations for designing validation for quantitative
analysis using flow cytometry and Luminex

株式会社イナリサーチ
平澤由貴

背景

昨年のDG： 内因性物質の定量 (DG2016-27)

- これまで議論されなかった分析方法による内因性物質の定量：フローサイトメトリー、Luminex及びPCR -

昨年のDG2016-27においてLC/MSやLBA以外のプラットフォームとして、フローサイトメトリー、Luminex及びqPCRを用いた内因性物質の定量について議論した。



本発表では、昨年議論したフローサイトメトリーとLuminexについて紹介するとともに、これらを用いた定量におけるバリデーションの考え方を説明する。

DG2016-27の内容

1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

1-1 イムノフェノタイピング (Immunophenotyping)

1-2 ビースアレイ (Bead array)

1-3 占有率 (Target receptor occupancy)

2. Luminex

内因性物質の定量

(Quantitative analysis of endogenous substances)

3. qPCR

投与した核酸や細胞の測定

(Dose-determining assay of transgene or cells)



フローサイトメトリー (Flow cytometry)



FACSCantoII
(BD Biosciences)

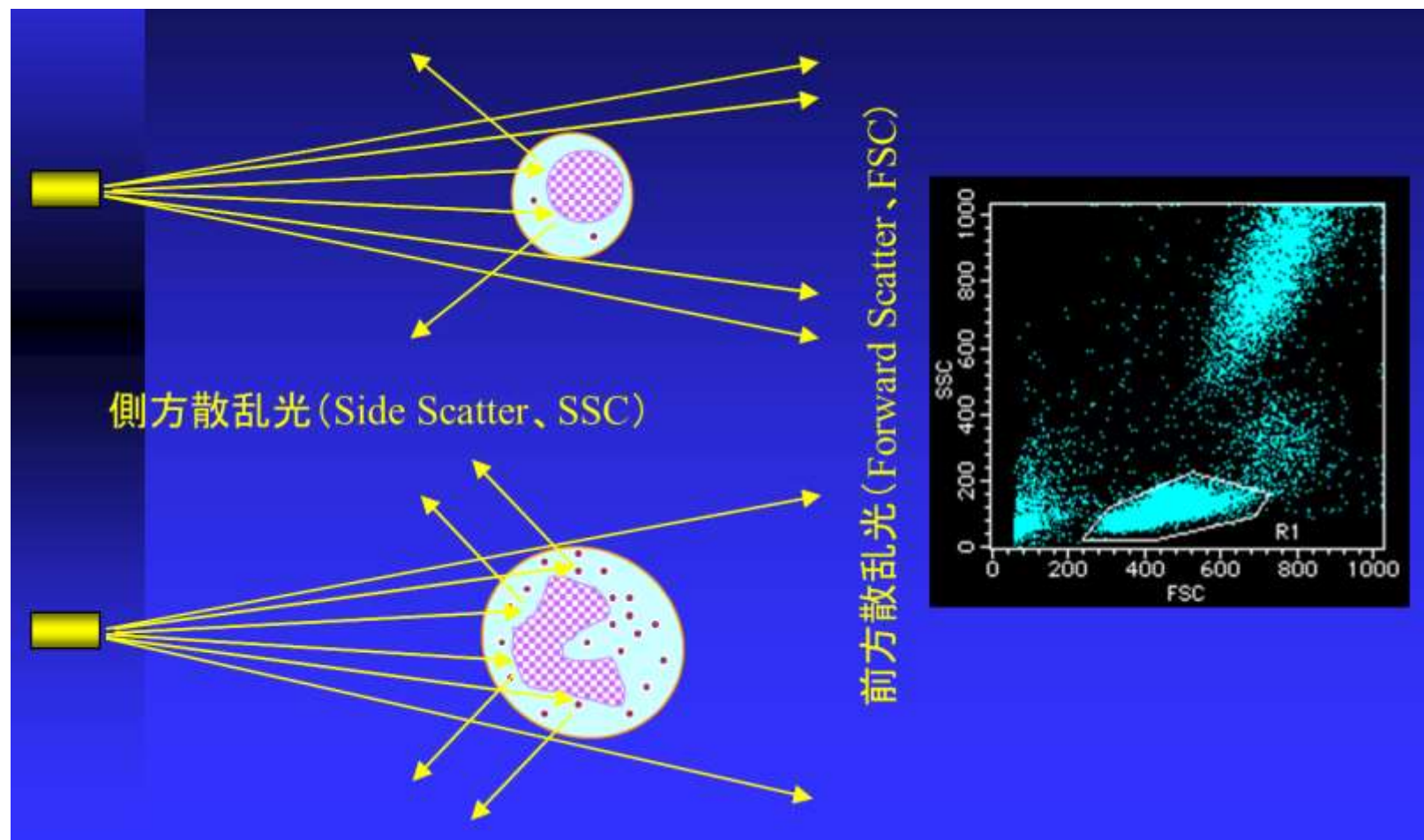


Attune NxT
(Thermo Fisher Scientific)

<http://bioanalysisforum.jp/>

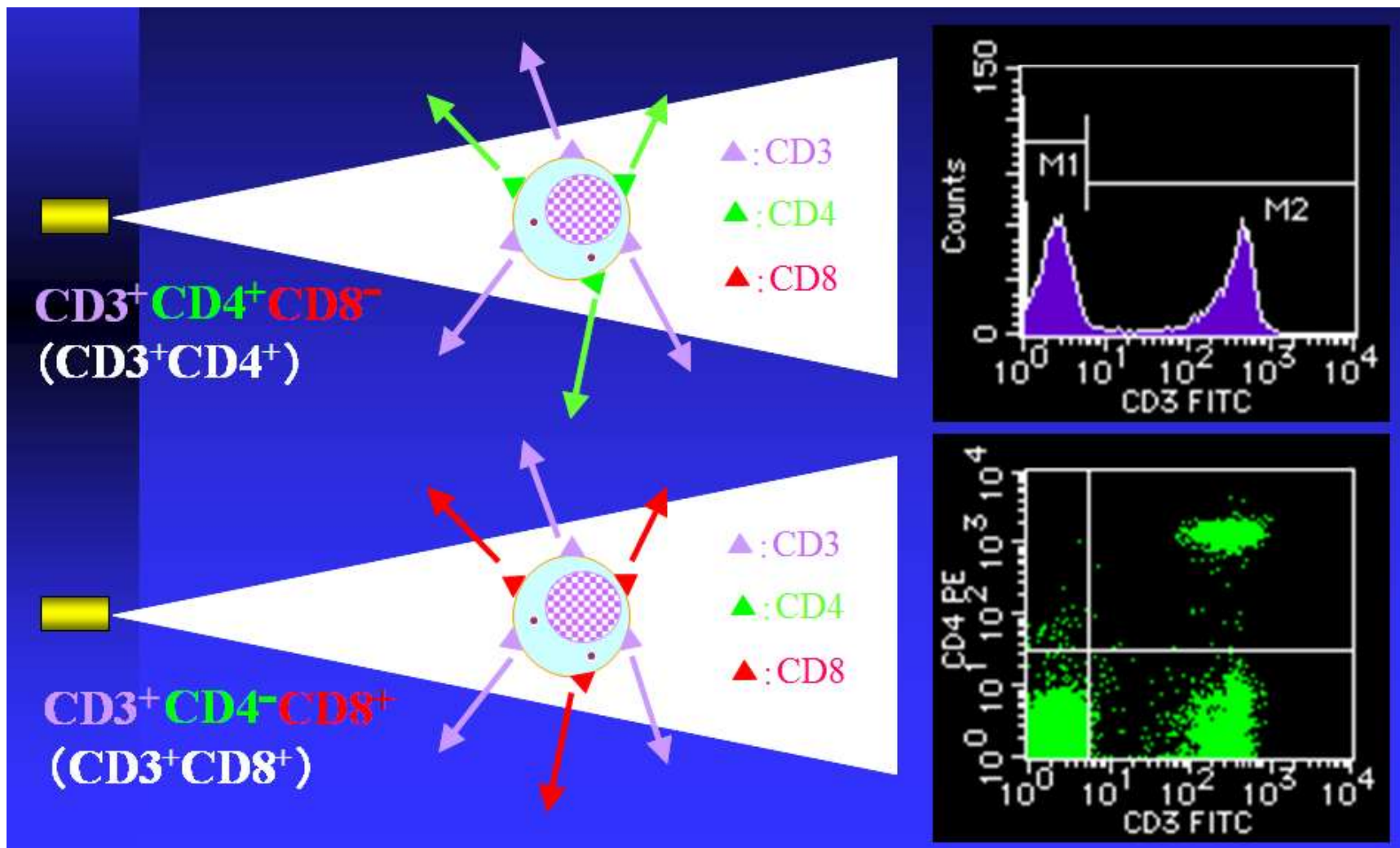


フローサイトメトリー (Flow cytometry)



<http://bioanalysisforum.jp/>

フローサイトメトリー (Flow cytometry)

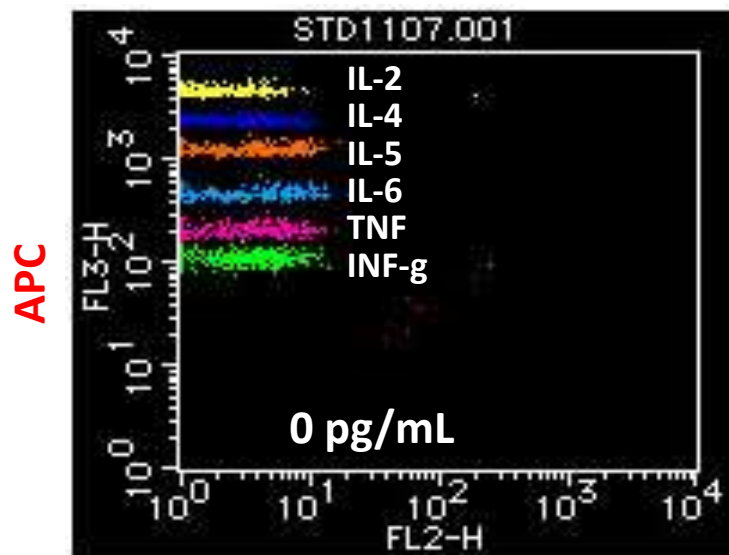
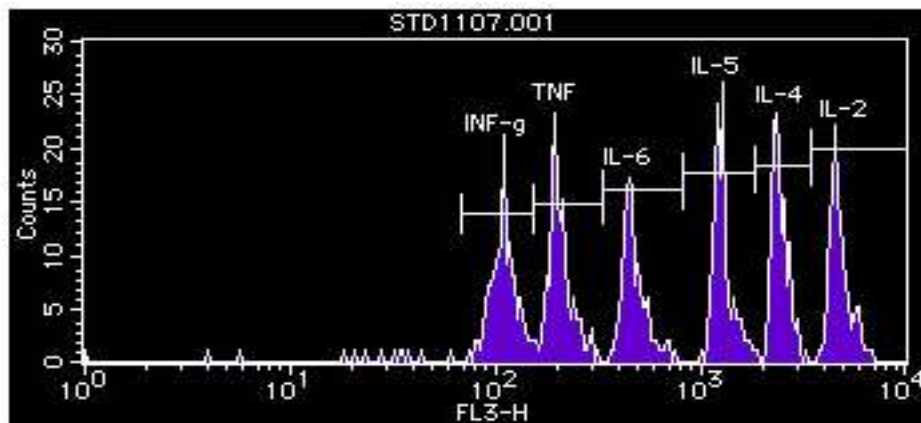


フローサイトメトリー：ビースアレイ (Bead array)

原理

- IL-2
- IL-4
- IL-5
- IL-6
- TNF
- INF-g

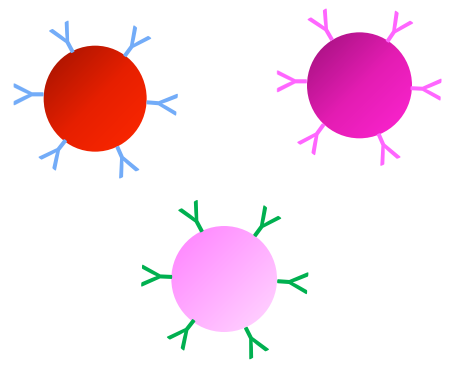
蛍光強度 (APC) の異なるビーズにそれぞれに対応する抗体を結合させておく。



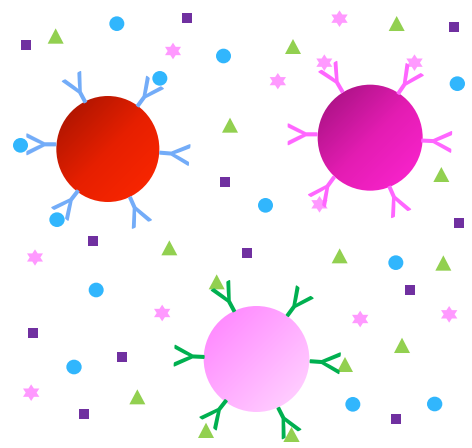


フローサイトメトリー：ビースアレイ (Bead array)

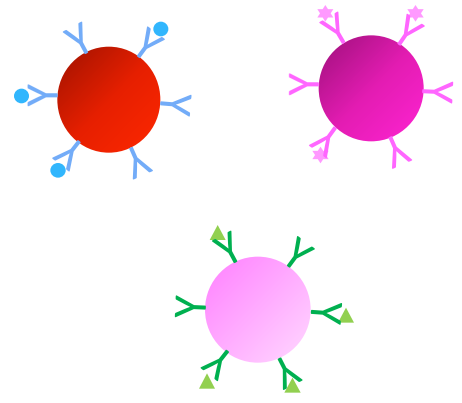
Dispense capture beads



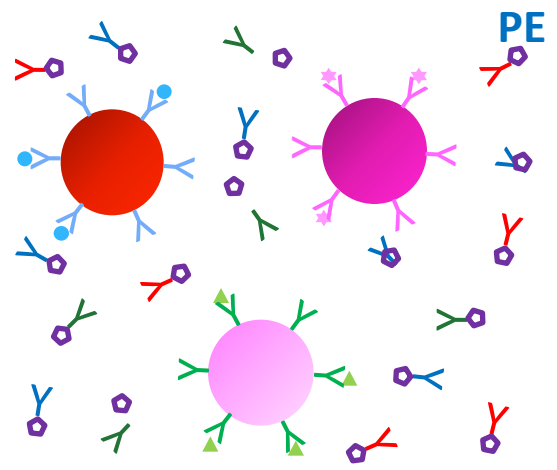
Add samples



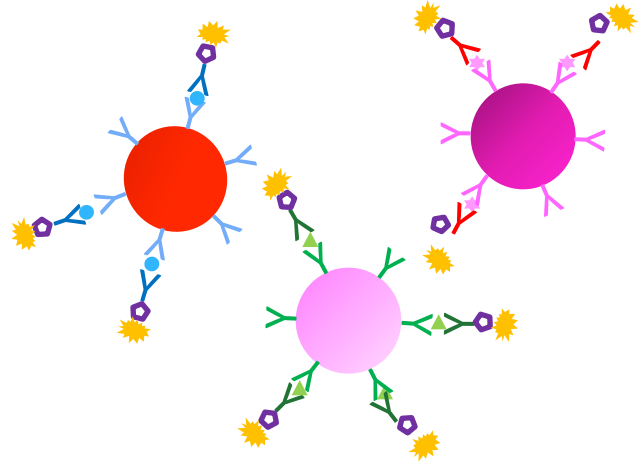
Remove unbound materials



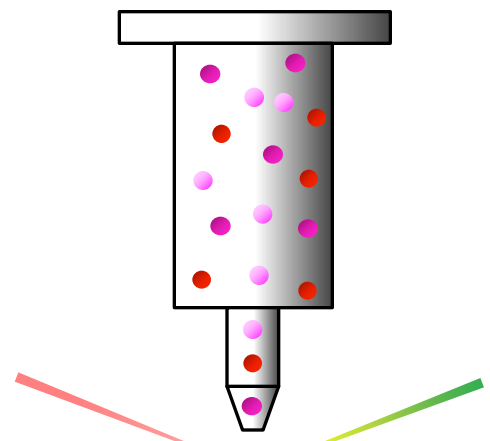
Add biotinylated detection antibodies



Incubate with a reporter streptavidin-phycoerythrin conjugate



Fluorescent sorting and data reduction



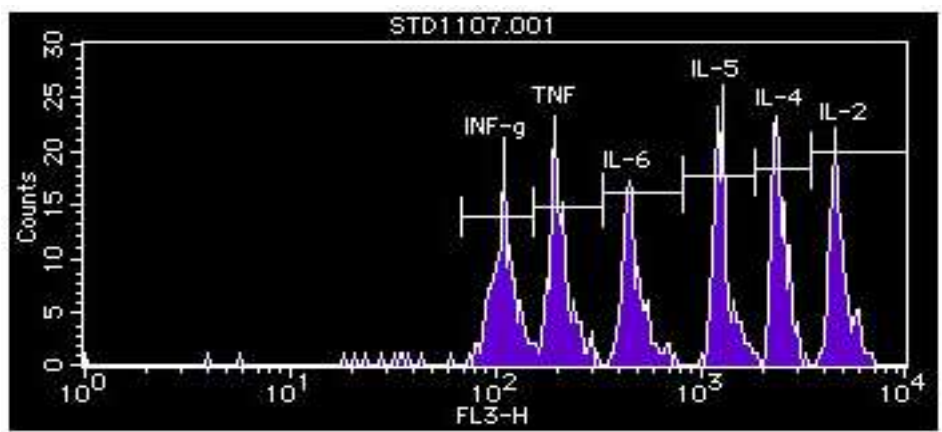
Classification laser

Reporter laser

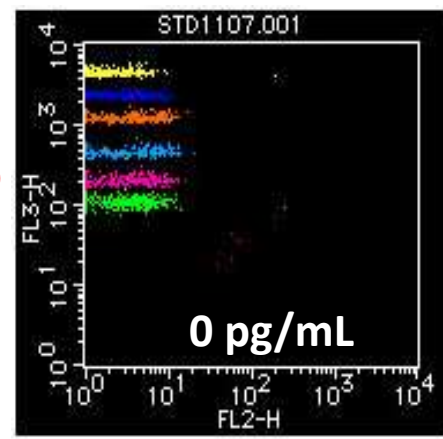


フローサイトメトリー：ビースアレイ (Bead array)

Sample volume: 15 μ L/6 parameters (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF, INF- γ)



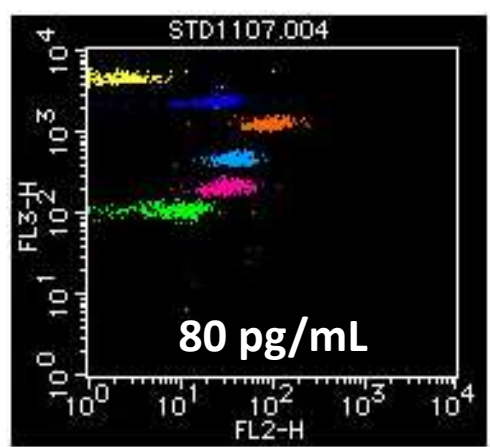
APC



APC

PE

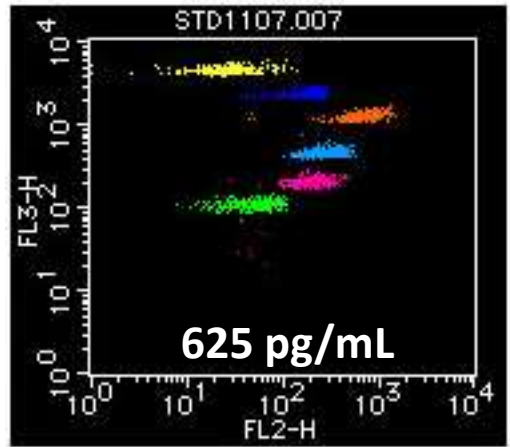
0 pg/mL



APC

PE

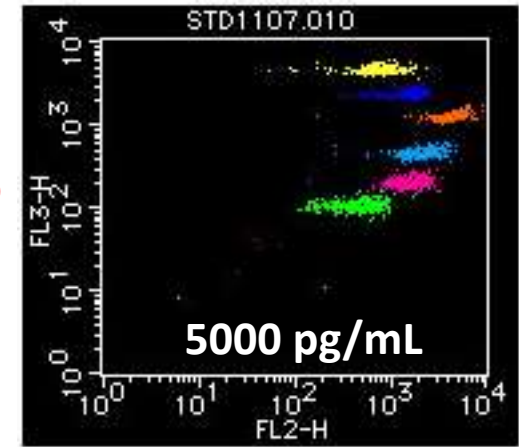
80 pg/mL



APC

PE

625 pg/mL



APC

PE

5000 pg/mL

<http://bioanalysisforum.jp/>



Luminex

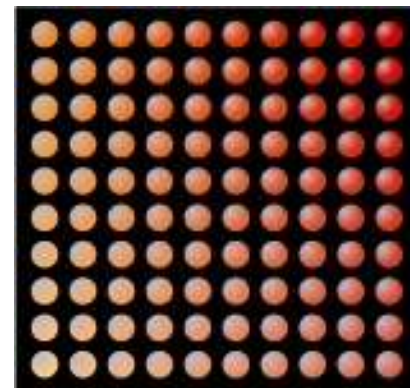


<http://bioanalysisforum.jp/>

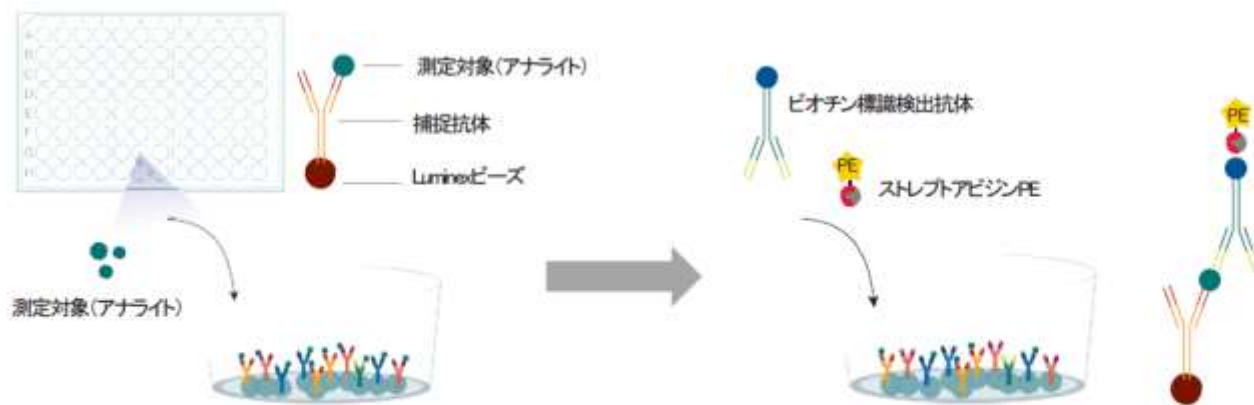
**Bio-Plex 200 Suspension Array Systems
(Bio-Rad Laboratories, Inc.)**

Luminex

- 自動分析機器
- 理論的には100種類を25 μ Lで分析可能
- いろんな分野のキットが存在
- 網羅的な分析が可能



引用: <http://ivd.mbl.co.jp/measurement/luminex.html>



操作方法概略

- ・試料の入ったプレートに、測定対象(アナライト)に対する抗体でコートされたビーズを加える。
- ・ウェルを洗浄した後、ビオチン標識抗体を加える。
- ・ウェルを洗浄した後、PE標識ストレプトアビジンを加える。
- ・ひとつのレーザーでビーズの蛍光強度を測定した後、別のレーザーでPEの蛍光強度を測定する。これにより、複数の因子を同時に測定する。

引用: <http://www.funakoshi.co.jp/download/pdf/RSD5264.pdf>

DG2016-27で論議した内容

[Q1]

マルチプレックス（多項目同時測定）の場合、
シングルプレックスでも真度・精度の確認を
しているか？

[DG内での意見]

マルチプレックスのみで確認している。

DG2016-27で論議した内容

[Q2]

市販キットの取扱説明書での回収率が低い場合にはどうしているのか？

[DG内での意見]

キットの性能を考慮した上で使用する。
CBA*はスクリーニングに使用するため、
変動が追えればよいという考え方もあり。

* CBA: Cytometric Bead Array (フローサイトメトリー用)

DG2016-27で論議した内容

[Q3]

どのような時にマルチプレックスを選択するのか?

[DG内での意見]

多項目について網羅的に確認したい時にはCBAを、単体で測定する時や感度が必要な時はELISAを使用している。

最近はCBAより高感度で、多項目が測定可能なLuminexなどが使用される事が多い。

DG2016-27で論議した内容

[Q4]

どのような時にLuminexを選択するのか？

[DG内での意見]

少量のサンプル(最少12.5 μ L/well)から1回の測定で複数項目について網羅的に確認したい時に選択する。

CBAより高感度なため、感度が必要な測定の場合に選択する。

DG2016-27で論議した内容

[Q5]

測定したい動物種専用のキットが無い場合はどのように対応しているのか？

[DG内での意見]

他の動物種のキットで検討し、バリデーションで適合基準を満たせば使用している。

DG2016-27で論議した内容

[Q6]

高濃度試料はどのように調製しているのか？

[DG内での意見]

高濃度マトリックスが入手できなければ、キットに同梱されている標準液をマトリックスに添加して高濃度試料を調製している。

標準溶液が市販されている場合もある。

DG2016-27で論議した内容

【測定方法の確立】

試薬の選択: 測定項目に合わせて市販品から選択する。
動物専用キットを選択する。

試料の選択: キット添付書に記載されているマトリックスを使用している。
Bead array: 血漿、血清、BAL(肺胞洗浄液)など。
Luminex: 血漿、血清、尿あるいは培養上清など。

抗凝固剤: 主にヘパリンナトリウムを使用している。

【バリデーション項目】(1/3)

- 特異性:** ブランク試料及び類似物質を添加したQC試料(LLOQ, ULOQ, 実試料を想定した濃度)を用いて評価する。
ブランク試料及び類似物質を添加したQC試料が定量下限, 類似物質の真度が $\pm 20\%$ 以内(定量下限, 上限は25%以内)。
- 選択性:** 10個体の個別ブランク試料及び測定対象物質を個別ブランク試料に添加したQC試料(LLOQ)を用いて評価する。
ブランク試料の80%以上が定量下限, QC試料の80%以上の真度が $\pm 20\%$ 以内(定量下限は25%以内)。

【バリデーション項目】(2/3)

検量線: 6濃度以上の検量線用試料及びブランク試料で評価する。
相対誤差(RE)が±20%以内(定量下限、上限は25%)

真度及び精度: 5濃度 × 6重測定
真度が±20%以内(定量下限、上限は25%以内)
精度が20%以内(定量下限、上限は25%以内)

【バリデーション項目】(3/3)

希釈直線性: 検量線の上限を超える濃度のQC試料を段階希釈して評価する(3~4濃度、各N=3)。

真度が理論値の $\pm 20\%$ 以内

精度が $\pm 20\%$ 以内

安定性: 低濃度及び高濃度のQC試料(LOQ、HOQ)を保存後に測定して評価する(各N=3)。

初期値の $\pm 20\%$ 以内

マルチプレックスのバリデーション 実際

【 DG2016-27で論議したバリデーション項目】(1/3)

Bead array

特異性: 市販キットなので、**キットの情報を信じて実施していない。**

選択性: 試料にSTDを添加して真度を評価している。
(選択性というよりは添加回収試験として実施)

検量線: REが $\pm 20\%$ (定量下限は25%)、 R^2 は0.9以上。
ULOQ、LLOQの真度/精度が外れることがよくある。

マルチプレックスのバリデーション 実際

【 DG2016-27で論議したバリデーション項目】(2/3)

Bead array

真度: 試料にSTDを添加して真度を算出するが、基準設定はなし。
1種類のみなら基準を設けることが可能だが、**数種類になると
全ての基準を満たすことがない。**
→真度に基準設けるべきか？

精度(日内): 3~5濃度 × 2~5重測定、精度が20%以内(定量下限は25%)。

精度(日差): 3~5濃度 × 2~3重測定、精度が20%以内(定量下限は25%)。

これら全てが基準を満たすことが実際にはほぼない。

マルチプレックスのバリデーション 実際

【 DG2016-27で論議したバリデーション項目】(3/3)

Bead array

希釈直線性: 3~4濃度、各N=1~3。理論値の±20%以内。
感度を優先し、希釈しないという意見もあり。

安定性: 1~2濃度×1~3重測定×3試料。初期値の±20%以内。
凍結融解(3回)、調製後の室温安定性なども
確認している施設あり。

全ての項目でいろいろな濃度のQCの真度や精度が外れることが多い。

Luminexのバリデーション

実際

【 DG2016-27で論議したバリデーション項目】(1/2)

Luminex

- 特異性: 市販キットなので、**特異性を信じて実施していない。**
- 選択性: 6個体の試料に標準液(1濃度)を添加した試料をn=1で測定。
回収率100±25%以内。
- 検量線: n=1×5日間測定した検量線を評価。
精度25%以内、RE±25%以内。
- 真度: 試料にSTDを添加して真度を算出する。

Luminexのバリデーション

実際

【 DG2016-27で論議したバリデーション項目】(2/2)

Luminex

精度(日内): 3濃度をn=6で測定。

精度(日差): 3濃度をn=1×5日間測定。
精度25%以内、真度±25%以内。

希釈直線性: 高濃度試料を複数段階希釈しn=1で測定。
精度25%以内。

安定性: 凍結保存安定性、凍結融解安定性(3回)。
3濃度をn=1で測定。初期値の±25%以内。

全ての項目でいろいろな濃度のQCの真度や精度が外れることが多い。

まとめ

- 検量線、日内再現性、日差再現性、希釈直線性、安定性はすべての施設で実施していた。
- 選択性は添加回収試験として実施し、真度を評価していた。
- 特異性はすべての施設で実施していなかった。

特異性及び選択性について

- リガンド結合法のガイドラインが出る前にバリデーションを実施しており、各施設で決めた項目で実施していた。
- リガンド結合法のガイドラインは薬物濃度測定を想定して作成されており、バイオマーカー測定に適さないところもある。

特異性及び選択性について

- 動物試料の内因性物質定量（バイオマーカー測定）の場合、標準物質や類似物質の入手が困難である（不可能でなくても高価）。
- 内因性物質のためすでに試料中に含まれており、特異性や選択性の評価が困難である。
- そのため、実際は添加回収試験としてキットのスタンダードを測定対象マトリックスに添加し、既知濃度の試料を作製して回収率を評価していた。

問題点

- 標準物質や類似物質の入手が困難であるため抗体の反応性は確認の方法が難しく、現状はキットや試薬製造メーカーの情報を信頼している状況である。
- キットの標準品を使用する場合でも、バリデーションに必要な量を確保するために、キットや別売りの標準品を多数購入しなければならないケースもある。

問題点

- マルチプレックスでのバリデーションの場合、回収率や希釈直線性が項目によって異なる場合がある。
- 各評価基準となっている $\pm 20\%$ の設定では真度も精度も外れやすい状況である。
- マトリクスの影響を受ける項目はその項目のみ希釈倍率を変更して測定しなければならないのか？
- バリデーション基準から外れた項目は測定には使えないのか？

提案

医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法(リガンド結合法)の バリデーションに関するガイドライン

(薬食審査発0401第1号 平成26年4月1日)

2. 適用

本ガイドラインは、**トキシコキネティクス試験**及び**臨床試験**における生体試料中薬物濃度分析法としてリガンド結合法を用いる際の分析法バリデーション並びに当該分析法を用いた実試料分析に適用するものとする。

なお、「**医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令**」(平成9年3月26日厚生省令第21号)の対象とならない非臨床試験で使用される分析法は、**当該ガイドラインの適用対象ではない**が、当該ガイドラインの内容を参考に必要なバリデーション等を実施してよい。

マルチプレックスを用いるような網羅的な測定は、トキシコキネティクス試験及び臨床試験で実施することはほとんどないと考えられ、当該ガイドラインの内容を参考に、**マルチプレックスに適すると考えられるバリデーション**を提案する。

提案

【バリデーション項目】(1/2)

- 特異性: **キットや試薬等の製造メーカー側で特異性が確認されている場合は実施しない。**
- 選択性(真度): **試料にSTDを添加して真度を評価する。**
真度の基準には多少の幅を持たせる。
あるいは、基準設けても、多少の外れは許容する。
- 検量線: **相対誤差(RE)が±20%以内(定量下限、上限は25%)**

提案

【バリデーション項目】(2/2)

日内再現性: 3~5濃度×6重測定、真度と精度*は±20%以内。
(定量下限と上限は±25%以内)

日差再現性: 3~5濃度×3重測定、真度と精度*は±20%以内。
(定量下限と上限は±25%以内)

真度と精度については、基準を設けても、
多少の外れは許容する。

希釈直線性: 3~4濃度、各N=3。相対値を評価する。
基準設定はせず、希釈直線性が悪い場合は
キットの性能を考慮した上で使用する。

安定性: 2濃度、各N=3。初期値の±20%以内。

提案

- マルチプレックスを使用するケースでは、スクリーニングなど相対的な動きが追えればよい場合が多く、血中濃度測定に準ずるような定量性は必要ないと考える。
- キットの性能を考慮した上で、変動が追えれば評価は可能と考える。
- 項目として実施しない場合は、その項目の意義を把握した上で、実施しなくても良い理由を説明できる事が重要である。

最後に

- マルチプレックスは少量の試料から多項目を同時測定できる有用なツールである。
- 有用なツールなのにバリデーション基準が厳しすぎて使用できないというような状況を作り出してはならないと考える。
- マルチプレックスを用いた網羅的な測定は開発の初期に行うと考えられるので、目的に応じた項目と基準を設けてバリデーションを行う。