



LBAの失敗 & トラブル事例 と解決策

Failure & Trouble Cases and their Solutions of LBA


JBF DG members
構成メンバー

Name	Company
早田 洋平 Yohei Hayata	株式会社新日本科学 <i>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.</i>
元木 章裕 Akihiro Motoki	株式会社東レリサーチセンター <i>Toray Research Center, Inc.</i>
奥島 綾夏 Ayaka Okushima	株式会社新日本科学 <i>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.</i>
大岡 香織 Kaori Ooka	株式会社住化分析センター <i>Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.</i>
齊藤 哲 Tetsu Saito	アステラス製薬株式会社 <i>Astellas Pharma Inc.</i>
山本 卓 Takashi Yamamoto	積水メディカル株式会社 <i>SEKISUI MEDICAL CO., LTD.</i>

※アドバイザー：中村 隆広（株式会社新日本科学）



活動の内容

- ◆ 2018年 5月 May 2018
 - ✓ DGサポーターからDGメンバー募集 Member recruitment
- ◆ 2018年 7月12日 Jul 12 2018
 - ✓ キックオフ会議 (DG2018-38、 DG2018-39の合同会議)
Kick off meeting with DG2018-38 and DG2018-39
- ◆ 2018年 8月～2019年 1月 Aug 2018 to Jan 2019
 - ✓ Web会議 (平均月2回) 及びメールによる議論
Twice a month teleconferences and e-mail conversations
 - ✓ DGサポーターへアンケート配信 Survey DG supporters
- ◆ 2018年 12月～2019年1月 Dec 2018 to Jan 2019
 - ✓ 議論のまとめ及びシンポジウム発表準備
Summary of discussion and poster preparation

 **背景・目的**

LBAは古くから用いられた測定法であるが、バイオ医薬品や核酸医薬品等の高分子医薬品の開発が活発化されている近年、LBAの需要性が高まり、未経験者が実験を行う機会も多い。

LBAは複数の抗原抗体反応を用いた測定法であるため、操作が煩雑となる上、時間や温度の影響を受けやすい。また、高度なハンドリングが求められ、経験が浅いサイエンティストのみならず熟練者でもトラブルへの対応が困難と感ずることがある。

本DGでは、LBAにおける様々なトラブル事例を収集し、それらの対応を提案し、バイオアナリシス分野におけるLBAの普及の一助としたい。



Background and objective

Ligand binding assay (LBA) is widely used in bioanalysis for development of macromolecular pharmaceuticals such as proteins.

LBA is commonly based on the plural antigen-antibody reactions, and analysts often face various troubles because: 1) operation of LBA is complicated and skillful handling is needed, and 2) the results of LBA are highly influenced by experimental conditions such as temperature and reaction time. The purpose of this discussion group (DG) is to help the analysts to solve problems around LBA in bioanalysis, collecting the various cases of trouble and sharing how to solve them.

In this open discussion, we will present our discussion and recommendation of the “Knowledge to prevent failure” in LBA.



DG2018-39のdiscussion

- ・LBAで課題が生じそうな作業をDGで6項目に分類



- ・DGメンバーから収集した事例と第1回アンケートで得られた事例を集約、原因や対応策について議論



- ・DGで判断するのが難しい事例、複数選択肢がある事例についての調査を第2回アンケートで実施



- ・本DGでの議論と共に以前のDGでの議論内容も加味して内容をまとめたポスターを作製



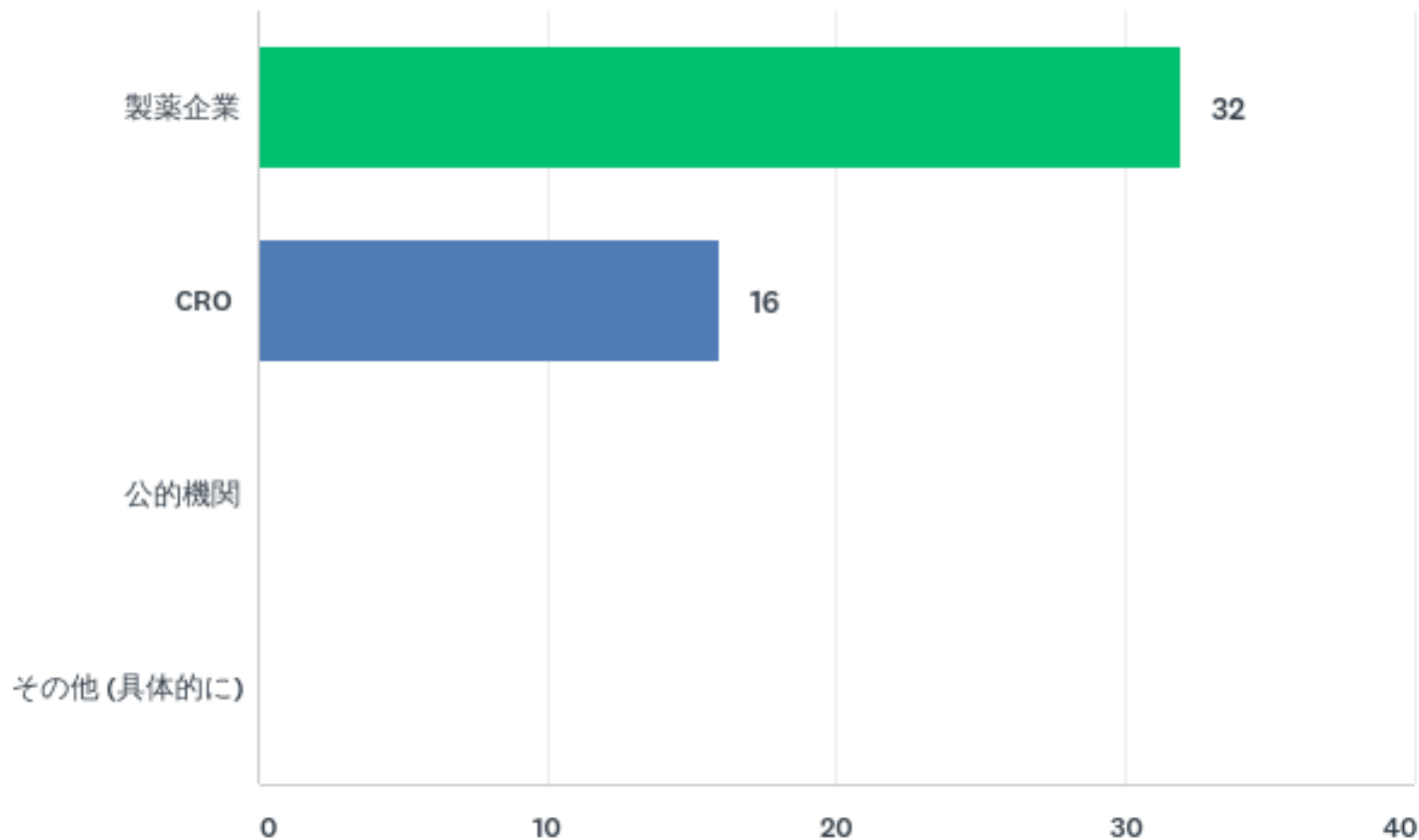
DG2018-39の発表に際して

- 失敗やトラブルとその対処には色々な側面がありますが、当DG内の議論のみではどうしてもカバーしきれない部分や正しく現象をとらえられていない部分、異なった解釈が考えられる点が出てきます。
- このDGのポスター発表を見ていただき、上記のような点でお気づきの部分が出てくることも多いと予想しております。
- ポスター付近に付箋紙を用意しておりますので、どこでもポスターの気になる部分にコメントを残していただければ嬉しいです。
- ポスターを最終化する際にできるだけ追加でいただいたコメントを含める形でまとめることを考えておりますので宜しくお願いいたします！



回答者のプロフィール アンケート①より

Q: 所属について教えてください

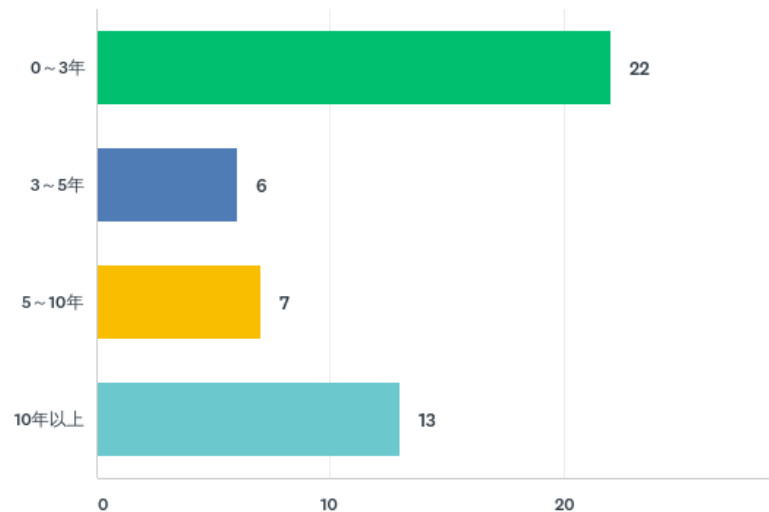


<http://bioanalysisforum.jp/>

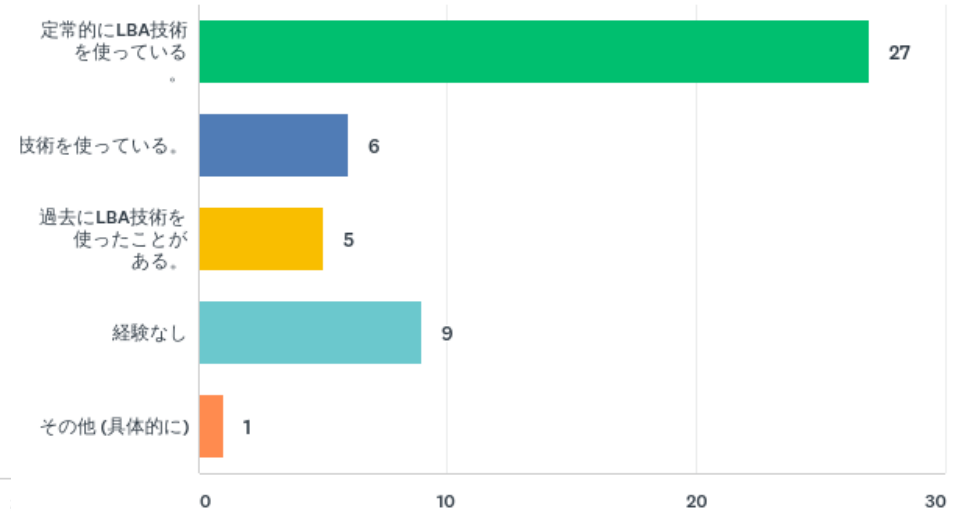


回答者のプロフィール アンケート①より

Q: LBA分野に従事して何年
くらいになりますか



Q: LBAの実施頻度について
教えてください

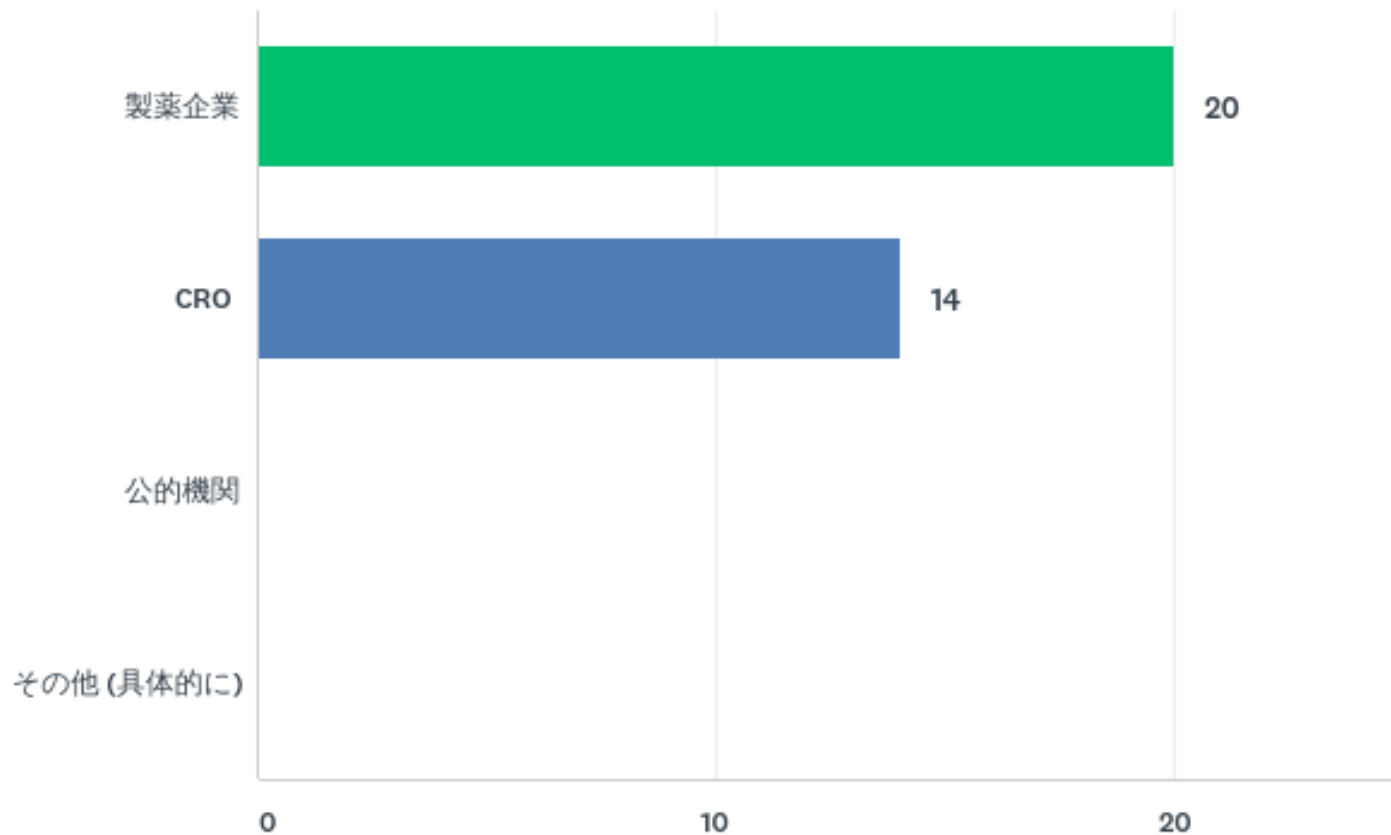


<http://bioanalysisforum.jp/>



回答者のプロフィール アンケート②より

Q: 所属について教えてください

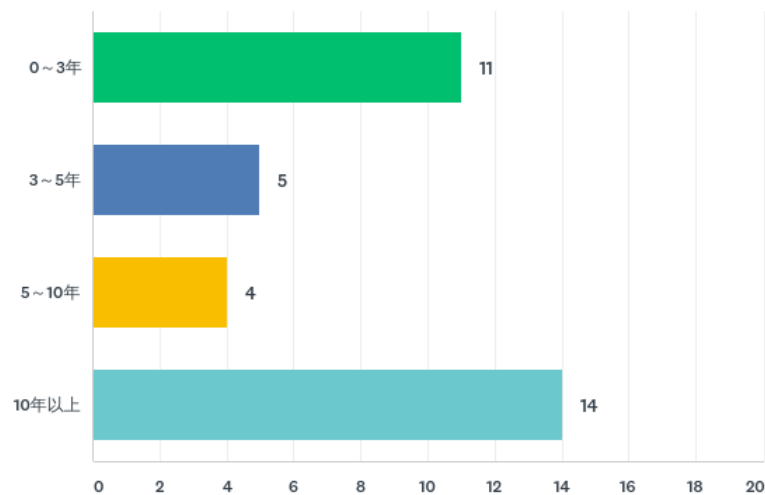


<http://bioanalysisforum.jp/>

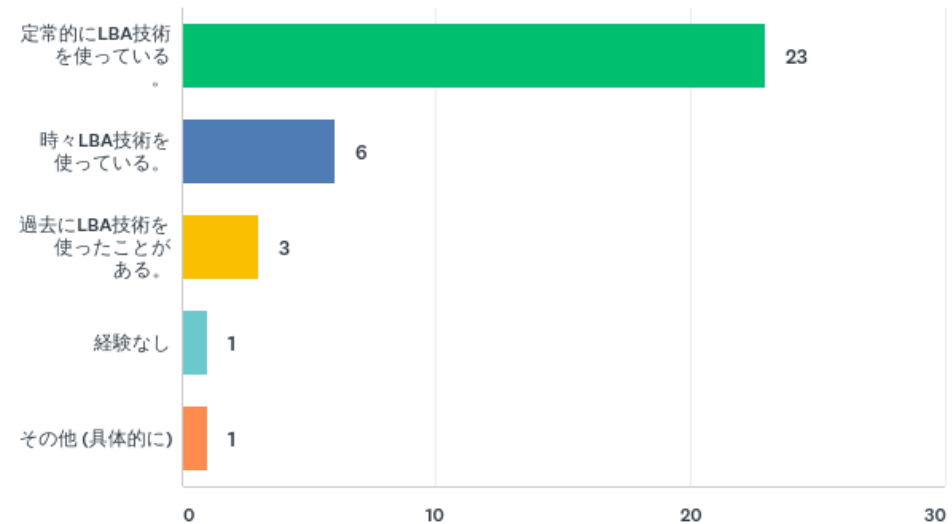


回答者のプロフィール アンケート②より

Q: LBA分野に従事して何年
くらいになりますか



Q: LBAの実施頻度について
教えてください



<http://www.raysonline.jp/>



トラブル事例のカテゴリー

測定系の選択、構築

- ◆ 機器に関して
- ◆ キットに関して
- ◆ マトリックスに関して
- ◆ 測定法に関して

測定準備

測定中

測定結果

data解析

全般的(その他)

<http://bioanalysisforum.jp/>



事例

ECLのクロストーク対策を考慮し実施すべきでしょうか。シングル測定ができるSQ120を使用することで対策となるようになりますか。



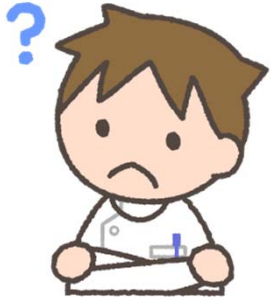
考えうる要因・対応策

- ・おおよそ化学発光値が100万を超えた場合に顕著なクロストークが起きる可能性がある。
- ・クロストーク有無の判断基準をどのように設ければよいか悩ましいが、シングルウェル測定の場合はReplicate測定のCV値で判断できるかもしれない。また複数ウェル測定の場合もプレートレイアウトを工夫 (Replicate測定) すればCV値で判断が可能。(測定ブロックをまたいでReplicate測定をするなど)

DGからの一言

バリデーション時の希釈直線性と一緒にクロストークを確認してみてもはどうでしょうか。





事例

PK系の構築開始をどのプラットフォームで行うか迷います。
ECLで行うかGyrolabで行うか・・・



考えうる要因・対応策

- ・現状、海外臨床でGyrolabを使えるところが少ない状況。
- ・技術移管を想定している場合にはCRO選択が限定される。
- ・自動測定機器を選ぶメリットとしては実験者間差をなくすことに優れているという点がある。
- ・感度を優先する場合はECLが優れているケースが多く、スループットや省力化を優先する場合はGyrolabなどの自動測定機器が優れているケースが多い。

DGからの一言

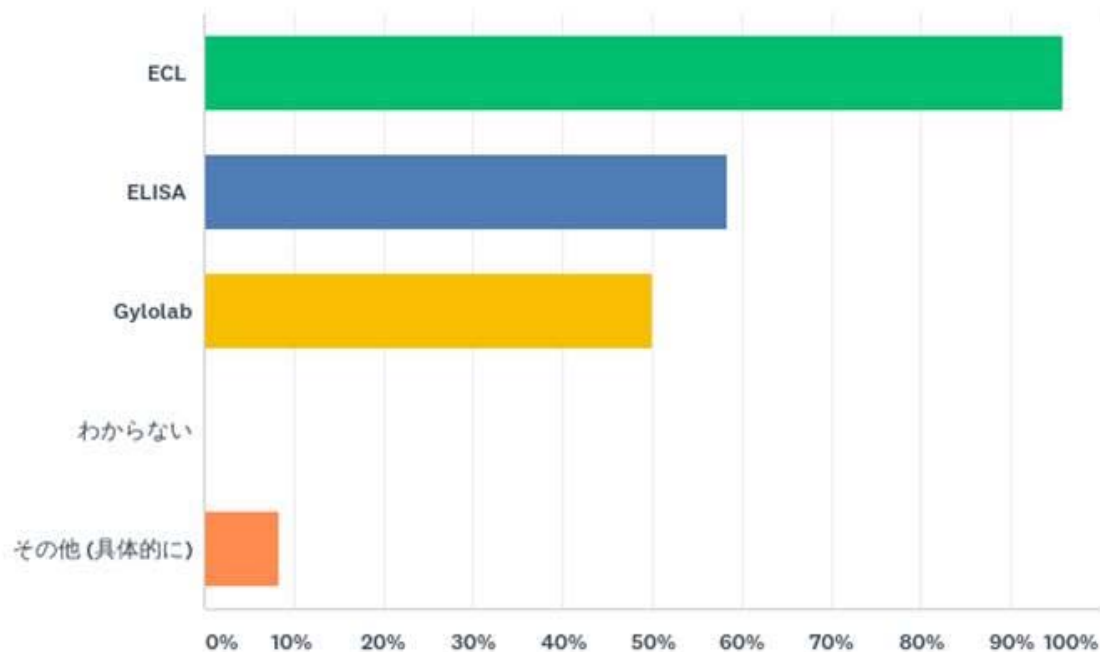
感度・コスト・機器使用率などの観点から優先順位をつけましょう。
ADA、バイオマーカーのプラットフォーム選択についてのアンケート結果も
ご参照ください。





測定法に関して (測定系の選択、構築) アンケート

Q: LBAでPK測定系を構築するとき主に使用しているのはどの系ですか？ (複数選択)



<http://bioanalysisforum.jp/>

DGからの一言

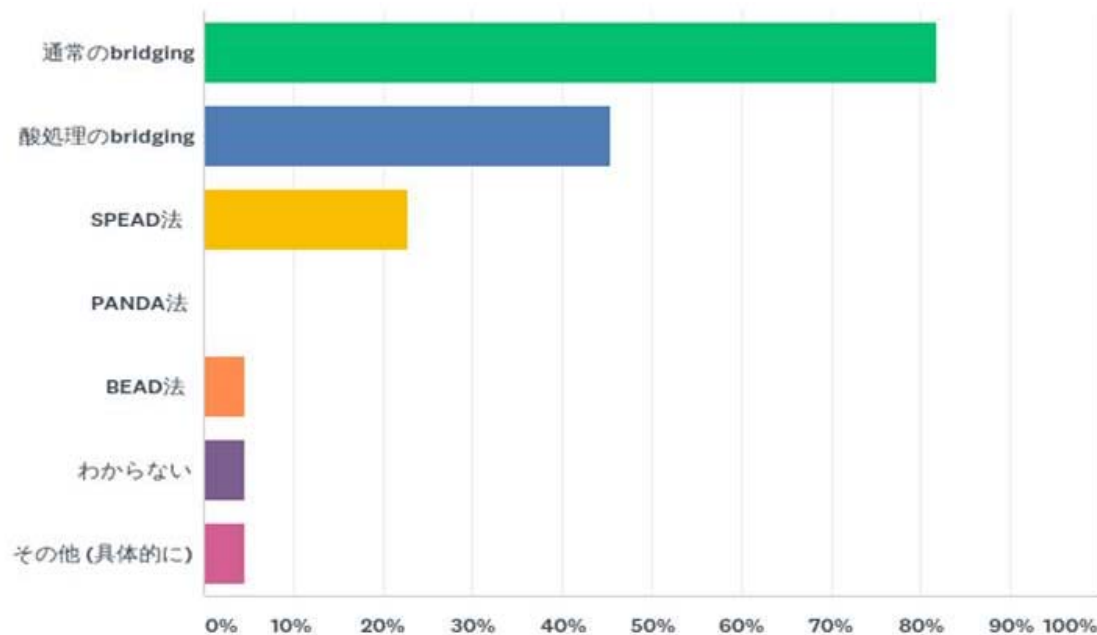
材料が揃いやすいELISAが最も多いと思われたが、ECLがもっとも多い結果になりました。各社とも自社開発時の機器のファーストチョイスを決めているように思えます。





測定法に関して (測定系の選択、構築) アンケート

Q: 抗抗体検出系を構築する際に主に使用しているのはどの系ですか？ (複数選択)



DGからの一言

予想どおり通常のBridgingがもっとも多い結果となりましたが、酸処理を用いている例も多く妨害物質等の影響を減らす作業も広く用いられているようです。

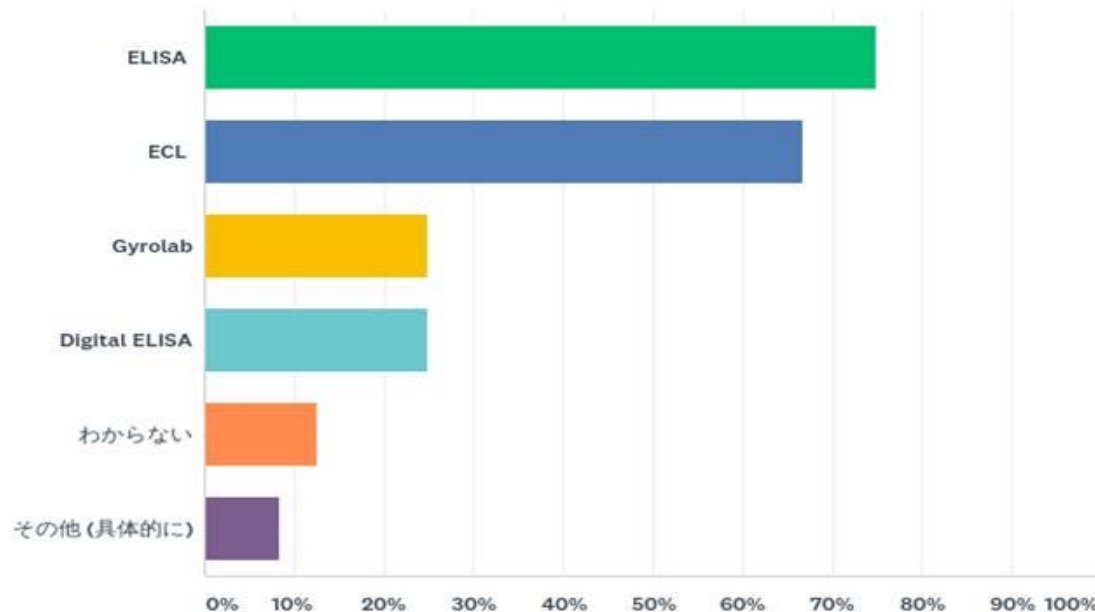


<http://bioanalysisforum.jp/>



測定法に関して (測定系の選択、構築) アンケート

Q: バイオマーカー測定系を構築するときに使用しているのはどの系ですか？ (複数選択)



DGからの一言

全体的な傾向はPK構築の際と同様になりました。Digital ELISAが20~30%あることから、BM測定において高感度化が求められていることが分かります。



<http://bioanalysisforum.jp/>

JBF キットに関して (測定系の選択、構築)



事例

市販キットを用いて濃度測定をしたが申請レベルでは使えないデータが得られました。



考えうる要因

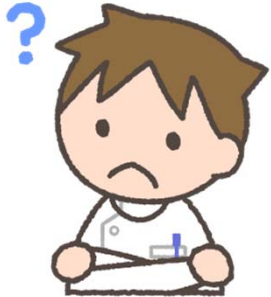
- ・キットがLBAガイドラインの許容基準に適合しないことがある。
- ・種々の原因でデータシートが再現されない経験あり。
- ・QC設定がないキットもある。
- ・メーカーによりQCの設定や許容基準が異なるケースあり。

DGからの一言

論文等で実績のあるものを使用するのがよいかもしれません。キットをそのまま使用するのではなく、別途標準品を購入してバリデーションを実施することも検討してはどうでしょうか。スクリーニングレベルでも再現性や添加回収のみ等の簡易なバリデーションを実施することが好ましいと考えます。



キット使用の応用例 (測定系の選択、構築)



事例

キットそのままだと感度や信頼性、使い勝手などが不足していた。なんとかいいやり方は無いですか？



考える要因・対応策

DG内では以下のような意見があった。

- ・キット付属のツールはそのまま使用してELISA→ECL等へ変更して感度を向上させた経験あり。
- ・内因性物質を除外するために複数のキットの結果を使って数値を出すケースも。

昨年のDG (DG2017-34) の結果も是非ご参照を！

DGからの一言

- ・キットを改変しても良いか(知財等)調査はしっかりしてから試みましょう。





LBAキットでの失敗・トラブル例 DG&アンケート

- ・ **キットの試薬が足りない(無い)ことに後から気づいた!**

→まずは中身を確認してから実験しましょう。

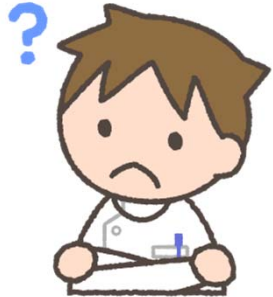
- ・ **違うキットで同じsampleを測ったら数値が全然違う。**

→標準物質(recombinant)の違いやツール抗体の性質等が影響しているかも。
相対的な変化を使うと割り切るのもあり。

他にもいろいろな事例が昨年のDG2017-34に詳しく紹介してありますので是非JBFのHPからご確認ください!

<http://bioanalysisforum.jp/>

マトリックスに関して (測定系の選択、構築)



事例

マトリックス中に測定に影響する物質が入っている場合の測定系をどう設定するか迷います。



考えうる要因・対応策

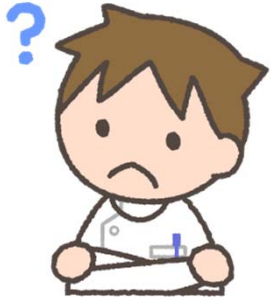
- ・ 固相化タンパク質、アナライトに結合する物質の存在など、色々な要因が考えられる。
- ・ 影響を受けない希釈条件の検討 (MRDを変更する)。
- ・ 抽出処理等の前処理をしてマトリックス成分の影響を減らすことが効果的なケースも。
- ・ ADA測定の場合は、酸処理などの検討を。
- ・ Bufferの組成で改善するケースもある。

DGからの一言

基本的にマトリックスの希釈を検討することを優先して良いと思いますが、アナライトに結合する妨害物質の場合は前処理やTotal体の測定を検討しても良いかもしれません。



測定法に関して (測定系の選択、構築)



事例

例えばマウスにマウス抗体を投与したPK試験をどのように設計するか悩みます。



考えうる要因・対応策

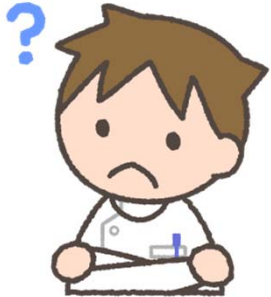
- ・抗マウス抗体を使うと内在性のIgGが原因でバックグラウンド値が上昇することが多い。
- ・DGで固相、検出ともにに抗原を使用すると改善するケースのコメントがあったが、高感度化が難しい印象。
- ・競合法を採用する選択肢もある。
- ・測定系の変更(ツール抗体の変更など)により、マトリックス効果を軽減できるケースあり。

DGからの一言

感度の問題もありますが、予備的な試験としてLC/MSを使用することもありかと思われます。



JBF 測定法に関して (測定系の選択、構築)



事例

測定プレートは96-well? 384-well? どちらを採用されているでしょうか。



考える要因・対応策

- ・ハンドリングの問題で実験者の好みで選ぶこともある。
- ・384wellプレートは少量サンプリングのためばらつきが大きくなることもあり使用例は少ないが、申請用試験で使用したという例もある。条件検討の際には有用と考えられる。
- ・384 wellプレートはある程度の熟練度を要する印象があり、96 wellプレートの方が幅広い実験者に適応できる印象。

<http://bioanalysisforum.jp/>

DGからの一言

384 wellプレートはハンドリングの問題から使用例がやはり少ないです。自動化と組み合わせられれば、より有用になると思われます。





トラブル事例のカテゴリー

測定系の選択、構築

測定準備

- ◆ 試薬について
- ◆ 温度について
- ◆ バリデーションについて
- ◆ メソッド開発について

測定中

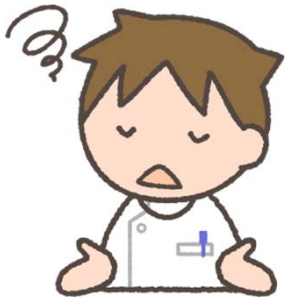
測定結果

data解析

全般的(その他)

<http://bioanalysisforum.jp/>

JBF 試薬について①(測定準備)



事例

Blocking溶液でバックグラウンドレベルが異なるケースが見られたのですが、種類や選ぶ基準は何かありますか？



考える要因・対応策

バックグラウンドレベルが測定に問題となるようなら...

- ・タンパクの種類 (阻害強度：ゼラチン>カゼイン>BSA)
- ・二次抗体由来動物の血清の添加や塩濃度、タンパク濃度を変える。

ただ強度が高すぎるとシグナルも低下するので選択性や再現性を確認して選択する。

DGからの一言

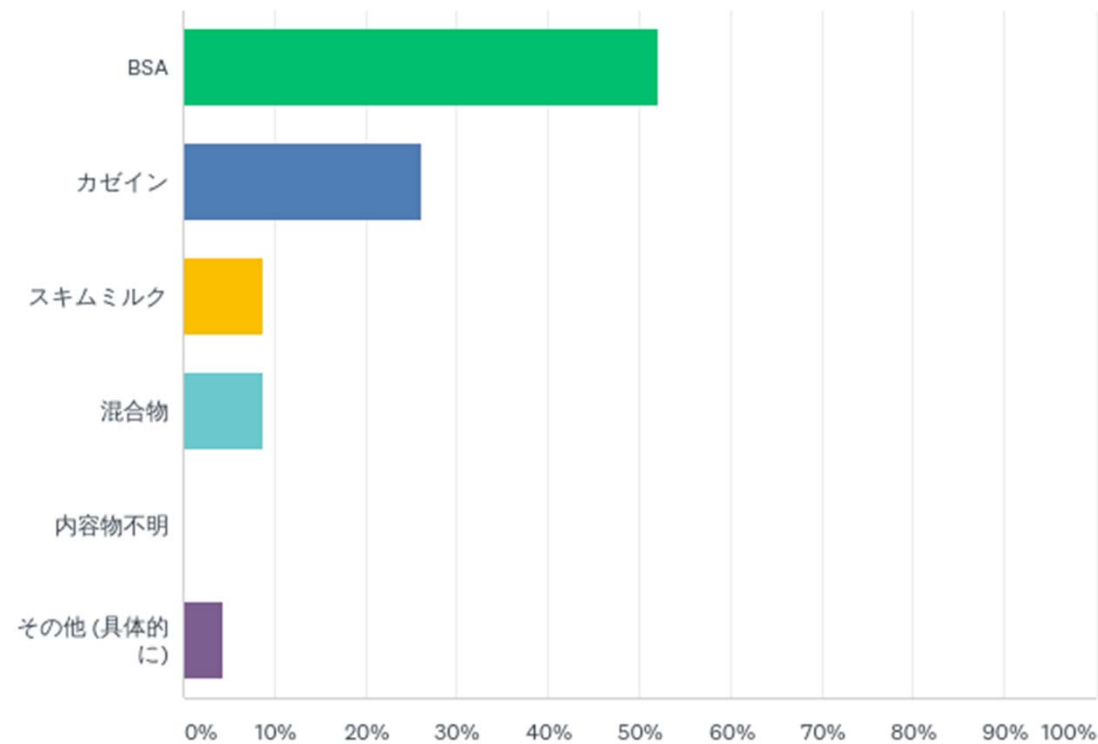
アンケートではBSAを第一選択とする回答が多かったです。測定に影響があるならバックグラウンドと感度を考慮して複数の試薬を試して選択してみてくださいはどうか。





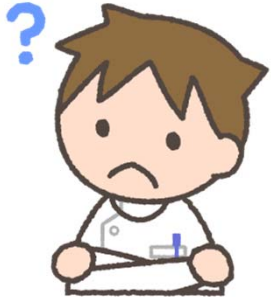
試薬について①(測定準備) アンケート

Q: Blocking溶液の第一優先は何ですか？



<http://bioanalysisforum.jp/>

JBF 試薬について② (測定準備)



事例

緩衝液の種類が結果に影響することはありますか？

考えうる要因・対応策

PBS

○：生体毒性が少ない。標識時に使用されることが多い。
 ×：リン酸が影響する反応 (アルカリフォスファターゼ、リン酸化タンパク、Ca²⁺を含むsampleの測定など) には使用しない方がいい。

TBS

○：PBSと比べ、生体中の成分との反応性が低い。
 ×：温度によりpH変化が起こる (25°C: pH7.4、4°C : pH8)。一級アミンを構造に含んでいるのでラベル化など、一級アミンが影響する反応には使用しない方がいい。

<http://bioanalysisforum.jp/>



DGからの一言

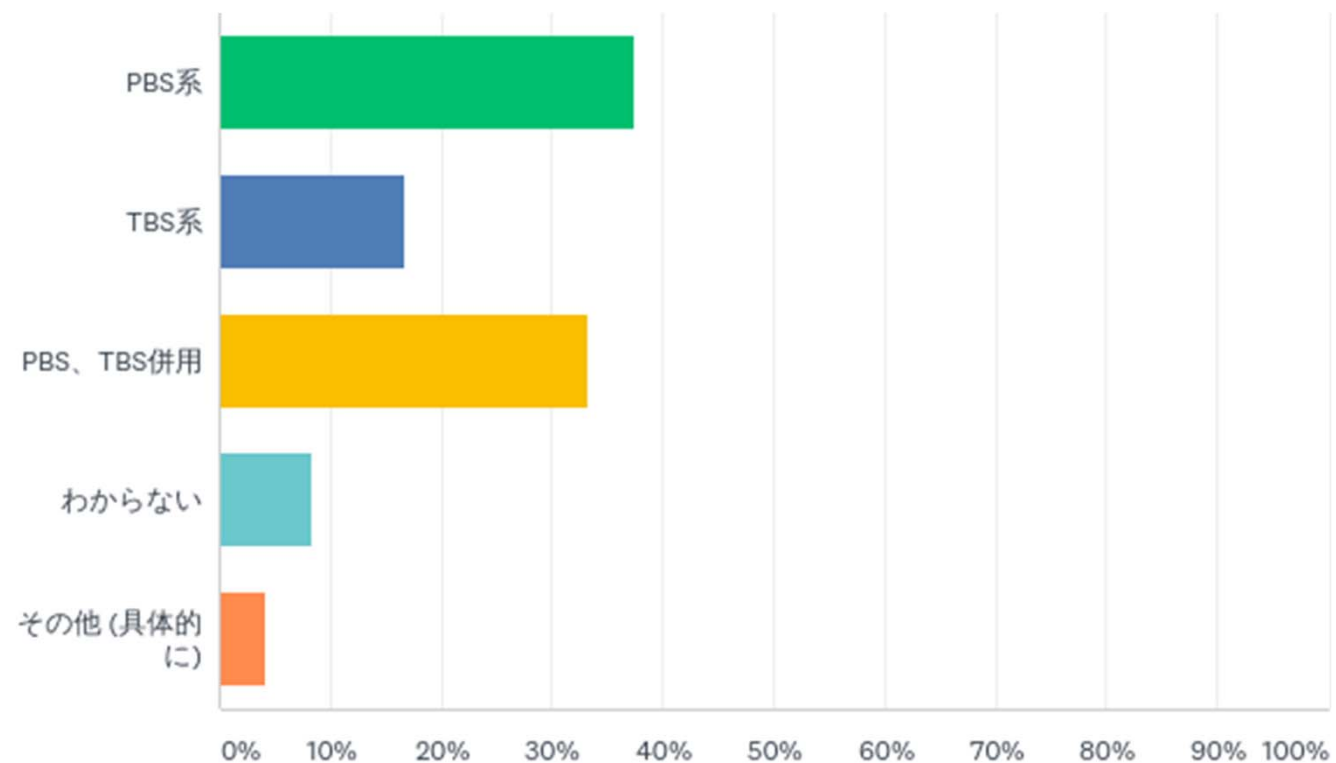
アンケートではPBSを使用する回答が多かったです。まずは測定対象の特性を考慮して緩衝液を選択した方がいいですね。





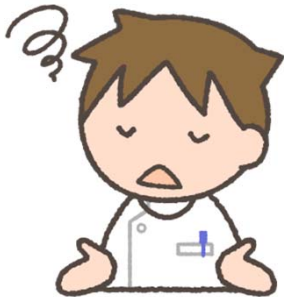
試薬について②(測定準備) アンケート

Q: 好んで使う緩衝液の種類は？



<http://bioanalysisforum.jp/>

JBF 試薬について③ (測定準備)



事例

カビなどが気になるのですが、試薬の保存方法のお勧めはありますか？



考える要因・対応策

アンケートより (多い意見から)

洗浄buffer :
 ①冷蔵 (2W~6M)
 ②常温 (1W~6M)
 ③常温 + 防腐剤 (1W)、冷蔵 + 防腐剤 (1M)

希釈buffer :
 ①冷蔵 (1W~3M)
 ②冷蔵 + 防腐剤 (1M~3M)
 ③常温 (用時調製)

DGからの一言

保存条件や期間は各施設それぞれでした。カビやコンタミに気を付けて保存した方がいいですね。使用時の温度むらにも注意。



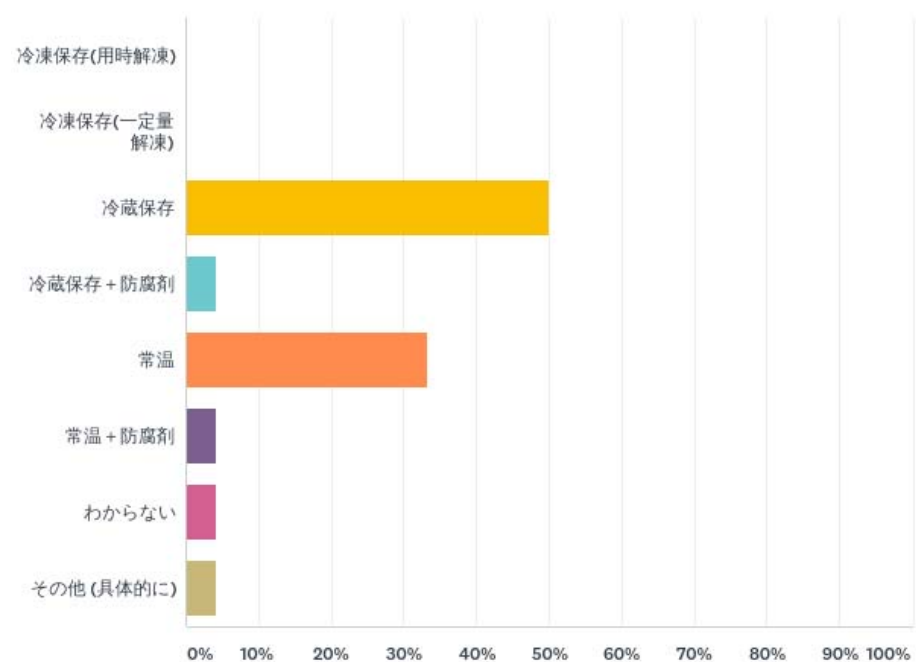
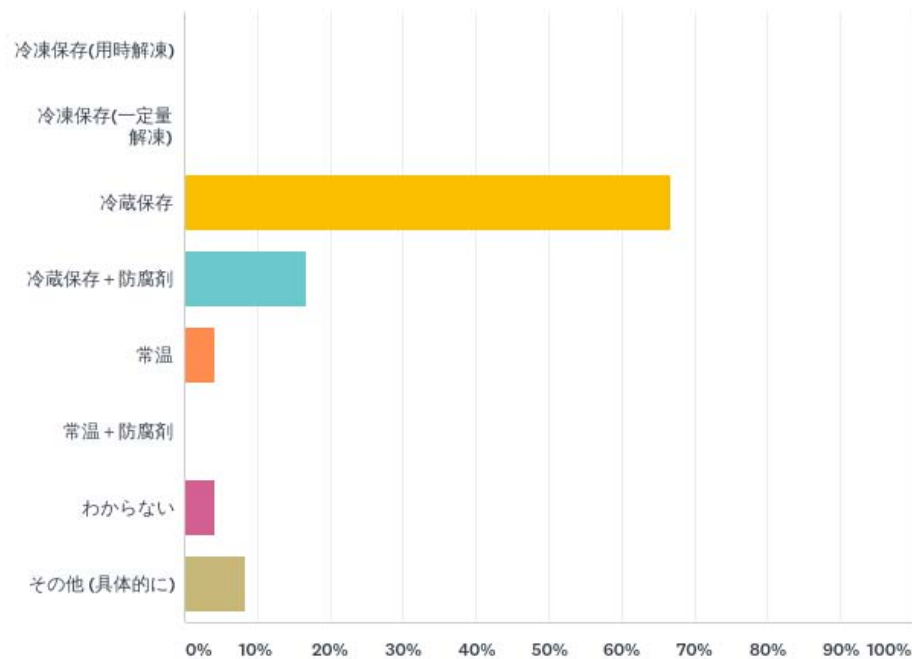
<http://bioanalysisforum.jp/>



試薬について③ (測定準備) アンケート

Q: (希釈などに使う)bufferの保存方法は？

Q: (洗浄に使う)bufferの保存方法は？



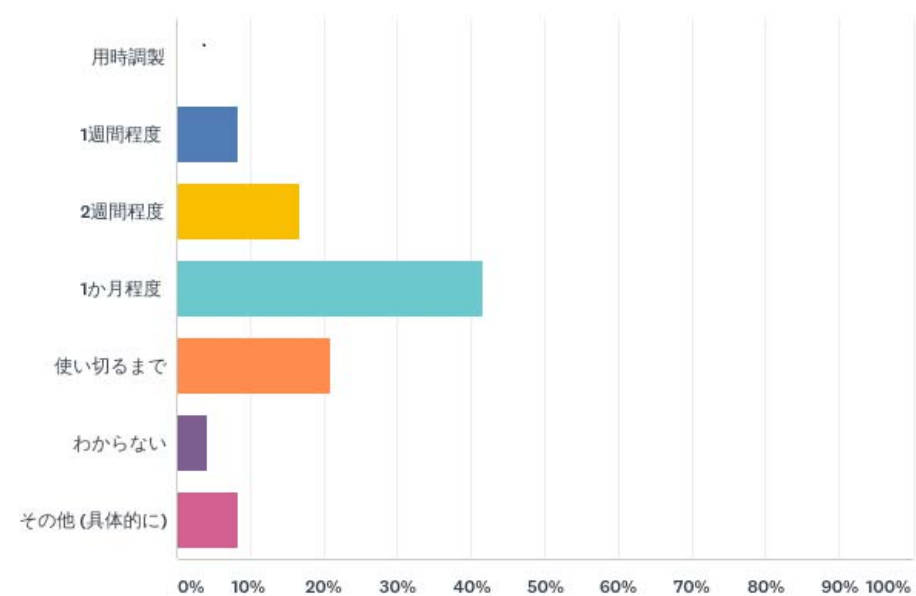
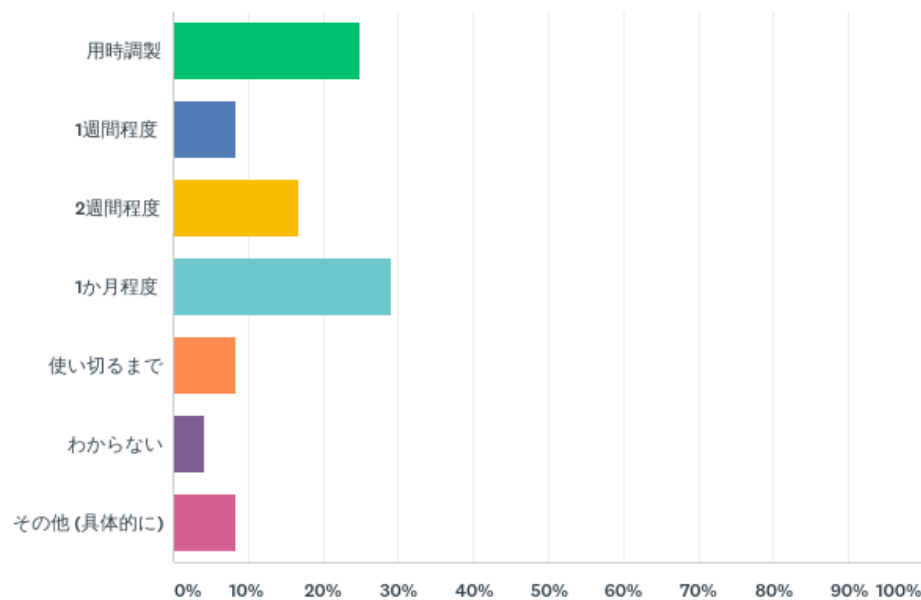
<http://bioanalysisforum.jp/>



試薬について③ (測定準備) アンケート

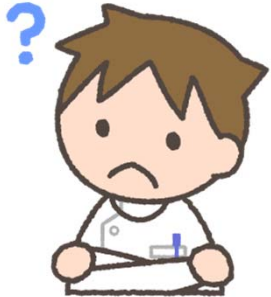
Q:溶液類(含タンパク質) (BSA含有PBSTなど) の使用期限は？

Q:溶液類 (不含タンパク質) (PBS、PBSTなど) の使用期限は？



<http://bioanalysisforum.jp/>

JBF 温度について (測定準備)



事例

検体の保存温度をどうするか悩みます。(-80℃、-20℃?)



考えうる要因・対応策

第一選択として-80℃で保存する。

無理な場合、委託者から指示された温度あるいは検体採取施設に合わせた温度で保存する。または検体採取施設で保存(例：-20℃)後、速やかに測定施設へ搬送し保存(例：-80℃)する。

安定性として

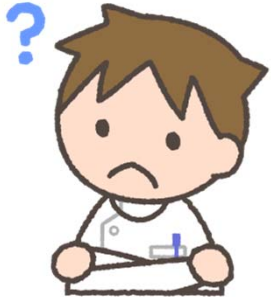
- ・各施設の温度条件の安定性をそれぞれとる。
- ・検体採取施設の保存条件に合わせた安定性をとる。
- ・並行保存QC試料を用いて確認する。

DGからの一言

DG内では検体採取施設での保存条件に合わせた保存を行うという意見が多かったです。



バリデーションについて (測定準備)



事例

重要試薬、キットのLot変更のパーシャルバリデーション (PV) をどの項目まで確認するべきですか。



考えうる要因・対応策

重要試薬、キットLot変更のPV項目 (アンケート上位3項目)

- ①再現性 (真度、精度)
- ②検量線
- ③選択性

安定性以外すべての項目という意見もあり。

※標準物質のLot変更の場合

(検量線の新旧比較→旧検量線で解析し新検量線を真度で評価
: ±20%以内)

DGからの一言

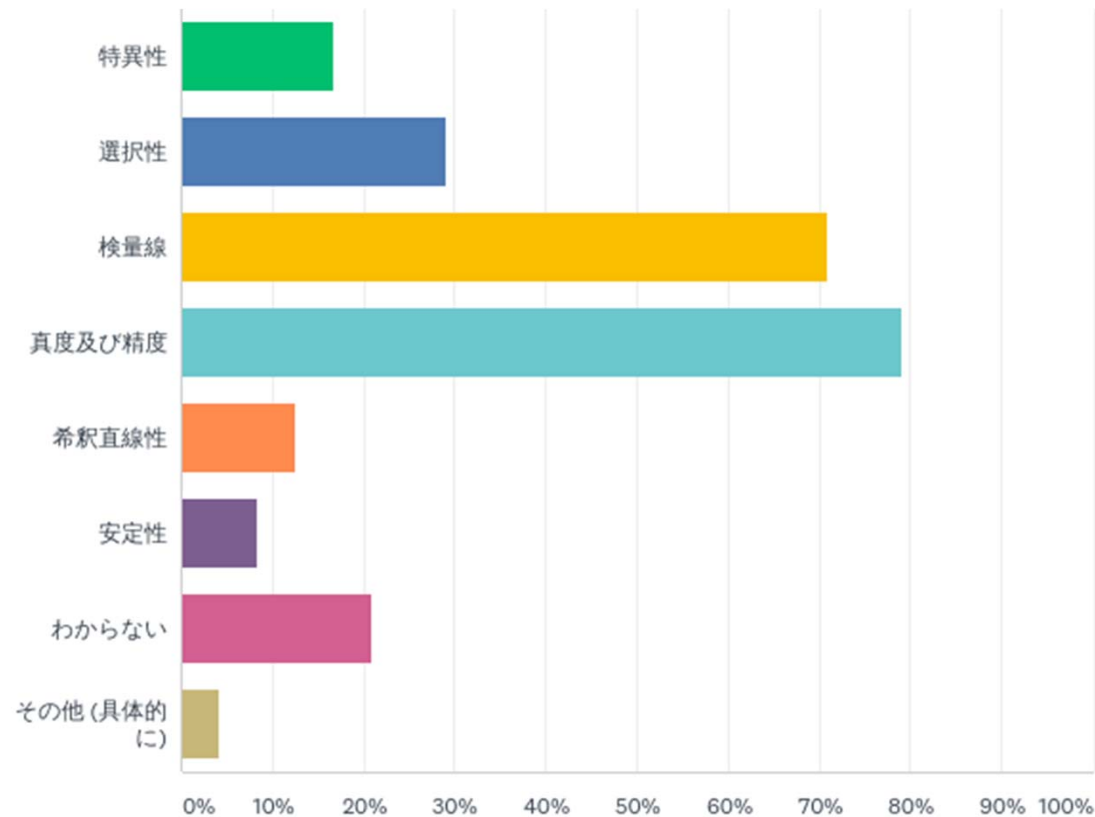
DG内では試験担当者変更も含めて検量線と日内再現性で確認する意見が多かったです。DG2014-12 (LBAを用いる定量) も是非ご参照ください。





バリデーションについて (測定準備) アンケート

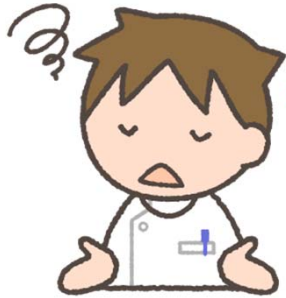
Q:重要試薬やキットのLot変更の際のパーシャルバリデーションの項目は？(複数選択)



<http://bioanalysisforum.jp/>



メソッド開発について①(測定準備)



事例

感度向上のためMRD(希釈倍率)を下げたいがsample量が厳しい...

考えうる要因・対応策

- ・ サンプル添加量が少なくて済む測定機器に変更する。
- ・ プレート変更 (ハーフプレート、384-wellなど) によりサンプル添加量を少なくする。
- ・ 系の最適化により感度を上げ、MRDを下げない条件を検討する。
- ・ 検討や規制外、参考データとして測定する場合、シングルで測定する場合もある。
- ・ 動物数を増やして検体量を増やすように最初に計画する。

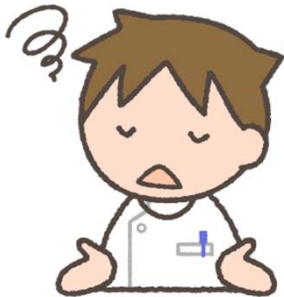


DGからの一言

可能な手段でまずは検討してみてもどうでしょうか。



メソッド開発について②(測定準備)



事例

MRDの設定判断に迷います。



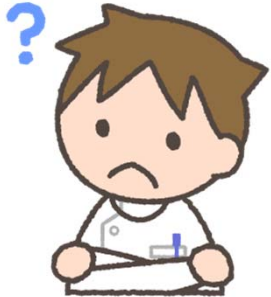
考えうる要因・対応策

- ①MRDを低倍率～高倍率にかけて振ってみて、s/n比を比較して選ぶ。
- ②感度及び個体別のシグナルのバラつき(選択性)のバランスを確認する。
- ③求められる感度が得られる希釈倍率から、倍率を大きくすることが望ましい。
- ④キットの説明書、論文を参考にする。

DGからの一言

MRDが低いと高感度が得られますが、一方でマトリックスの影響を受けやすいです。
バランスを見ながら最適なMRDを決定するのが良いかもしれません。





事例

バッファー検量線の場合、代替マトリックスとして何を用いていますか。測定法開発段階でどんな対応をしていますか。



考えうる要因・対応策

代替マトリックス

タンパク (BSA、カゼイン、二次抗体由来動物の血清など) 含有バッファー

- ・界面活性剤 (例: Tween)、キレート剤 (例: EDTA)、有機溶媒 (例: DMSO) 等を添加するケースあり
- ・NaCl/Na₂CO₃等の濃度を調整する ケースあり

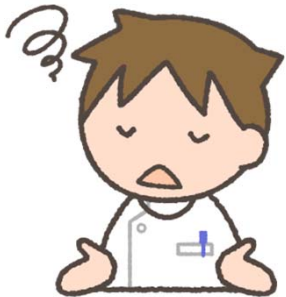
測定法開発段階ではマトリックス効果の低減を志向したアプローチを再現性 (添加回収) などで行い、実マトリックスとの差が±20%になるようにMRDや溶液組成などを検討する。

DGからの一言

過去のDGでもアプローチ法が取り上げられているので参考にしてください。(DG2015-15 内因性物質の定量(2))



メソッド開発について④(測定準備)



事例

ツール抗体によって大きく結果が異なってしまった。ツール抗体の選び方は？



考えうる要因・対応策

論文などで使用実績を確認したうえで市販のELISA用抗体ペアがあれば選択する。余裕があれば複数抗体を購入し、感度を確認する。ペプチドはエピトープの範囲が狭いので認識部位は購入前に確認する。

抗体の用途 (ELISA用、WB用など) は要確認。

DGからの一言

抗体は使用実績があり、安定供給できるメーカーより購入している施設が多いようです。キット・ツール抗体を購入するときのメーカーの決め方について記載いただいたアンケート結果を次のポスターに列挙いたしました。





キット、抗体を購入するときのメーカーの 決め方は？アンケート

価格、安定供給

購入、使用実績

経験から信頼のあるメーカーに決める。

怪しいメーカーであっても入手可能なメーカーは順次試す。

使用実績ならびにCoAの内容

信頼性

使用経験

安定的な供給、試験で使用実績あり

使用経験があり、過去に特にトラブルのなかったメーカーから基本的を選択する。

経験上信頼性の高いメーカーを優先する。

使用実績があるメーカー

第一選択はXXXX

知名度、口コミ

過去の経験、情報の豊富さ

論文など公知情報、過去の経験

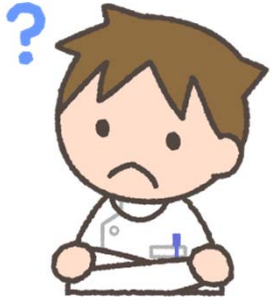
社内の使用実績を参考にして選択

複数種類購入して最も良いものを選ぶ

納期、価格

有名どころ

メソッド開発について⑤(測定準備)



事例

抗体を固相化する際のbufferはどのように選択する？

考えうる要因・対応策

- ①中性buffer (PBS、TBS)
- ②炭酸buffer (pH9)



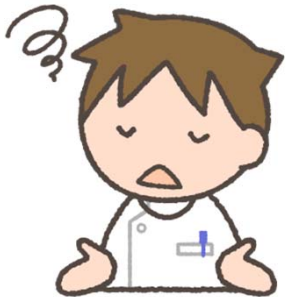
IgGの等電点付近のbufferを選択すると固相化しやすい傾向があるが、固相化するタンパクの種類によっては変性し、高バックグラウンドの原因になるケースもある。使用するプレートの性質にも依存するため、ケースバイケースで比較検討すると良いと考える。

DGからの一言

DG内では基本は中性buffer (PBS、TBS) で固相化し、委託者指定や問題がある場合にpHが高いbuffer (炭酸buffer) を用いるケースが多かったです。



メソッド開発について⑥ (測定準備)



事例

溶液の微量分取の下限はどうしてありますか？測定の再現性などが気になるのです。



考える要因・対応策

DG内では可能であれば10 μ Lという意見が多かった。

アンケートでは

①5 μ L、②10 μ L、③2 μ L (最小量は0.5 μ L)という意見が出ていた。

分取時の誤差も考慮して余裕があれば10 μ Lを設定し、使用量を抑えたい場合は2 or 5 μ Lまでに抑える方が好ましい。

DGからの一言

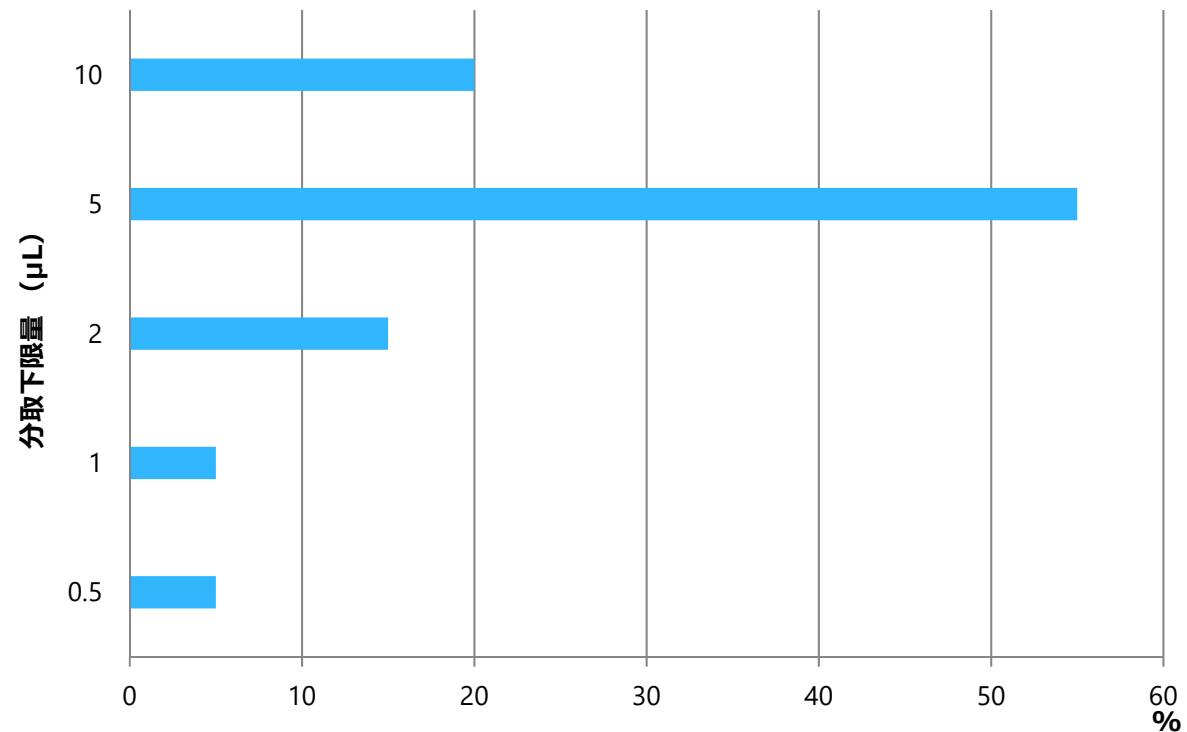
分取量が少なすぎると初心者と熟練者で差が出やすいのでばらつかない量を設定した方がいいですね。





メソッド開発について⑥ (測定準備) アンケート

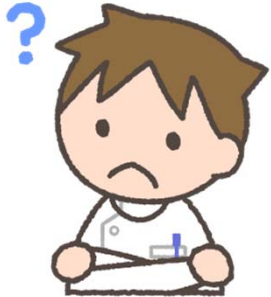
Q: 試薬微量分取の下限量は？



<http://bioanalysisforum.jp/>



メソッド開発について⑦(測定準備)



事例

重要試薬の小分け量はどのくらいが適切ですか？
また保存容器はどうしていますか？



考える要因・対応策

アンケートでは最低保存量として10 μL の回答が多かった。溶液の微量分取の下限の主な回答が5 μL であったので妥当な設定だと考えられる。

保存容器は500 μL PPチューブ (PCRチューブ含む) に保存する回答が多かった。
保存時の蒸発防止のためパラフィルムを巻く回答は少数であった。

DGからの一言

DG内で小分け量は、7 μL : 1、10 μL : 3、13 μL : 1という回答でした。

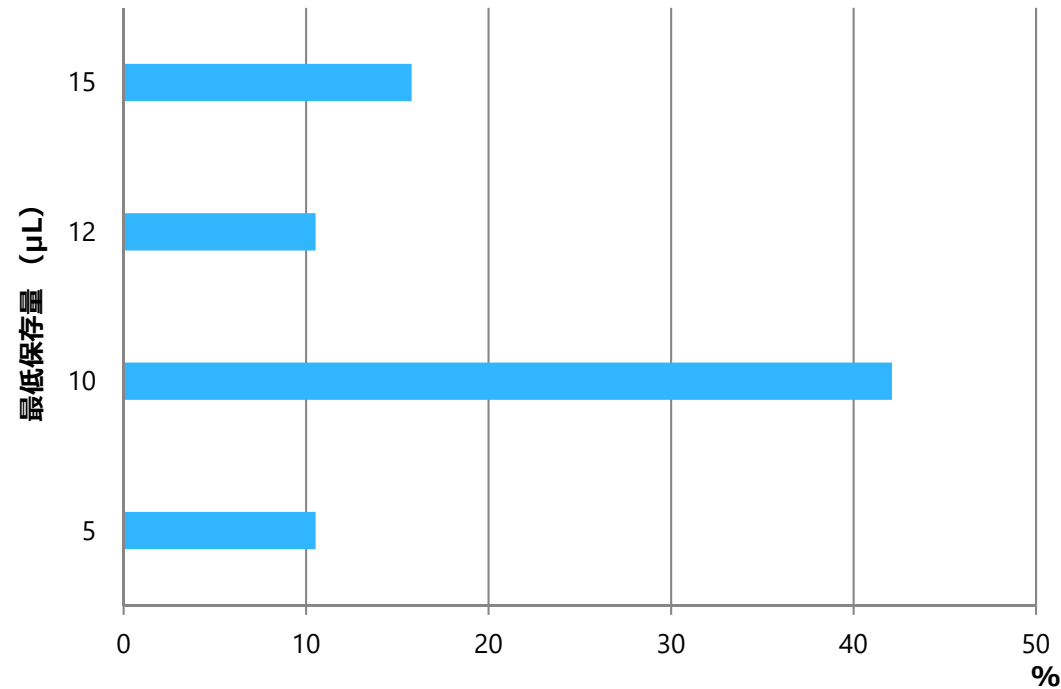


<http://bioanalysisforum.jp/>



メソッド開発について⑦(測定準備) アンケート

Q:重要試薬の小分け時の最低保存量は？



DGからの一言

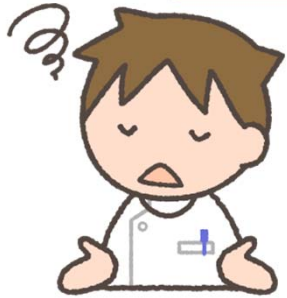
他回答として

1、20、30、50 μLが挙げられていました。



<http://bioanalysisforum.jp/>

メソッド開発について⑧ (測定準備)



事例

必要な感度が得られません。

考える要因・対応策

- ①MRDの変更、検量線レンジを変更する。
- ②シグナルが低いのであれば結合試薬を変更する。
- ③結合試薬が内在性因子への交差性を持つと感度が出ない。サンドイッチの組み合わせを変更する。
- ④バックグラウンドが高いのであればバッファー組成などを変更する。
- ⑤インキュベーションの温度を上げる。
- ⑥インキュベーション時間を長くすることでツール抗体とアナライトが接触する確率が上がる。



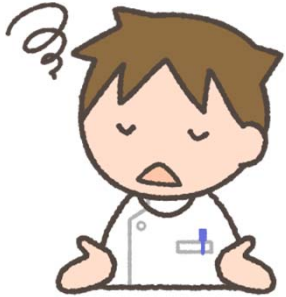
DGからの一言

③について、DG内で次のような測定法の変更で改善したという意見がありました。

抗原固相-drug-抗イディオタイプ抗体 (ビオチン) でバックグラウンドが高値であったのが、アビジンプレート-抗イディオタイプ抗体 (ビオチン)-drug-抗原 (ルテニウム) にしたらバックグラウンドが下がった。



メソッド開発について⑨(測定準備)



事例

ADAのブリッジングアッセイが構築できません。

考えうる要因・対応策

- ・陽性対照の交差性除去が不十分である。
- ・標識部位の問題等でdrugの抗原性(抗抗体への反応性)が失われている。
- ・ブリッジング阻害する内在性因子がある。



DGからの一言

ブリッジング法が不可能ならば、ステップワイズのサンドイッチにすると改善するかもしれません。





その他事例1 (測定準備)

・ Tweenの保存や作成頻度どうしてですか？ (プラ容器で長期保存すると割れる)

→ガラス瓶で保存、長期保存しない。

・ バッファのコンタミ防止に防腐剤を入れてもいいですか？

→防腐剤の毒物としての取り扱いが厳しくなってきた事もあり、防腐剤は添加せずに、冷蔵で短期間 (1W~2W程度) で使用する事例が多い。

・ ブランクマトリックスの凍結融解を許容していますか？

→DG内では測定対象が含まれていないことが前提なので凍結融解を許容しているとのコメント。

・ 検量線試料は低分子測定のように標準溶液を作成してマトリックスに添加していますか？

→LBAの検量線試料は低分子測定と異なり用時調製なので、標準溶液を作成せずマトリックスや希釈したマトリックスで段階希釈にて検量線試料を作成するケースが多い。



その他事例2 (測定準備)

- ・ **分析法を外部へ技術移管する際に問題が起こります。**
検量線のカーブが寝た形になってしまう、測定機器が違う。
 - 定量範囲を変える。
 - 手技や環境が違う (添加、混合具合、室温など)。
 - 現場に行って状況確認、技術指導など

- ・ **タンパク質のラベル化効率が非常に悪いです。**
 - buffer中に阻害要因がある可能性がある。
 - ラベル体のモル比をあげる。
 - 脱塩カラムで被標識体のバッファー置換をする (被標識体のpHなど至適条件に合わせる)。
 - ビオチン標識率測定のためHABA-Avidinと混合すると凝集して標識率が見た目高くなるケースもある。



トラブル事例のカテゴリー

測定系の選択、構築

測定準備

測定中

- ◆ マトリックス干渉について
- ◆ 測定のヒト間差について
- ◆ 反応条件について
- ◆ 洗浄について
- ◆ 抗体のロット変更について
- ◆ シグナル異常について(ADA Titering assay)

測定結果

data解析

全般的(その他)

<http://bioanalysisforum.jp/>

マトリックス干渉について (測定中)



事例

マトリックス干渉を避けるための有効な方法がありますか？



考えうる要因・対応策

マトリックス中のタンパク質や脂質等による干渉に対する対応として、DG内では以下のような意見が出された。

- ・MRDを上げる。
- ・非特異的吸着が起こらないように希釈液を工夫する。(界面活性剤の濃度を上げる。塩濃度を上げる等。)

DGからの一言

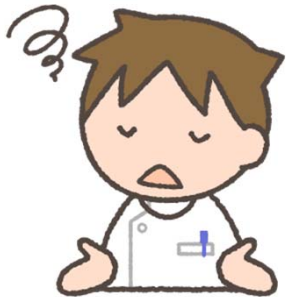
・MRDを上げられるような測定系を構築することが重要かもしれませんが、マトリックスを含む溶液の中で何が起きているのか、系統的な検討が出来ると良いのですが・・・





測定のヒト間差 (ピペッティング) について

(測定中)



事例

測定値に個人差があり、プレートへの添加量の差が原因と考えられます。何かよい解決策はないでしょうか？



考える要因・対応策

ピペッティングに個人差がでることが原因の一つ。

DGでは以下のような意見が出された。

- ・ SOPで基本となるピペッティング法を定めている。
- ・ 試験内でピペッティング法を統一している。
- ・ 操作内容によってピペッティング法を統一している (プレート添加はリピート法等)。

DGからの一言

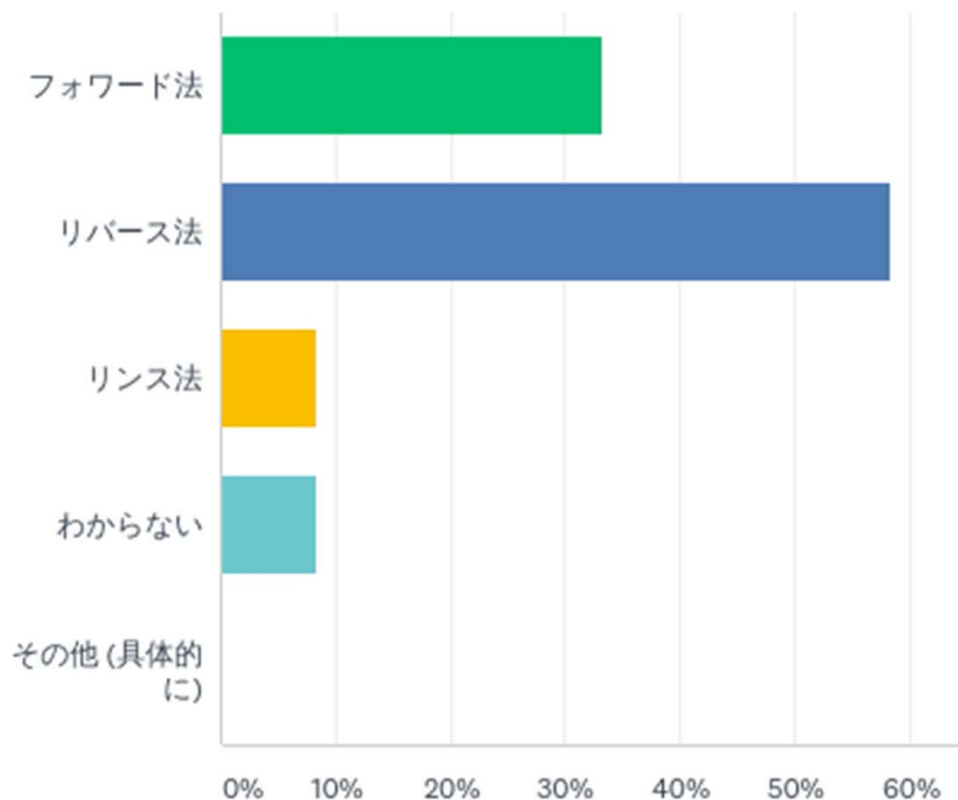
試験内でピペッティング法を統一することで個人差をある程度抑えることができると考えます。よく用いられるピペッティング法をアンケートで回答していただきました。DG2014-12 (LBAを用いる定量) でのピペッティングの議論もご参照ください。



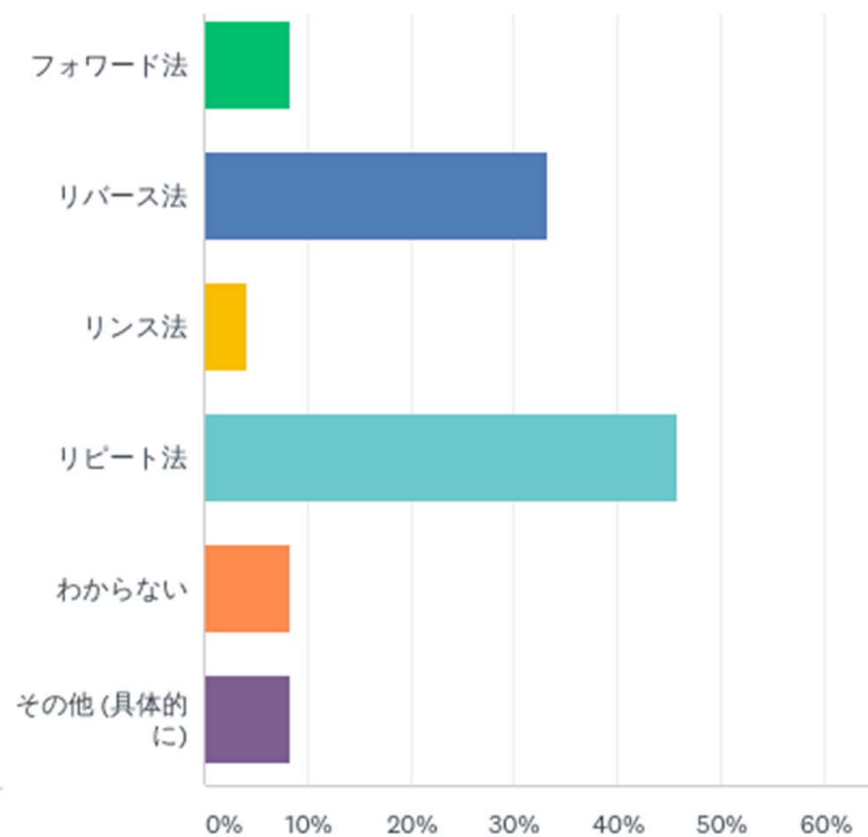


ピペッティング方法について (測定中) アンケート

Q: 検量線やQC溶液調製



Q: プレート全面添加



<http://bioanalysisforum.jp/>

測定のヒト間差 (その他) について (測定中)



事例

- ・分析者によりベースラインに差が出る場合があります。
- ・判定基準の範囲内であるが、ヒト間のばらつきが懸念される結果が得られました。



考えうる要因・対応策

- ・手技、時間、環境の違い
- ①洗浄後試薬を添加するまでの時間やウォッシャーから実験台までの距離を統一する。
- ②試薬添加スピードやプレートの攪拌状況が大きく異ならないか確認。
- ③洗浄後のパッティングの力加減や回数を統一する。
- ④実験台位置の違いによる温度差がないか確認。

DGからの一言

- ・細部まで分析者間で操作や条件を合わせる工夫をしてみましょう。
- ・LBAは誤差の出やすい測定系のため、基準の範囲内であれば問題無いと考えます。
- ・ヒト間差低減のための自動化も今後進んでいくかもしれません。
- ・dataのヒト間差についての意見を付箋紙等でコメントをお願いします！





フロアからのご意見を募集します！

dataのヒト間差について、ご意見よろしくお願ひします。

<http://bioanalysisforum.jp/>

反応条件について (測定中)



事例

LBAで反応時の温度や時間をどうするかで迷っています。



考えうる要因・対応策

DGでは以下のような意見が出された。

- ・ 室温、1~2時間で行うことが多い。
- ・ 冷蔵、終夜で反応させることもある。
- ・ 場合によっては37°C、1~2時間で行うこともある。

DGからの一言

室温、1~2時間を基本として必要に応じて冷蔵、終夜や37°C、1~2時間を採用してみても如何でしょうか。

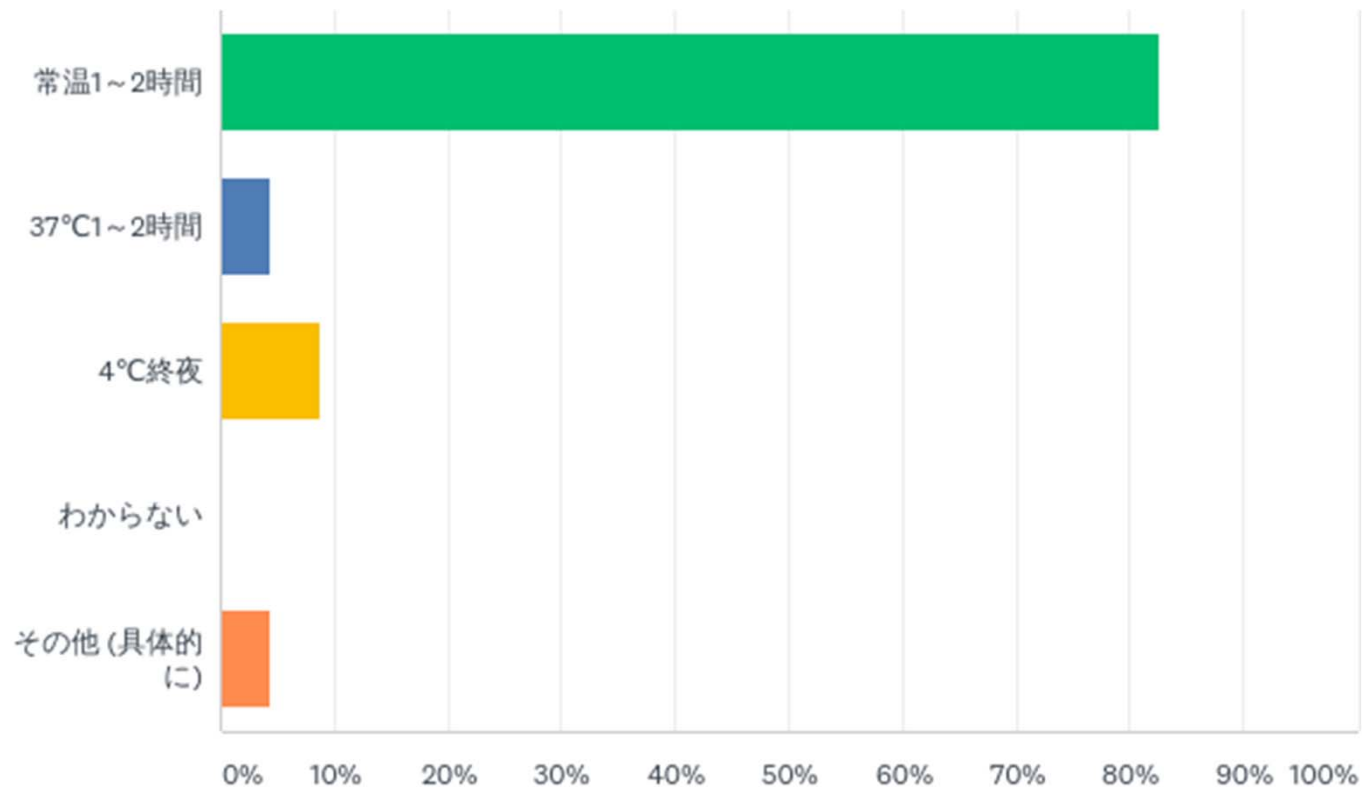
アンケート結果でも室温、1~2時間が基本となっているようです。





反応条件について (測定中) アンケート

Q : ELISAやECL測定時のアナライトの反応温度、時間の基本は？



<http://bioanalysisforum.jp/>

反応中の攪拌について (測定中)



事例

反応中の攪拌で多少ばらつきが抑えられるケースがありますが、攪拌し続けることでなにか悪いことはありますか？



考える要因・対応策

DGでは以下のような意見が出された。

- ・ウェルに200 μ L入れたあとの攪拌でプレートシールまで溶液がべったり来てしまったことがある。溶液量が多い時は低速を推奨する。
- ・incubation中の攪拌でwellの中心部の反応が低くなったという話は聞いたことがある。いずれにしても攪拌速度には注意。

DGからの一言

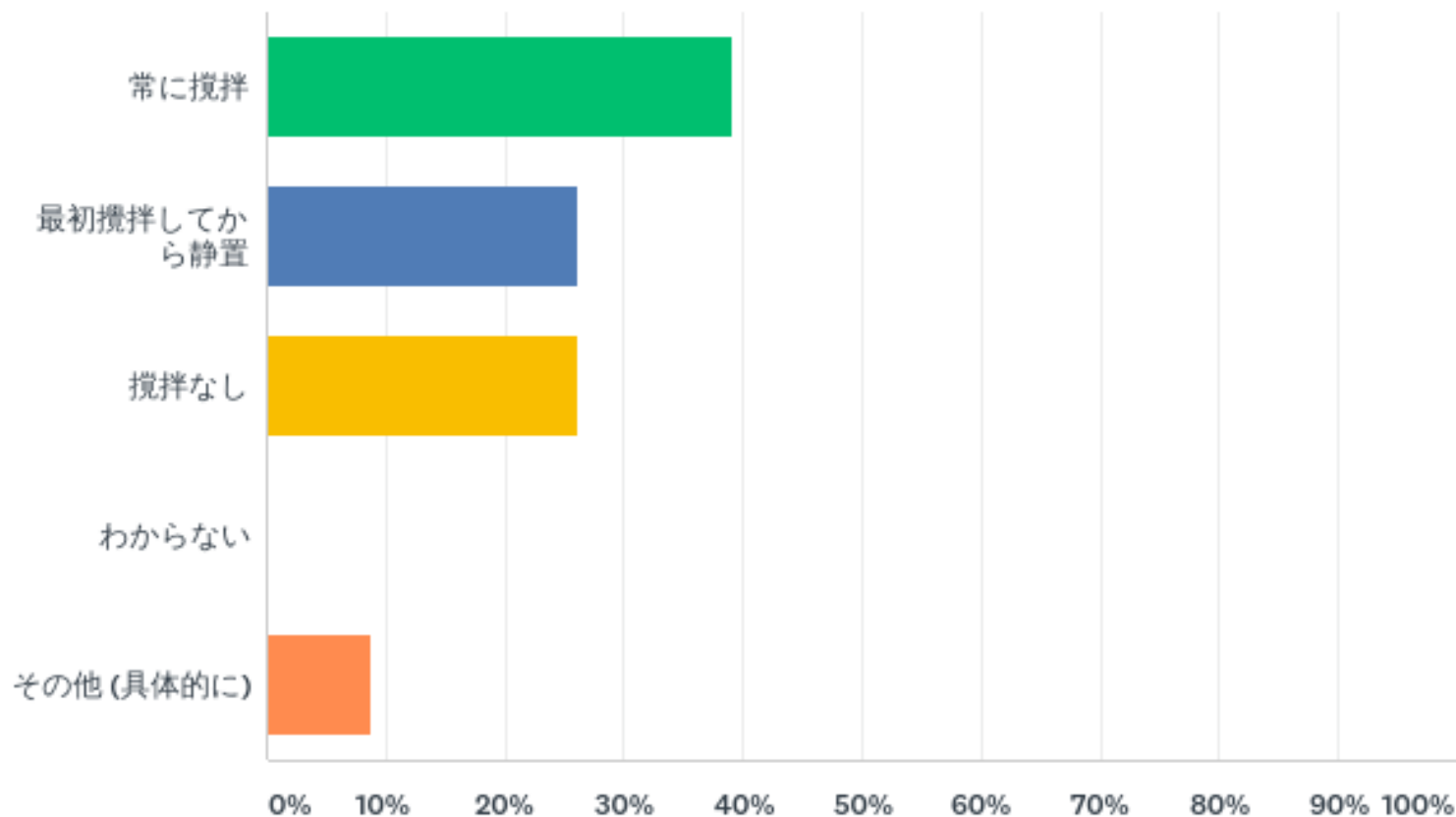
統一性がないと再現性に問題がでる可能性があります。攪拌するしないは予め決めておきましょう。
反応中の攪拌操作についてアンケートでご回答いただきました。





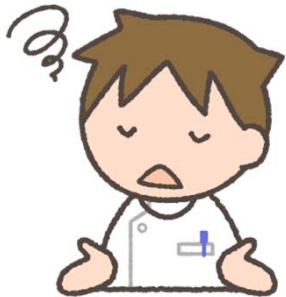
反応中の攪拌について (測定中) アンケート

Q: 反応中の攪拌操作の基本は？



<http://bioanalysisforum.jp/>

JBF 洗浄頻度について (測定中)



事例

洗浄頻度が低いとバックグラウンドが上がり、高いとsignal値の低下が起きてしまいます。



考える要因・対応策

DGでは以下のような意見が出された。

- ・ ツール抗体を変更する等頑健性の高い測定系を再構築する。
- ・ 洗浄回数、洗浄後のwait時間を最適化する。
- ・ 洗浄方法を変更する (ウォッシャー、手動洗浄等)。

DGからの一言

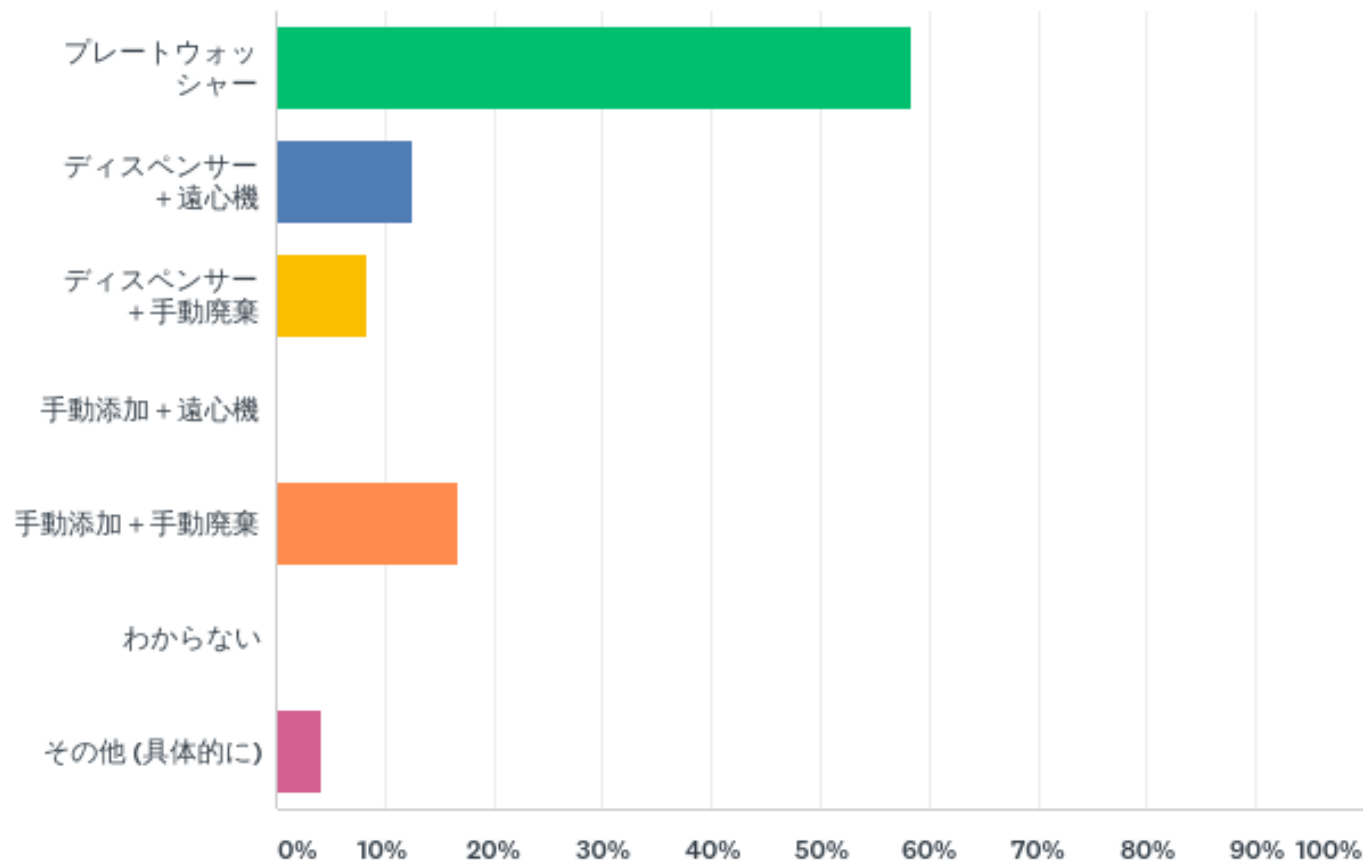
アナライトとツール抗体の特異性が高く、結合が強いときは余り気にする必要がない印象です。頑健性の強い測定系の構築が重要だと考えます。洗浄方法についてアンケートで調査しました。





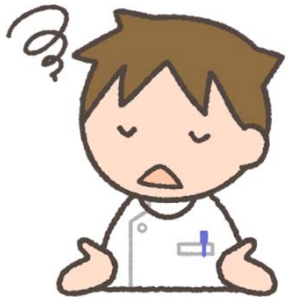
洗浄頻度について (測定中) アンケート

Q: プレートの洗浄方法は？



<http://bioanalysisforum.jp/>

洗浄液の劣化について (測定中)



事例

洗浄液が白濁してしまいました。



考えうる要因・対応策

- ・ 洗浄液に菌またはカビが繁殖した。

DG内では対策としては以下のような意見が出された。

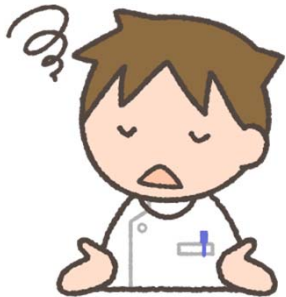
- ・ 洗浄液の保存温度、使用期限に注意を払う。
- ・ ウォッシャーのノズルを直接保存ビンにつけない。
- ・ 防腐剤を加える。

DGからの一言

保存温度、使用期限が重要だと考えます。
(測定準備 試薬について③ アンケート参照)



抗体ロットの変更について (測定中)



事例

市販の抗体のlotが変わったらバックグラウンドやsignalの出方が変わってしまいました。



考える要因・対応策

- ・抗体のlotにより反応性が異なる(特にpolyclonal抗体)。

対策としては以下のような意見が出された。

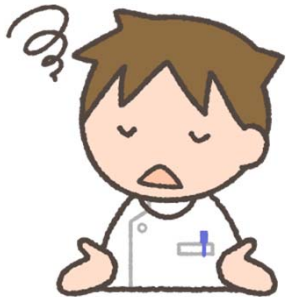
- ・lotが切り替わらないように手配する。
- ・新しいlotで再現性をとってやり直す。
- ・よいlotの抗体があればストックしておく。

DGからの一言

・抗体lotの変更によりsignal等が変化したことはDG内でもかなりの人が経験しています。lotの変更がないように手配しておくことが安全だということになりました。



シグナル異常について (ADA Titering assay) (測定中)



事例

ADA Titer assayにおいて内在薬物の影響で希釈倍率に対応したシグナル推移が得られませんでした (シグナルの異常推移)。



考えうる要因・対応策

DGでは以下のような意見が出た。

- ・ 希釈でシグナルが増加することはしばしばある。力価が得られなかった場合希釈段階を伸ばして再分析する。
- ・ シグナルがプラトーになることはよく経験する。
- ・ drugがまだ存在しているが、ADAの量が多いことで陽性になっている状況かもしれない。希釈するとADAが薬物から解離しやすくなることが要因かも。

DGからの一言

希釈倍率を伸ばしていくことで内在性薬物の影響を軽減できる可能性があります。





トラブル事例のカテゴリー

測定系の選択、構築

測定準備

測定中

測定結果

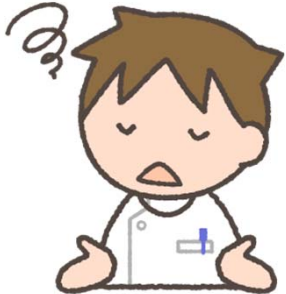
- ◆ 二重測定のバラつき
- ◆ フレート内のバラつき
- ◆ フレート間のバラつき
- ◆ 測定結果全般に関するトラブル

data解析

全般的(その他)

<http://bioanalysisforum.jp/>

二重測定の変らつき (測定結果)



事例

デュプリケートがバラつきます。



考えうる要因・対応策

①結合が外れやすい測定系である (例：ペプチド等)。

→コーティング方法を工夫する (例：ペプチドをアルコール溶媒に溶かして乾燥させる。)

②固相化抗体のコーティングが上手くできていない。

→攪拌操作でwell内に均一に伸ばす。

→ECLスタンダードプレートは伸びにくい。(バッファーでのプレウエットで改善する。)

③酸処理の場合、pHにムラがある。

→混液が均一になるようにしっかり攪拌する。

④添加時間や添加順番に差がある。

→常に同じ方向に添加する。

(例：8連又は12連ピペットの使用をどちらかに固定する。)

→測定機器の測定順序に従って添加する。

(例：ECLは左下部から中心にかけてとぐるを巻くように添加する。)

⑤ピペット操作

→添加量の正確性よりも一定さを重視する。(リピート法で添加する。)

二重測定の変らつき (測定結果)

(続き)

⑥洗浄方法にムラがある。(例：特にHRP添加後の洗浄で顕著)

→ ウォッシャーを使用する。

⑦ほこりや繊維などのごみ

→ パッティング方法を工夫する。ほこりの出にくいタオル (例：キムテックス) を使用する。

⑧検量線が寝ている。シグナルから濃度に回帰した時に大きな差となる。

→ CVの評価方法は濃度でなく、シグナルで評価する。

⑨特定のwellが異常の場合、ウォッシャーのノズルが詰まっている。

→ ウォッシャーのメンテナンスをする。

⑩解析時にブランク補正をする。

⑪プレート自体の不良 (例：アビジンのコーティング不良、電極のはずれ)

⑫多重測定数を増やし、棄却検定する。(非規制下)

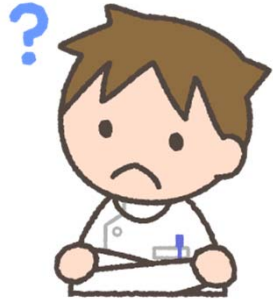


DGからの一言

二重測定の変らつきの原因や対応策は測定法の各ステップに多くあります。ピペット操作など手技だけでなく、視野を広げて考察してみてください。



二重測定バラつき (Gyrolab) (測定結果)



事例

- ・ Gyrolabによる測定の際にバラつきが大きかったため、n数を可能な限り増やして対応しました。
- ・ CVが大きくなってしまい、解決法が見当たりません・・・
- ・ はね値が出た時の対処方法はどのようにしていますか？



考えうる要因・対応策

- ① Alexaラベル体の凝集 → 遠心操作をする。
- ② ニードルの詰まり → 測定前の洗浄と測定後のアルカリ洗浄を実施する。きつめのデタージェントを使用する。

DGからの一言

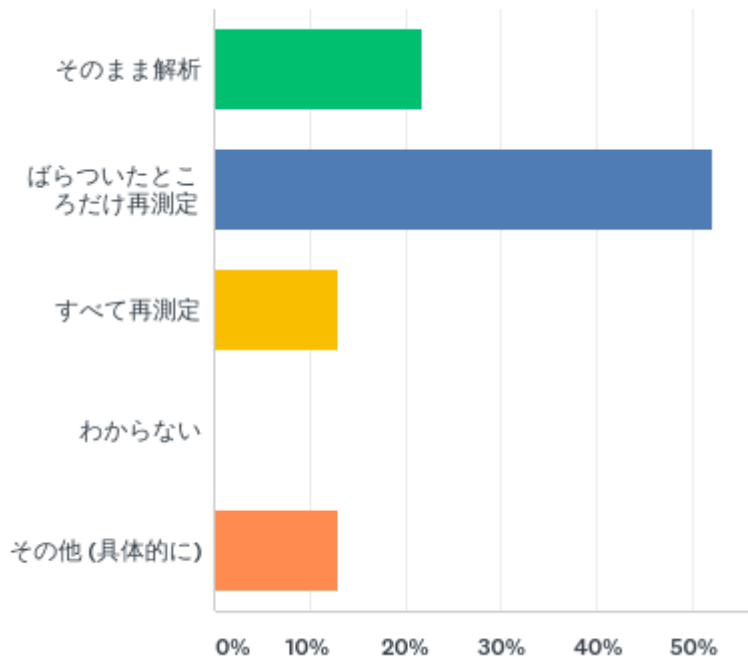
参考としてViewer等で視覚的に確認するといいでしょう。個別に棄却するかの判断材料になります。(非規制下)
DG2015-19での「Gyrolabにおける分析法構築」もご確認ください。



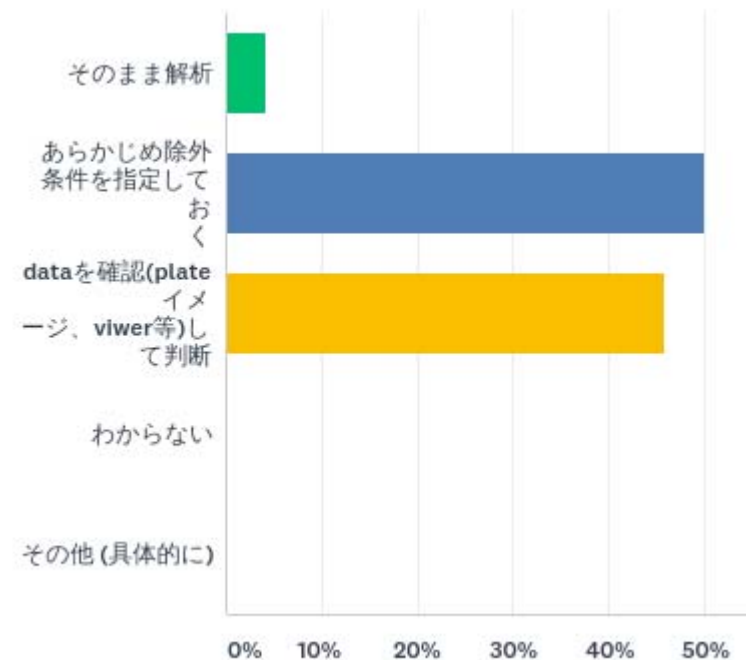


二重測定の変らつき (測定結果) アンケート

Q: 測定結果の変らつきが大きかった場合の対応 (非規制下)



Q: 測定結果に跳ね値が出た時の対応 (非規制下)



<http://bioanalysisforum.jp/>



二重測定バラつきに関するトラブル具体例

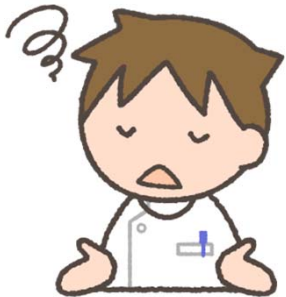
・濃度測定の定量下限未満、またはADA測定におけるcut point以下の検体において二重測定のCVが外れた場合、どのような対応をしますか？

- ①濃度測定：未希釈試料がBLOQの場合はCVが外れてもBLOQで採用する。
ADA測定：個別シグナルの両方ともcut point未満で外れてもNegativeとして採用する。
- ②LLOQ以下はCVの判定基準を緩くする。
- ③検量線にブランクを回帰しない。

・定量下限でバラつきます。検量線範囲を適正化すると良かったのですが時間がなくそのまま実測定してしまいました。

- ①測定の目的による。研究の初期段階はシビアに判定基準を設ける必要はないと考える。
- ②下限をアンカーポイントにして、参考値にする。

プレート内のバラつき (測定結果)



事例

- ・ドリフトの克服方法を教えてください・・・
- ・プレートの左側に置いたQCサンプルに比べて右側に置いたQCサンプルでは、signalが半分程度でした。



考えうる要因・対応策

プレート内で添加時間の差が大きくなったり、プレートが乾燥することでたんぱく質が変性する可能性がある。

- ①プレートウォッシャーのニードルのaspiration positionを上げる。
- ②洗浄してから添加までプレートシールを貼って置く。
- ③湿ったワイパーを入れたタッパーに入れておく。
- ④素早く添加する。8連や12連ピペットの使用する。

DGからの一言

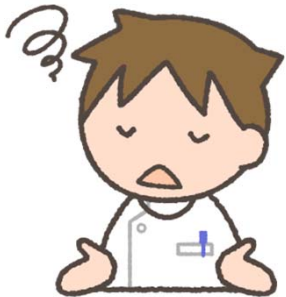
乾燥が原因のドリフトは冬場に起こりやすいです。

またプレートの端は乾燥しやすいので注意が必要です。

DG2015-18での「トラブルシューティング」でも触れていますのでご確認ください。



プレート内のバラつき (測定結果)



事例

エッジ効果起きてプレート内でバラつきます。

考えうる要因・対応策

①乾燥 (ドリフトの項目参照)

②温度。冷たい試薬溶液を添加することでプレートが冷える。プレートの中心部では温度が戻りにくい。

②への対応策

- ・添加試薬は常温までしっかり戻す。2時間くらい前から室温に戻す。
- ・容器に移すときに大きい容器へ移す。
- ・冷えた抗原や抗体などのストックを少量とり常温のバッファーで希釈する。
- ・プレートシールを貼り温度ムラを解消する。

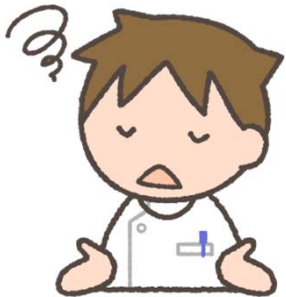


DGからの一言

ELISAで起こりやすいです。乾燥に加えて温度に注意しましょう。インキュベーション中の温度だけでなく添加試薬の温度がカギです。



JBF プレート間のバラつき (測定結果)



事例

ADAにおける日間のシグナルがバラつき再現性が得られません。



考えうる要因・対応策

- ①プレートや試薬のロット差
- ②試薬の劣化
- ③固相化が十分でない

DGからの一言

バリデーション実施時で、6回のうち1回おかしいならば、1回だけ再分析するという意見がありました。
またSignal ratioで評価してもいいでしょう。



<http://bioanalysisforum.jp/>



プレート間のバラつきに関するトラブル具体例

・バリデーションでは担当者間の差はなかったが、実試料分析で明らかに差が認められた。

→①バリデーション時と実測定時の気候の違いで、手技による影響が出てきます。

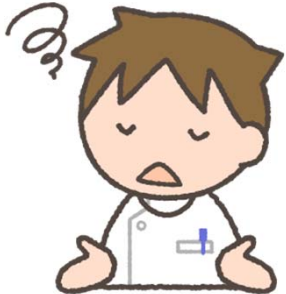
→②単純に慣れの問題の可能性もあります。

・測定ごとに検量線の吸光度が変わる (最高濃度の吸光度がAbsで1.2~3.0) ことがあった。QC試料は毎回基準内であったので結果は採用したが、室温、液温などはそれほど大きく違わないため原因がわからないままであった。

→温度に加えて、乾燥にも気を付けていた方がいいです。

ドリフトの項目をご参照ください。

測定結果全般に関するトラブル (測定結果)



事例

ADA測定で投与直後ポイントの測定値が上昇しました。投与直後では抗抗体は検出しないと思うのですが・・・



考えうる要因・対応策

- ・投与後に抗原濃度が上昇し、その抗原が遊離型で多価の場合抗抗体のように振舞うケースがある。実際に臨床試験でこのような現象が報告されている。
- ・CDRが異なる抗体などを用いて特異性を確認するような手法も考えられる。

DGからの一言

通常のブリッジング法だけでは評価は難しいです。例えば固相化にFab、検出に投与した種の抗Fc抗体を用いた系を使うのはいかがでしょうか。バリデーション内で抗原共存の影響を確認する場合があります。または測定系構築の段階で予め確認しておくとも良いかもしれません。





測定結果全般に関するトラブル具体例

- ・ 予想外の相互作用が起こった。(例：ヘパリン結合ドメイン)
→どのような物質を扱っているかを理解しておくことが鍵です。
- ・ 全自動ELISA装置を使用した測定系で、マトリックスの影響を検討したところBuffer条件と血漿条件の検量線レスポンスに乖離が見られた。乖離の程度の再現性が悪く、測定を重ねるごとにBuffer条件と血漿条件のレスポンスの乖離は小さくなり、最終的に重なった。
→原因として、ニードルや流路へのマトリックス成分の吸着が飽和した可能性が考えられます。



トラブル事例のカテゴリー

測定系の選択、構築

測定準備

測定中

測定結果

data解析

- ◆ アンカーポイントの設定
- ◆ 回帰式の選択
- ◆ 重みづけの選択
- ◆ フランク補正
- ◆ その他

全般的(その他)

アンカーポイントの設定 (data解析)



事例

アンカーポイントの有効性や設定の仕方、除外基準をどのように考えればいいのでしょうか？



考える要因・対応策

アンカーポイントは検量線のカーブフィッティングを向上させる目的で設ける。
シグモイダルカーブの端で傾きが小さくなり、回帰が安定しないようなケースに有効。

DGからの一言

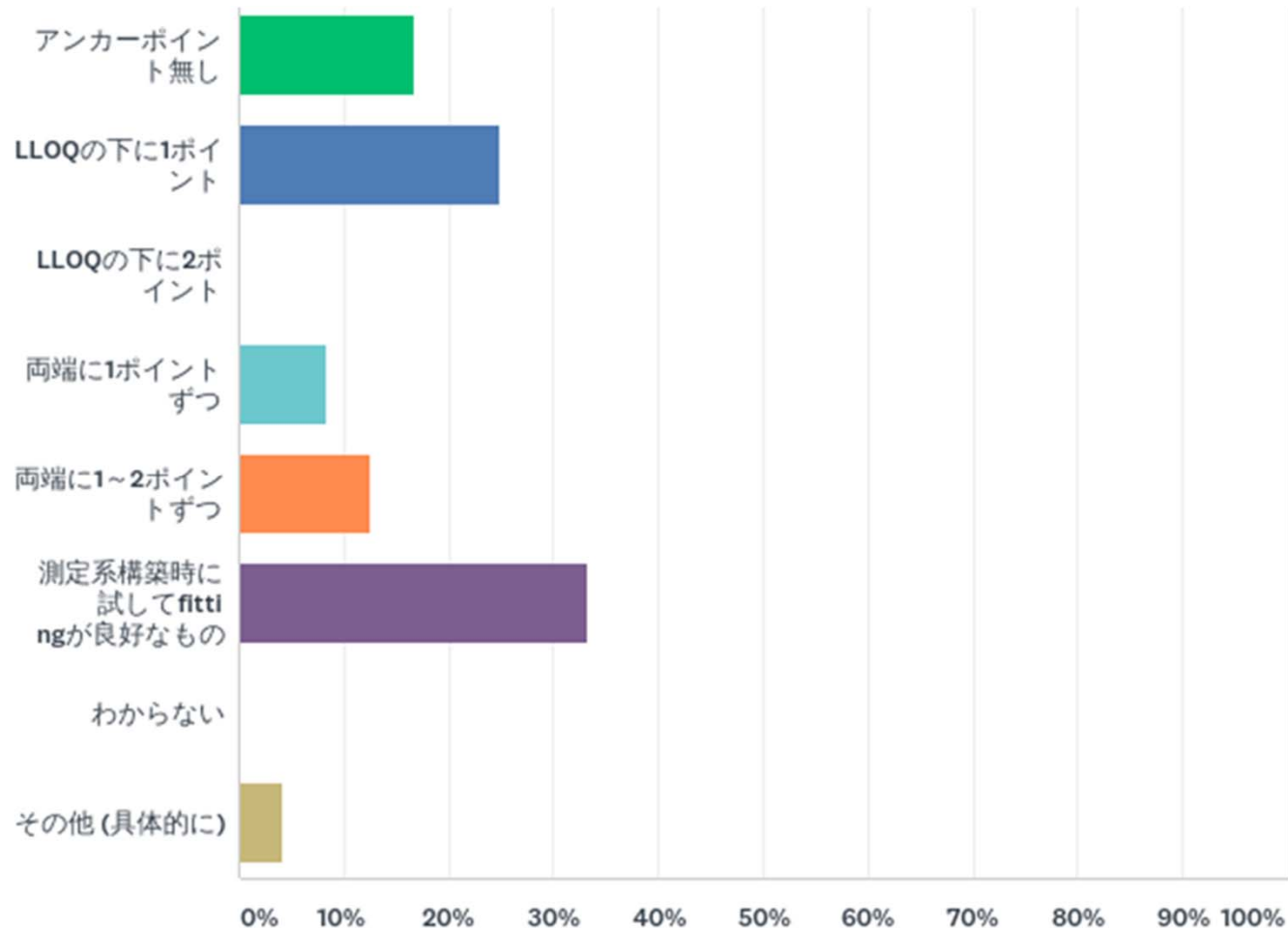
除外基準については、アンカーポイント自体には基準を設けませんが、アンカーポイントが高値または低値を示したことにより検量線の他のポイントが外れた場合は、アンカーポイントを除外して再解析する、などが考えられます。





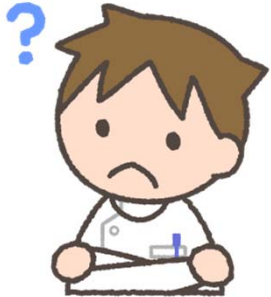
アンカーポイントの設定 (data解析) アンケート

Q: アンカーポイントの基本的な設定の仕方は？



<http://bioanalysisforum.jp/>

JBF 回帰式の選択 (data解析)



事例

検量線のCurve fittingに用いる主な回帰式は何を使えばよいでしょうか？ 4-parameter、5-parameterの選択方法はどうしていますか？



考えうる要因・対応策

基本は4-parameterで良いと考える。

4-parameterは点対称なシグモイダルカーブ、5-parameterは非対称なシグモイダルカーブに適している。

また、4-parameterは5点以上、5-parameterは6点以上が必要である。

シグモイダルカーブ非対称な場合は、固相化タンパク質の不足が原因のケースがある。

DGからの一言

検量線の形により適切なものは変わると考えられますが、DG内、アンケート結果いずれも4-parameterを主に利用しているケースが多いようでした。

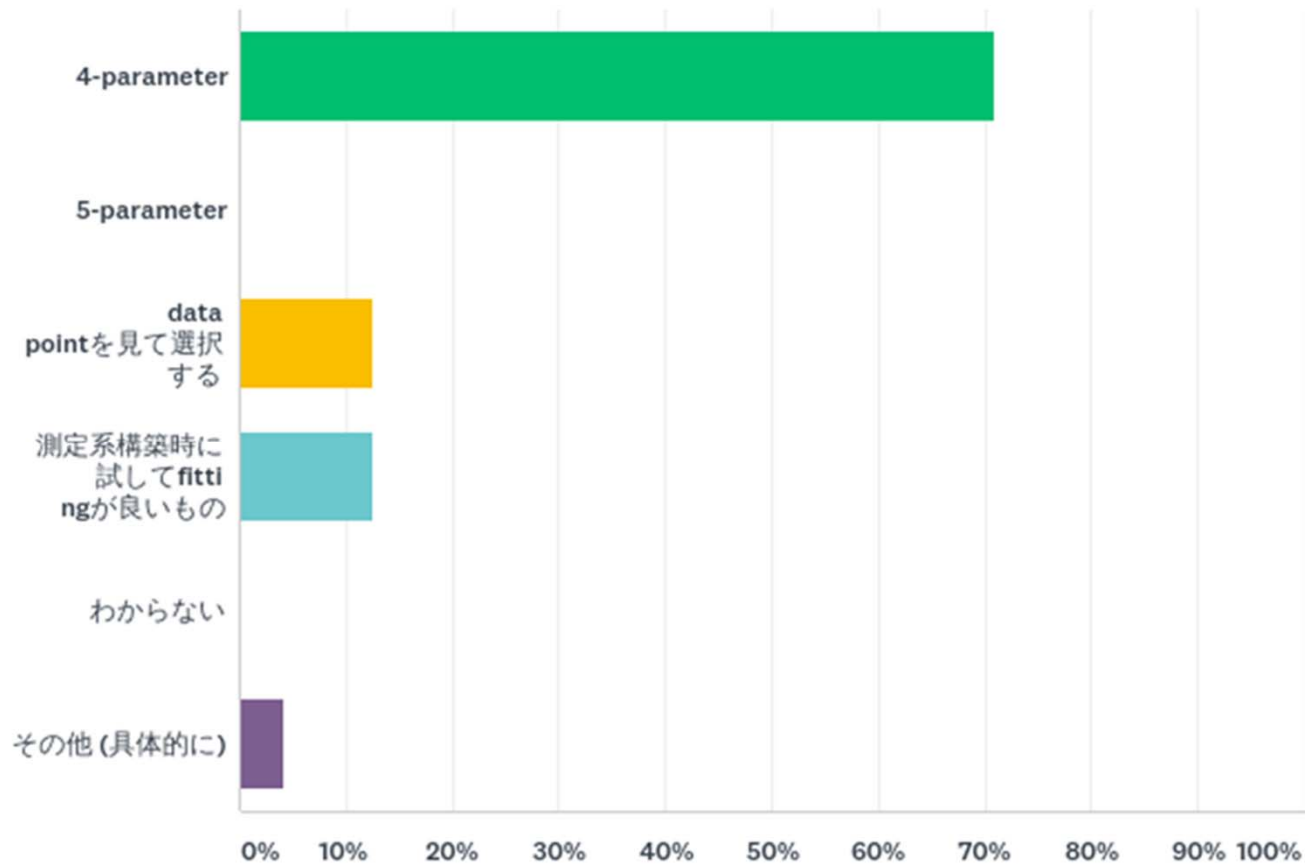


<http://bioanalysisforum.jp/>



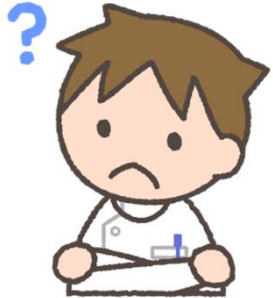
回帰式の選択 (data解析) アンケート

Q: 検量線のCurve fittingに用いる主な回帰式は？



4-parameterが圧倒的に多い結果となりました。

重みづけの選択法 (data解析)



事例

検量線の重み付け (Weighting factor) の定め方に一律の方法はありますか？



考えうる要因・対応策

LBAでは検量線のレンジが広く、シグナルのダイナミックレンジも広いことが多いため (特にECL)、重みづけをしないと低濃度側が外れやすい印象がある。

重み付けに関しては

<http://www2u.biglobe.ne.jp/~SATORU/A1data.pdf> (現場の濃度分析技術者のためのデータ解析の基礎知識)が参考になる。

DGからの一言

DG内では $1/Y^2$ の決め打ちや、いろいろ試して良いものを選ぶなど様々でした。

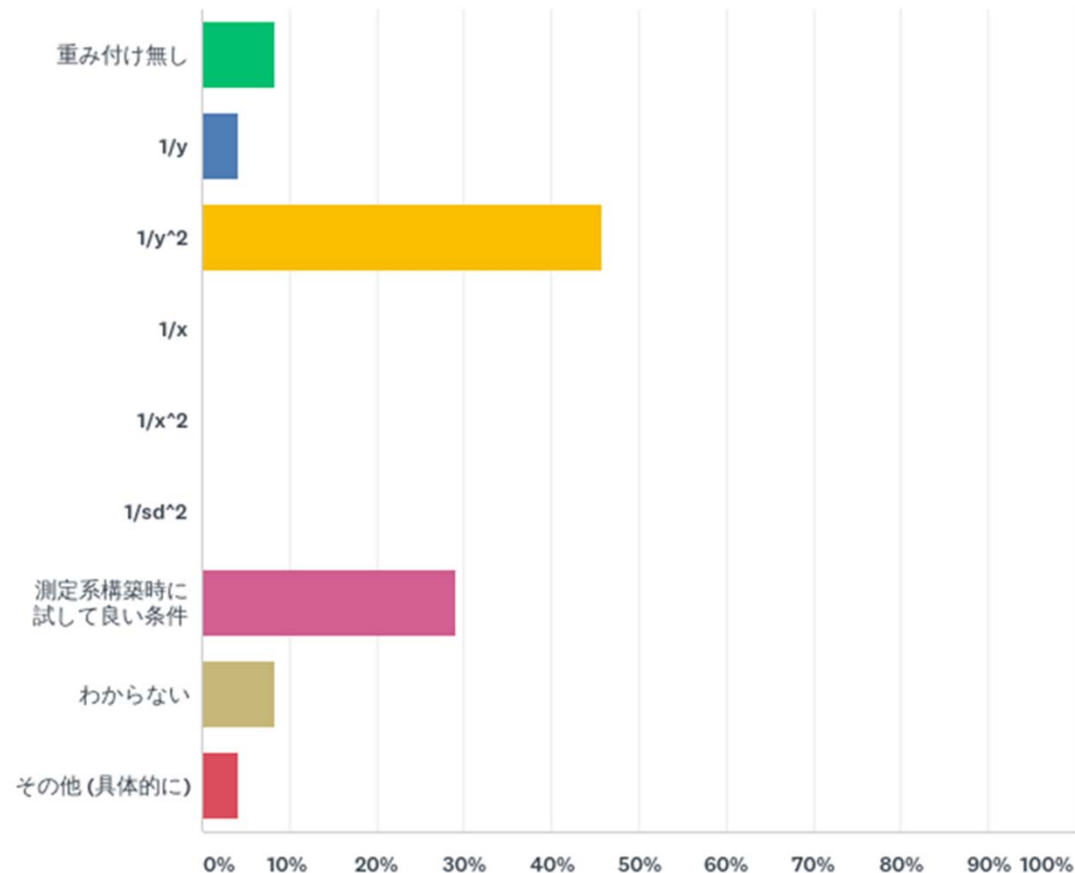
複数試す場合は、検量線の各点のREの絶対値の和の少ない条件を選択するやり方があります。





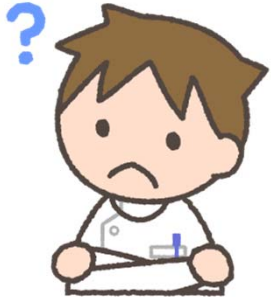
重みづけの選択法 (data解析) アンケート

Q: 主に用いる重みづけ方法は？



約半数が $1/y^2$ と回答しました。

JBF ブランク補正 (data解析)



事例

ブランク補正をする/しないの線引きをどう考えればよいですか？また補正する場合のブランク試料の二重測定の基準は？



考える要因・対応策

内因性物質の測定など、ブランクが高いシグナルを持つ場合はブランク補正を考慮する。
ただしマトリックス中の総量を測っていないことになる点に注意が必要。

ブランク補正する場合の基準はCV20%やDifference30%など他の試料と同等。

DGからの一言

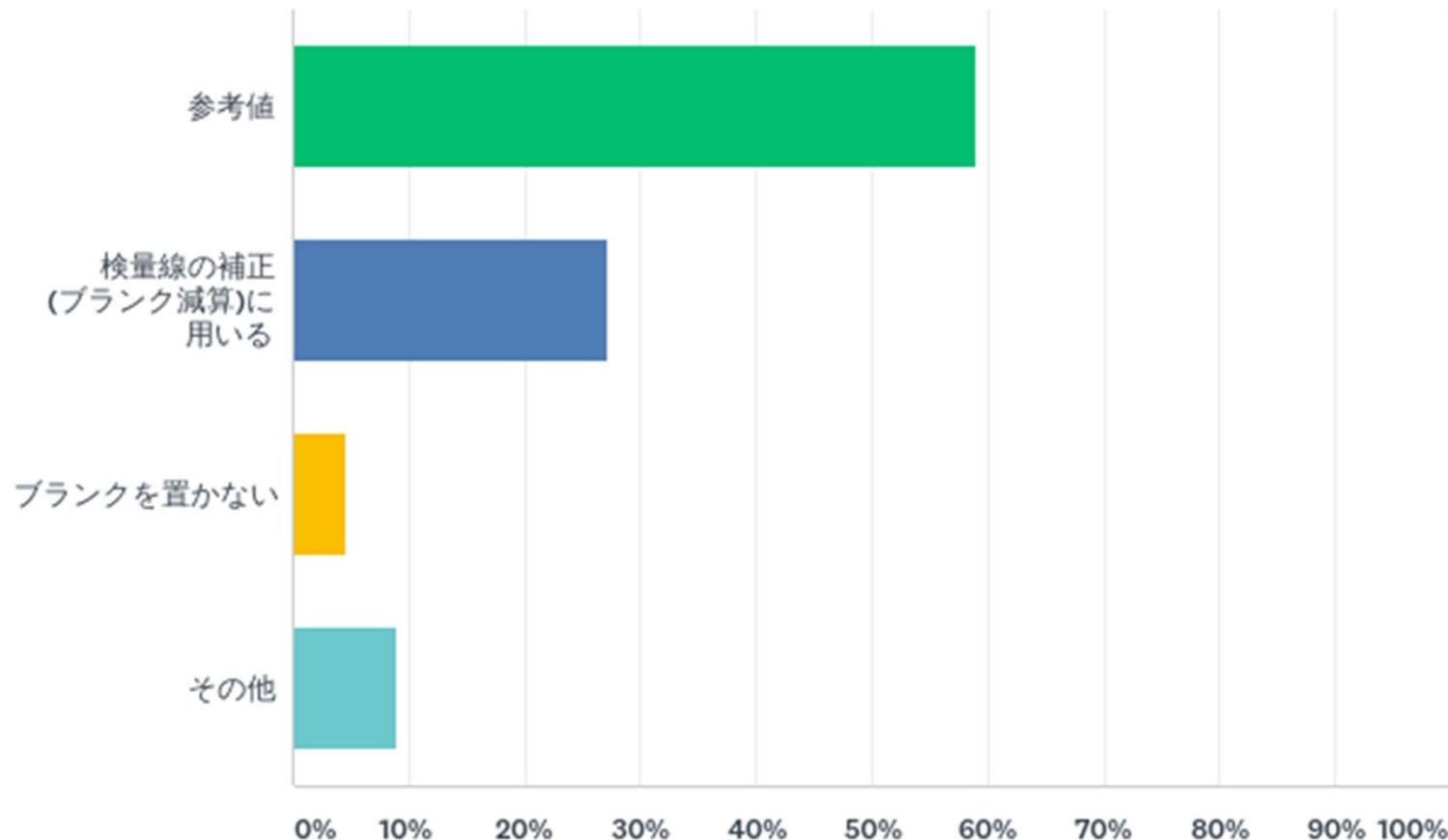
DG内では通常ブランク補正する：2、しない：4と分かれました。





ブランク補正 (data解析) アンケート

Q: ELISA、ECLでブランクはどのように扱っているか？



<http://bioanalysisforum.jp/>

過半数が参考値とする一方、3割ほどの方は検量線の補正に用いていました。

解析ソフトのバリデーション (data解析)



事例

メーカー保証等がない場合にソフトの解析パフォーマンスに問題がないか確認する方法はどうすればよいですか？



考えうる要因・対応策

- ・定期的にダミーデータを解析し、いつも通りの結果が得られることを確認する。
- ・導入時にCSVを取るがその後の確認は行わない、など。

DGからの一言

定期的確認でも導入時確認でも、どちらでも構わないと考えられます。ただし解析結果の妥当性を確認していることが望ましいとされているようです。





data解析に関するトラブル具体例

- ・クライアントからの指示で、LLOQの吸光度未満の外挿値を測定値として報告したが、不適切であったと思う。
→外挿値は報告するとしても参考値扱い。
- ・CROと解析ソフトが異なる。
→同様の解析結果が出れば問題ないを考える。
- ・検量線とQCの反応性が違ってクライテリアを満たさない。
→調製法や調製手技を検証する。
- ・マトリックス抽出物とリコンビナントペプチド (配列は同じ) のFitting curveが異なる。
→測定対象物の状態に合わせた検量線が望ましい。



トラブル事例のカテゴリー

測定系の選択、構築

測定準備

測定中

測定結果

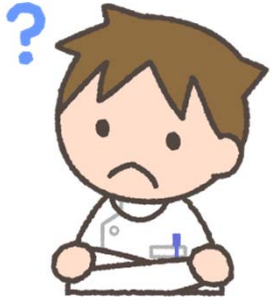
data解析

全般的(その他)

- ◆ LBAでのsinglicate測定について
- ◆ LBAとLC/MSの使い分けについて
- ◆ 自動化について
- ◆ 規制下試験での測定者数
- ◆ その他



LBAでのsinglicate測定について (全般的)



事例

LBAでのPK測定をduplicateではなく、singlicateで行う事ってどうなのでしょう・・・。



考えうる要因・対応策

DG内で出た意見は

- ・ 検体が貴重なとき非規制下で実施するケースもある。
- ・ 基本duplicateだが、ADAのTiterのみsinglicateを検討。
- ・ singlicateは検討の対象から外れている。
- ・ dataが跳ねたり、ばらつきが大きい測定系でのリスクが大きい印象。
- ・ LC/MSをやっている方からはsinglicateに違和感が無いというコメントも。

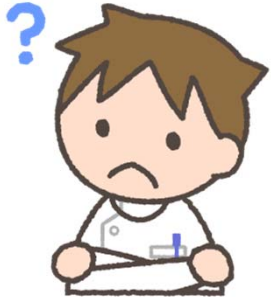
<http://bioanalysisforum.jp/>

DGからの一言

- ・ EBFではLBAもsinglicateを推奨するという発表があったようです。今後の状況に注目しておいた方が良いでしょう。



LBAとLC/MSの使い分けについて (全般的)



事例

LC/MSに比べて、LBAは複雑だし、手作業が多く、感度の問題以外でどういう時にLBAを使えばいいか悩みます・・・。



考える要因・対応策

- ・本質的には、LC/MSは物質そのものの量を測定しているのと比べて、LBAは結合活性を数値に変えて測定しているという違いがある。
- ・特に抗原固相で、抗体の活性を利用してLBAを用いる場合は、freeの抗体(に近い)量を測定していると考えるとよいかももしれない。
- ・抗体の濃度はLBAを使って測定されることが多いが、各測定の特徴を生かした選択があっても良いと考える。

DGからの一言

・低分子に比べて、抗体は非常に親和性が高いので、測定の目的に応じてfreeとtotalの違いを意識した方がよいかもかもしれません。





LBAとLC/MSの長所、短所(全般的)

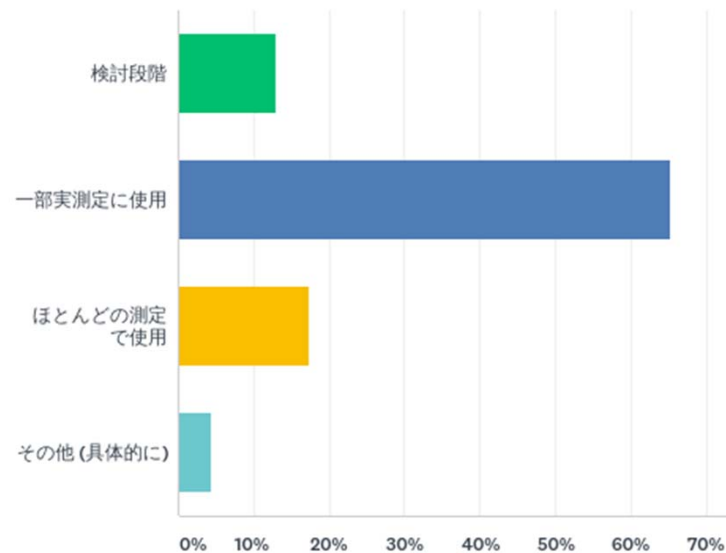
	LBA	LC/MS(高分子)
感度	比較的高感度	高感度化難しい※
free drug	○	×
total drug	○	○
系構築期間	時間がかかることも多い(～数か月)	比較的短期間(～数週間)
系構築難易度	対象に依存する	比較的容易
測定原理	結合量	物質そのもの(部分的)
マトリックスの影響	受けやすい	受けにくい
IS	×	○
習得度による差	大きい	小さい
スループット	高い	低い
測定コスト	高い	安い

※前処理に免疫化学的手法を用いたHybrid MSでの高感度化は可能。
(DGでは難易度やスループットの点から実際の測定における使用頻度は高くないのではとのコメントあり)

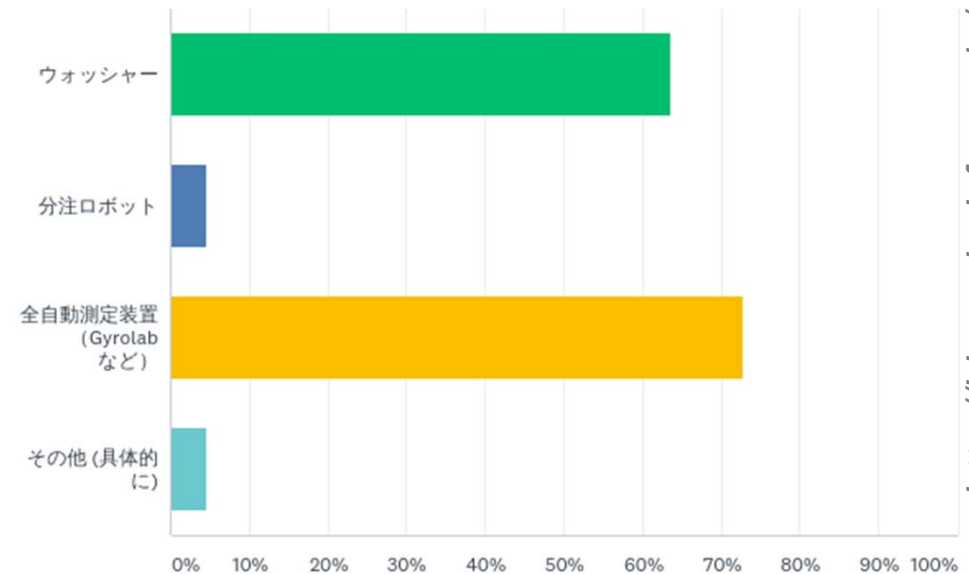


自動化について (全般的) アンケート

Q: LBAで自動化(分注ロボット、ウォッシャー、Gyrolabなどの測定装置を含む)はどのくらい進んでいるか?



Q: LBAの自動化においてどのような装置を使用しているか? (複数選択)

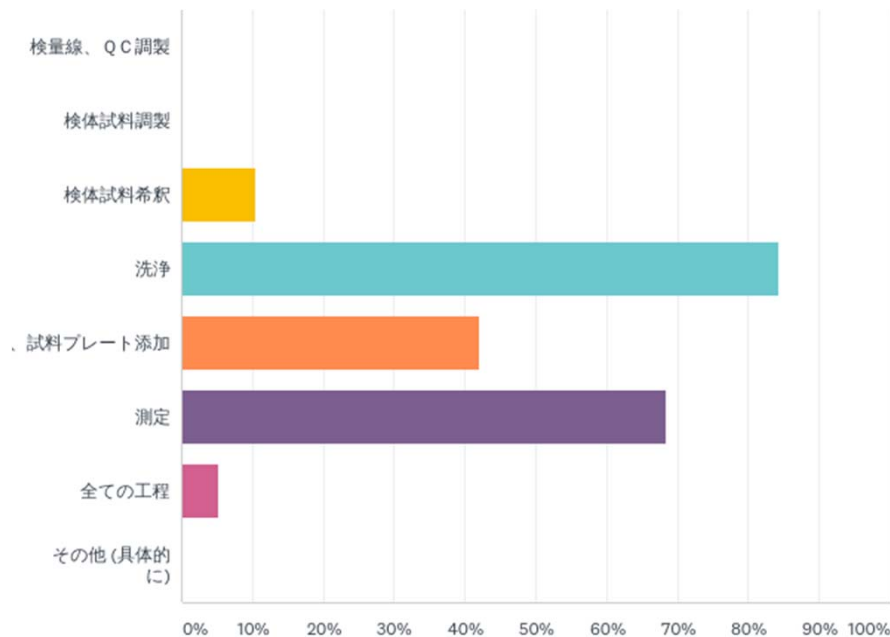


<http://bioanalysisforum.jp/>

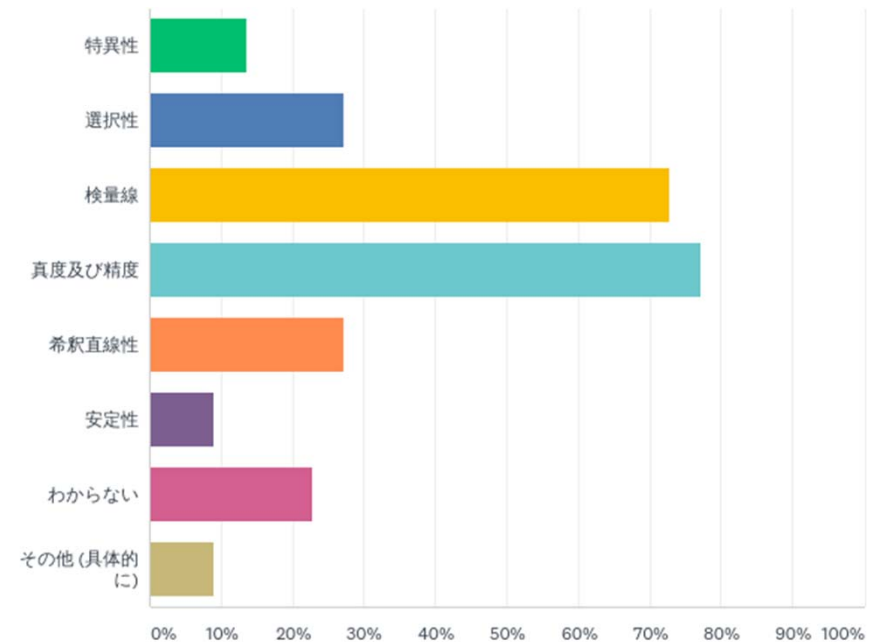


自動化について (全般的) アンケート

Q: LBAの自動化においてどの工程を自動化(一部自動化を含む)しているか？ (複数選択)



Q: バリデーションをマニュアルで実施し、検体測定を自動化装置で行いたい場合のパーシャルバリデーションの項目は？ (複数選択)



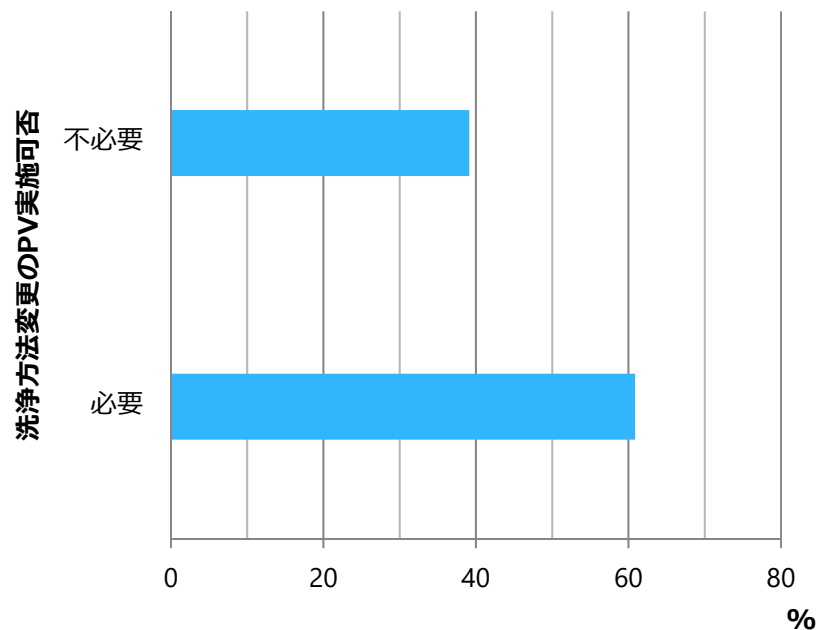
<http://bioanalysisforum.jp/>

ほとんどの回答者が検量線+真度および精度の組み合わせを選択していました。



自動化について (全般的) アンケート

Q: バリデーションで手動で洗浄をしていたが、検体測定でプレートウォッシャーを使用したい場合、パーシャルバリデーションは必要か？



必要

- ・ 経験はないが必要だと考えます。測定結果に影響を及ぼす操作であるからです。
- ・ 必要、プレートウォッシャーでは洗浄具合が強すぎて、手動と異なるかもしれないため (最初から再現性6ランのうち3ランずつにわければよいのでは?)
- ・ QCと検量線の基準を満たせばよいと思う。
- ・ 必要と考える。手動洗浄とプレートウォッシャーではsignalの出方が変わるため。
- ・ 影響を受けそうであれば実施。
- ・ 必要。検体測定とバリは洗浄を含め同じ方法で実施すべき。

不必要

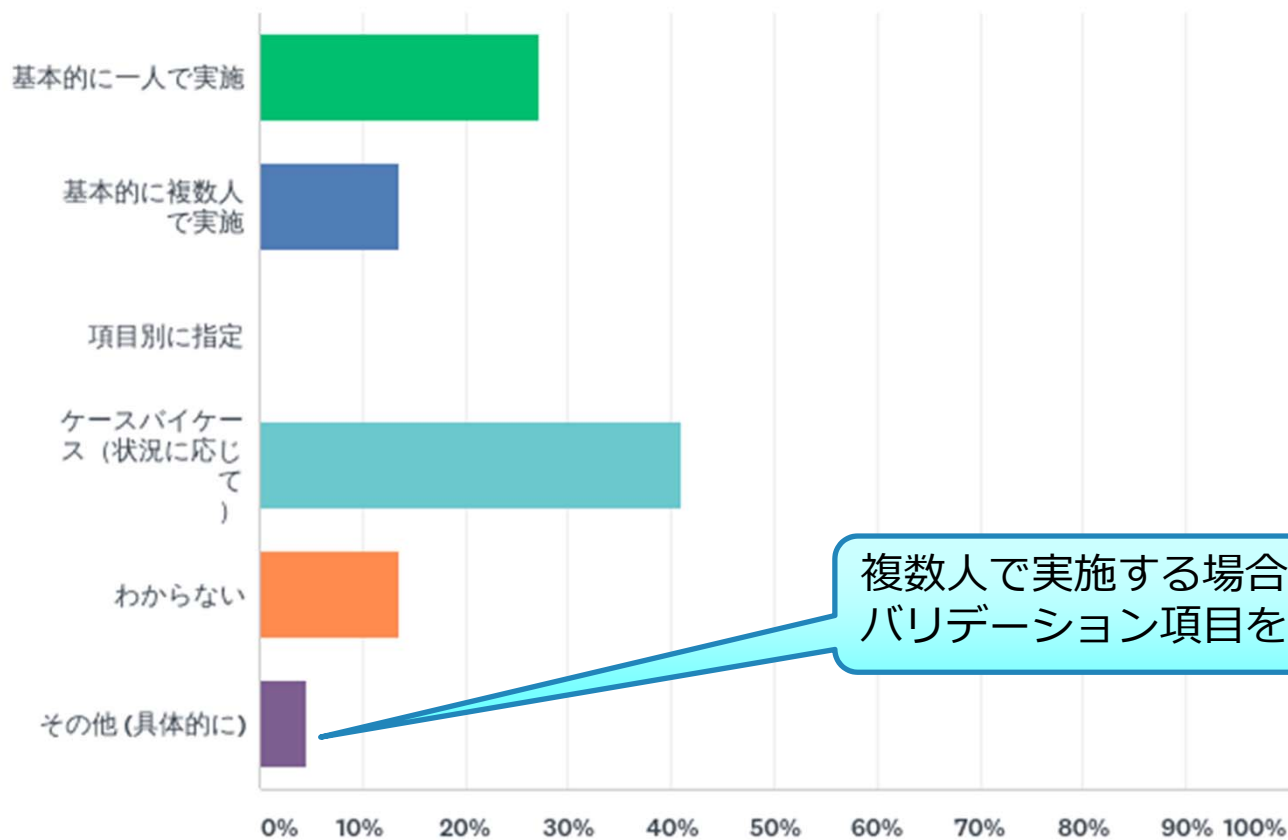
- ・ 洗浄操作に厳密な精度を求めないため。念のため結果を確認するが、文書化は不要と考えています。

<http://bioanalysisforum.jp/>



規制下試験での測定者数 (全般的) アンケート

Q: 規制下のそれぞれの試験について測定者は？



複数人で実施する場合、各人がバリデーション項目を実施確認

<http://bioanalysisforum.jp/>



その他の意見 DG&アンケート

- ・ **実験手技を習う場が欲しい (講義形式ではなく、実技で)**
→ピペッティング操作であればEppendorf、ELISAであればサーモフィッシャーで行われていそうです。
- ・ **デュプリケートの試験での添加の順番は気にしているの？**
→DG内では各社で添加の順番(向き)は異なるようでしたが、順番自体は決めているという意見でした。
- ・ **固相化したプレートの保存期間**
→DG内ではほぼ1晩以内で使用するとの事でしたが、長期保存の場合は問題ないことを確認するという意見でした。2週間保存は聞いたことがあるという話も。
- ・ **検量線の各ポイントは①公比を遵守して設定 (1, 3, 9, 27...) ②キリが良いように設定 (1, 3, 10, 30...) ?**
→DG内では公比派が優勢でしたが、実験のやり易さを重視すると公比順守派、有効数字などdataの扱いやすさを重視する場合はキリよく設定派のようでした。

Q1:重要試薬の小分け分注について、assay系構築の際も小分け使い切りにした方が良いのか？また使用期限は？

A1:冷蔵で安定な物はその限りではないと考える。使用期限は各試薬で反応性が異なり決められないので、各社で取り扱いを決めるしかない。

Q2:マウスにマウス抗体を投与した際のPK測定系でBGが上昇する理由は？

A2:マウス中の大量のマウスIgGが少しでも非特異的吸着すると、検出に抗マウスIgGを使った場合に、その非特異的吸着したマウスIgGに反応してしまうから。

Q3:キットのlot変更などでpartial validationは必要か？

A3:非規制下では必ずしも必要ないと思われるが、変更前後のdataを直接比較する場合は、同等性の確認をした方が良いと考える。

Q4:キットを信頼性基準下で使用するのとはどのようなケース？

A4:例えば、内在性のタンパク質を薬物として使用する場合、そのPKをキットで測定するケースなどが考えられる。

Q5:キットに含まれていた固相化抗体がワークしていなかった。非特異的に結合したタンパク質が特異的な抗体で検出されていた。どのような系変更の対処法があるか。direct ELISAはありか？

A5:通常direct ELISAは行わない。状態の異なるマトリックス中に存在する対象物質が、必ずしもその濃度依存的に反応するとは限らない。競合ELISAや新たな市販抗体を用いることなどが対処として考えられる。

Q6:初心者の方が酸変性のADA測定系でばらつく。原因は？

A6:混合不足や添加時のもたつきによるプレート内の反応むら为例として挙げられる。(密度などが)異なるbuffer系の溶液同士を混合する際は、通常よりもむらが生じやすい印象である。

Q7:シェイキングの有無で何が変わる？ 攪拌の速度は大体どのくらい？

A7:シェイキングによって感度を上げ、ばらつきを抑える。速度は500-1000rpmほどが適切だそうです。またシェイカーで機器自体に熱を持つものもあるらしく、測定値にムラが生じたそうです。

Q8:希少マトリクスの場合、代替マトリクスはどこまで使うか？

A8:希少マトリクスをどう使うか、MRD後の調製で使用量を抑えるなども含め、いろいろな方法が考えられる。代替マトリクスの選択と妥当性について十分検討されていれば積極的に使用しても問題ない。

Q9:標識体は被標識体（例えばADA分析用の標準物質）のロットが変わった際に作製し直すべきか？ 作り直した場合、反応性の確認は何を確認するか？

A9:実績としては、作り直す場合も作り直さない場合もある。作り直した場合、シグナルが2倍くらい上昇した経験がある。作製時のボリュームの差異で得られる標識体の質に違いが出ることの印象がある。作り直した場合の確認は再現性を1回だけなど。

Q10: Gyrolabの長所及び短所を教えてください。

A10: 長所：実験に要する時間が短く、短期間でたくさんのサンプル測定が可能。LBAはヒト間差に悩まされるので、Gyrolabだと懸念する必要がない。

(例) サンプル調製に約3時間、CD1枚あたり約1時間の測定時間、CD1枚は112サンプルなのでデュプリで56サンプル、1回の実験で2枚分の処理で、やろうと思えば1日3回（朝、昼、夕方）できる。

ただし違う測定メソッドの場合はコンディショニングに時間を要するため2回が限度。

短所：試薬にコストがかかる。

Q11: 結合試薬が内在性因子への交差性を持つと感度がでないため、サンドイッチの組み合わせを変更すると改善されるのはどうしてですか？

A11: 交差性を持つと非特異的な吸着によってバックグラウンドが上昇してしまうことで、s/n比が小さくなり感度が出ないこととなります。

サンドイッチの順を変えることで、ツール抗体の親和性の良し悪しによってバックグラウンド値が変化し得るためです。

Q12:検量線の各ポイントは①公比を遵守して設定 (1, 3, 9, 27...) か、②キリが良いように設定 (1, 3, 10, 30...) かどちらがいいですか？公比で設定した方がシグモイドがきれいに描けると思っています。

A12:どちらでも問題ない。

Q13:二重測定精度の評価方法は乖離度 (30%以内) とCV (20%以内) とどちらがいいですか？

A13:意見が分かれるところであり、答えはない。実際のところ乖離度30%とCV20%では差はあまりみられないのでどちらを採用しても問題ないと考えている。

Q14:QCサンプルはプレートの端に配置しているが、頭 (左端にワンセット) に配置するのとどちらがいいのか？

A14:どちらでも問題ない。エッジ効果やドリフトなどバラつきのあるメソッドの場合、両端配置のほうが測定に問題ないかどうかを保証する材料になり得る。