

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 -

Quantitative analysis of endogenous substance
(DG2016-27)

- Other analytical methods for endogenous substances: Flow cytometry, Luminex, and PCR-

DG2016-27 (member)

飯嶋康祐（協和発酵キリン）、小山泰永（積水メディカル）、
橘田久美子（シミックファーマサイエンス）、
谷口康徳（新日本科学）、中村隆広（新日本科学）、
花田雄一（アステラス製薬）、平澤由貴（イナリサーチ）、
増本真理（アステラス製薬）

Kousuke Iijima (Kyowa Hakko Kirin), Yasunori Oyama
(Sekisui Medical), Kumiko Kitta (CMIC Pharma Science),
Yasunori Taniguchi (Shin Nippon Biomedical Laboratories),
Takahiro Nakamura (Shin Nippon Biomedical Laboratories),
Yuichi Hanada (Astellas Pharma), Yoshitaka Hirasawa
(Ina Research), Mari Masumoto (Astellas Pharma)

要約

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、Luminex及びPCR

JBFのDGにおいて「内因性化合物の定量」の議論が2年間行われてきたが、それらのプラットフォームはLC-MSあるいはLBAであった。本DGでは、これら以外の分析方法（フローサイトメトリー、Luminex及びPCR）を用いた内因性物質の定量について議論したので報告する。

フローサイトメトリーではイムノフェノタイピングの測定方法の確立やバリデーションの内容、さらにビーズアレイと細胞表面の発現物質への抗体の占有率について議論した。Luminexでは内因性物質の定量のための測定方法の確立やバリデーション、qRT-PCRでは投与した核酸や細胞の測定方法の確立やバリデーションにおいて、それぞれに特徴的な点に着目して議論した。

Summary

- Other analytical methods for endogenous substances: Flow cytometry, Luminex, and PCR-

Quantitative analysis of endogenous substances in biological samples was discussed in the JBF discussion group (DG) for the last two years; however, analysis platforms were limited mostly to LC-MS and LBA. This year we report the results of our discussion for quantitative analysis of endogenous substances with flow cytometry, Luminex, and PCR, which we had not discussed yet.

Regarding flow cytometry we mainly discussed method development and validation of immunophenotyping. We also discussed bead array and flow cytometry based target receptor occupancy. Furthermore we discussed method development and validation of Luminex as a quantitative analysis of endogenous substances and those of quantitative real-time PCR as a dose-determining assay of transgene or cells with a focus on specific characteristics of PCR.

目次 (List of content)

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)



1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)



FACSCantoII
(BD Biosciences)

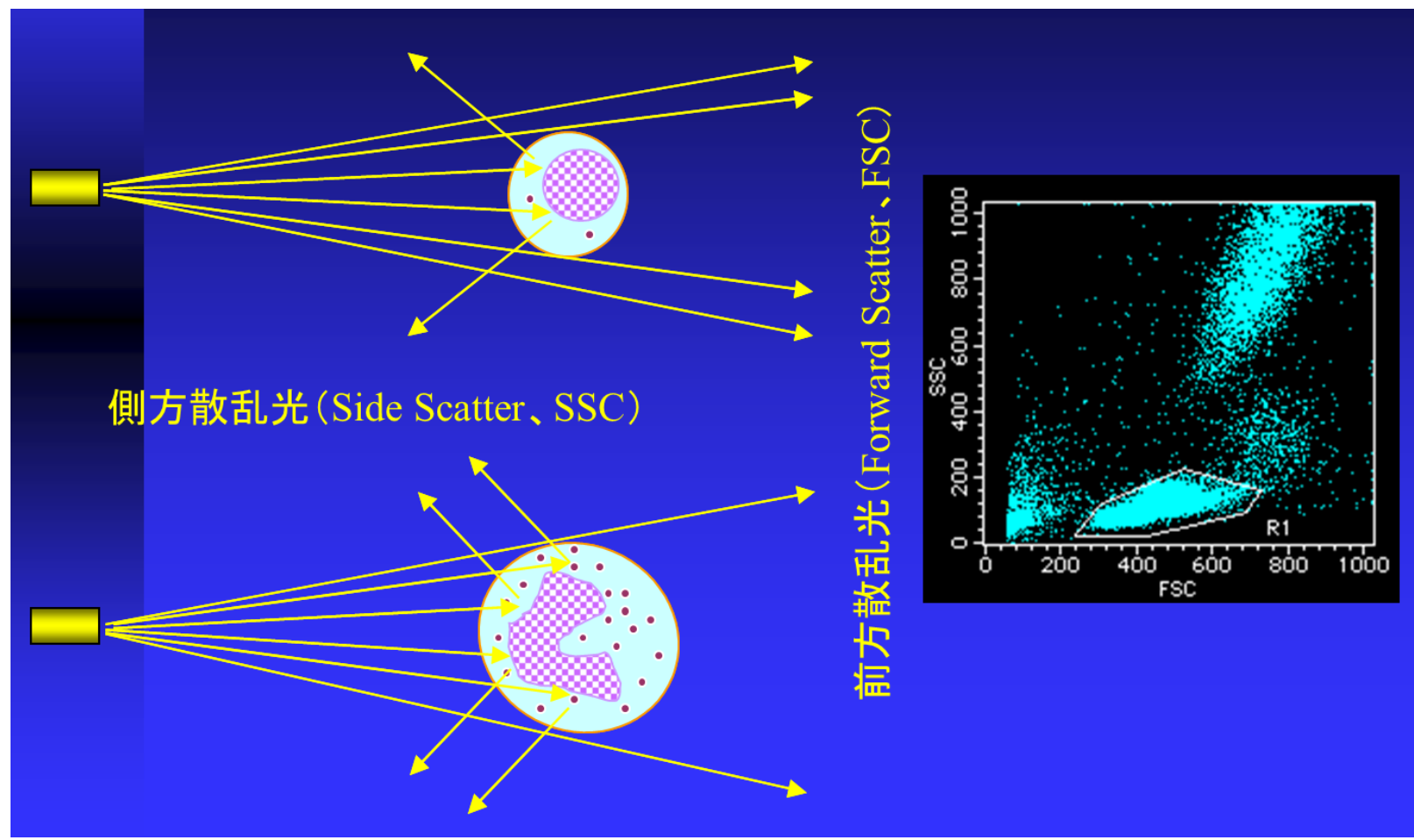


Attune NxT
(Thermo Fisher Scientific)

<http://bioanalysisforum.jp/>



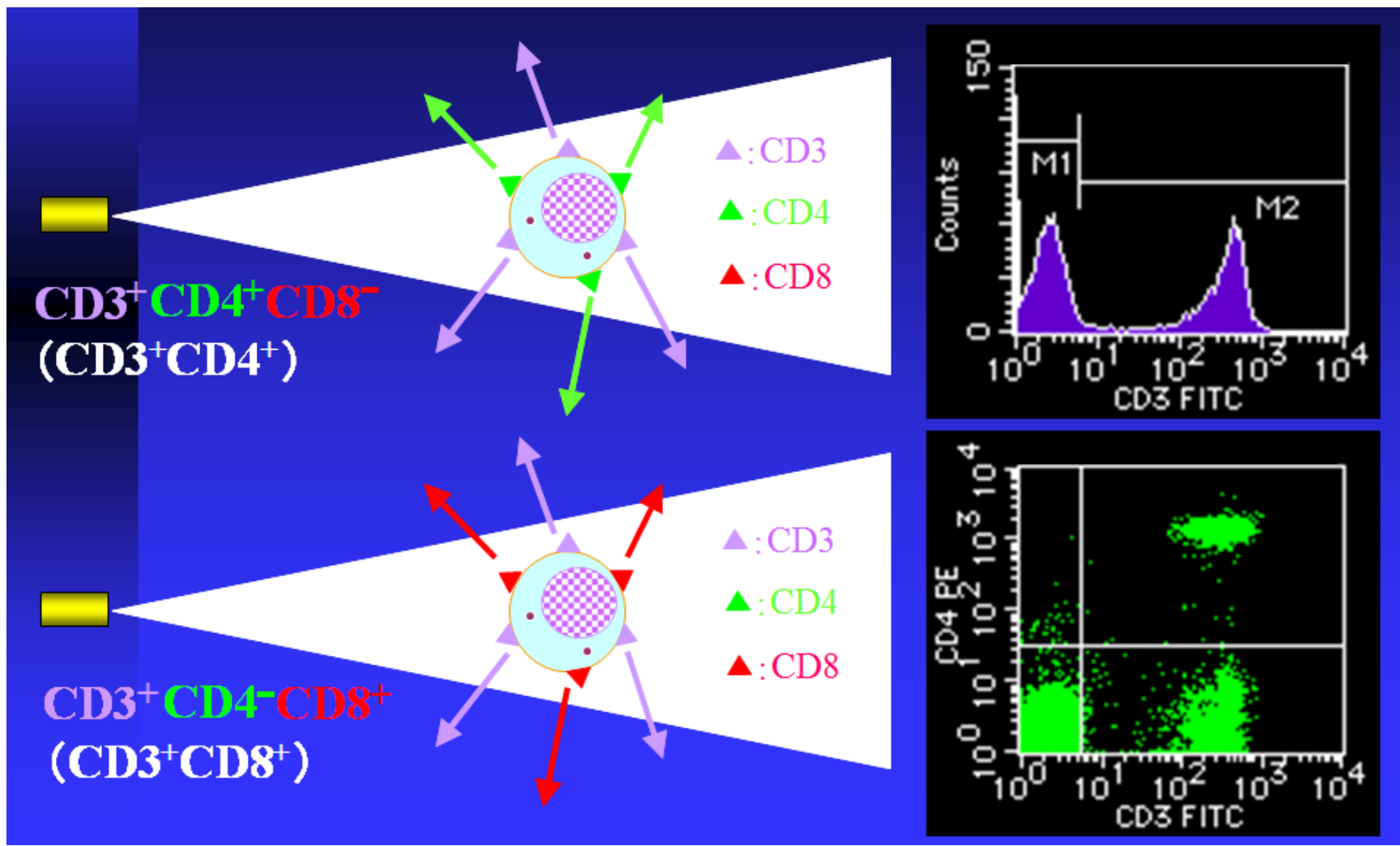
1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)



<http://bioanalysisforum.jp/>



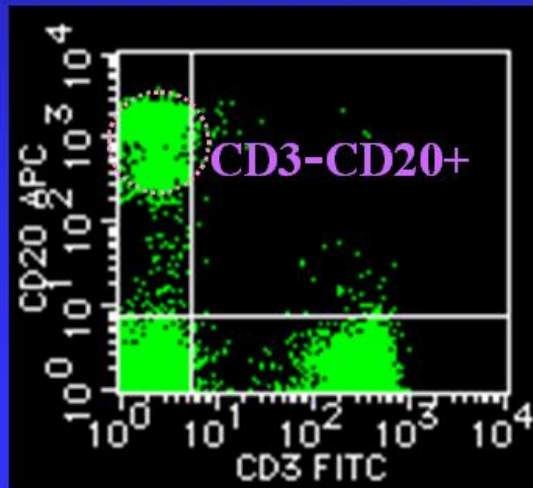
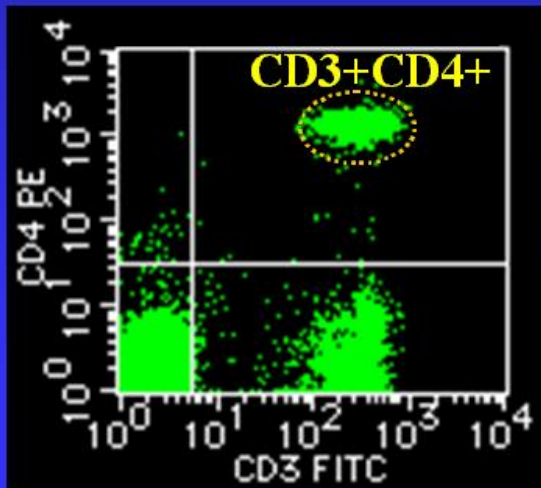
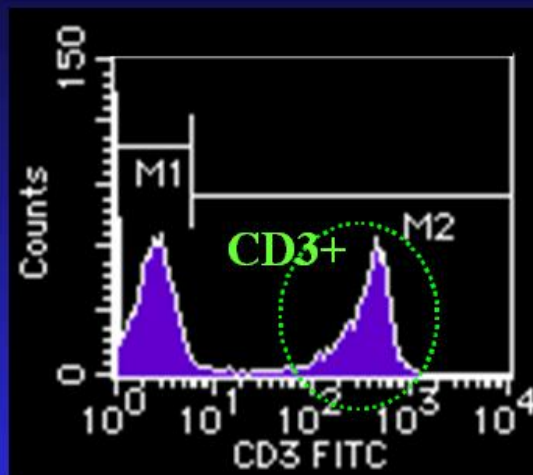
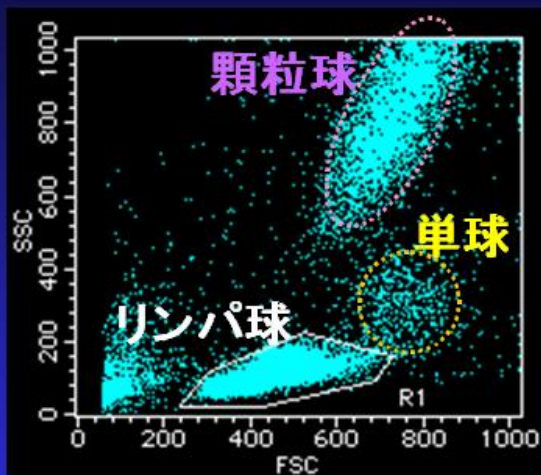
1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)



<http://bioanalysisforum.jp/>

1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

Cynomolgus monkey peripheral blood



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)

【測定方法の確立】(1/2)

抗体の選択: いくつかの抗体(市販品)から適切な反応を示すものを選択する。

濃度依存性: 抗体が濃度依存的に標的と反応することを確認する。

条件の設定: <抗体>

公比2で濃度を検討する。

コンペーンセーションが可能な条件や蛍光色素の種類を考慮する。

<その他>

染色の時間、洗浄回数、固定*の有無を考慮する。

固定*は臨床検体などで有用である。なお、固定*の有無によりゲーティングの位置が変わらないことを確認する。

* 染色前の固定を意味し、染色後の溶血時の固定ではない。

<補足>

上記の条件は、目的によって変わる場合がある。

毒性あるいはPDを評価する場合には、条件の工夫が必要。

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

【測定方法の確立】(2/2)

抗凝固剤： 血液学的検査に用いるEDTA-2Kを通常用いる。
ヘパリンを使う場合もある。

細胞数測定： 血液学的検査の結果(リンパ球数等)に得られた割合を乗ずる。
ビーズを使う場合もある。

ゲーティング： 何例かの結果を参考にゲーティングを固定して測定する。
個体によっては、ゲーティングを変更する場合もある。

1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

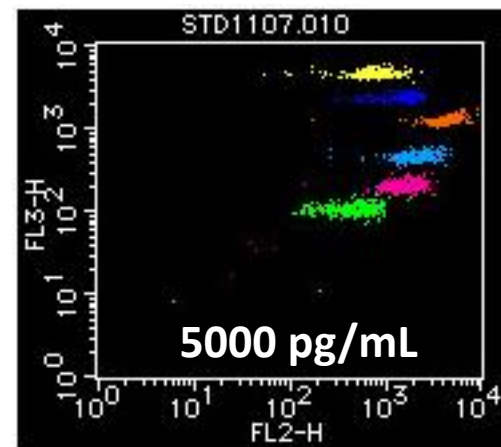
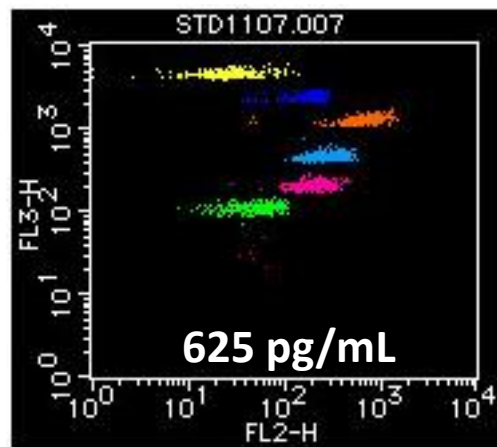
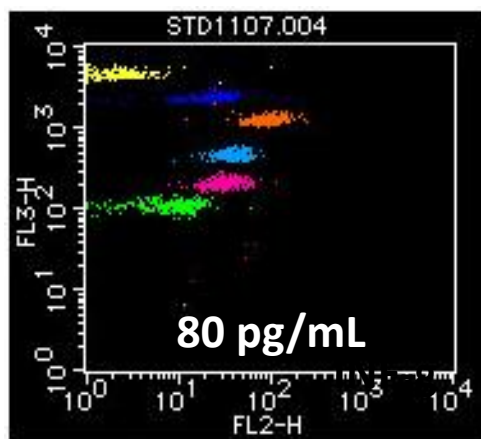
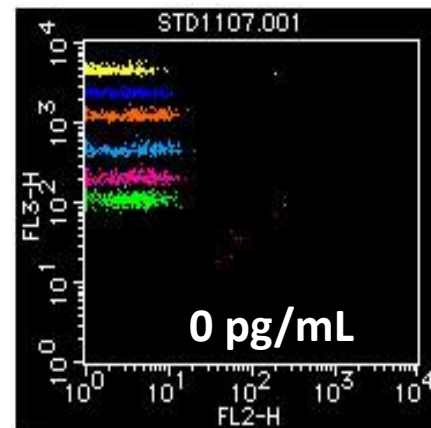
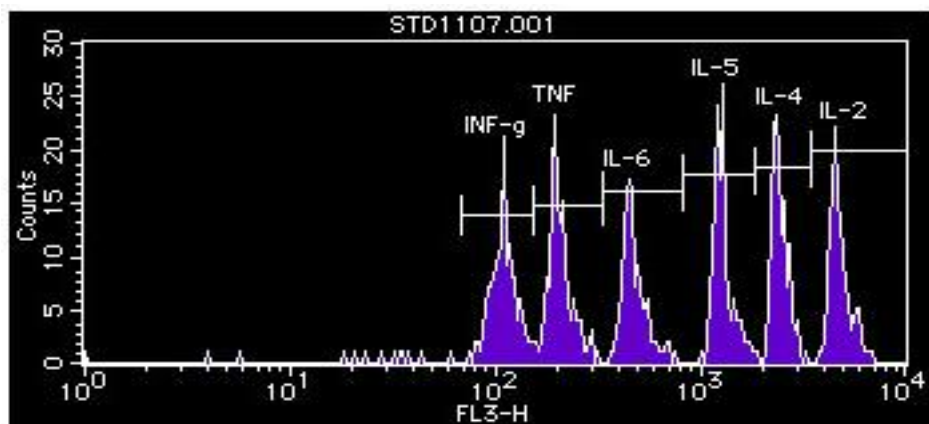
1-1 イムノフェノタイピング

【バリデーション項目】

- 特異性: 市販品の場合は添付書の情報を引用。濃度依存性の確認はする。
- 選択性: **実施していない。**
- 個体間差: 非臨床ならn=6(雌雄各3)、臨床ならn=10程度行う。
患者では個体差に注意する。
- 真度: **実施していない。**
- 日内再現性: n=3、CVは25%以内。割合が少ない場合はCVは考慮する。
- 日差再現性: **実施していない。** ※メタノール等で固定した場合は実施する場合がある。
- 測定者間差: **実施していない。** ※ゲーティングでは測定者間差を確認しておく。
- 安定性: n=3、初期値の±20%以内
基本として室温や冷蔵で24時間の安定性を調べる。
非臨床では6時間の場合もある。
臨床では48時間や72時間も調べる場合がある。
染色後の安定性も調べる。
染色前に固定する場合は、PBMCや白血球に分離後に固定する。

1-2. ビースアレイ (Bead array)

Sample volume: 15 μ L/6 parameters (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, INF- γ)



1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

1-2 ビースアレイ (Bead array)

【測定方法の確立】

- 試薬の選択: FACSで使用できる試薬(市販品)から選択する。
BD、eBioscience、Bio-Rad、コスモバイオなどから市販されている。
- 試料の選択: 血漿、血清、BAL(肺胞洗浄液)など。
- 抗凝固剤: 主にヘパリンナトリウムを使用している。

1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

1-2 ビースアレイ

【バリデーション項目】(1/2)

特異性:	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±20%(定量下限は25%)、 R^2 は0.9以上。
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。
日内再現性:	3~5濃度 × 2~5重測定、精度が20%以内(定量下限は25%)。

1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

1-2 ビースアレイ

【バリデーション項目】(2/2)

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

希釈直線性: n=1~3 × 3~4濃度、相対値が100±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: n=3、初期値の±20%以内

2濃度 × 2~3重測定 × 3試料、初期値の±20%以内

他に必要な項目: 凍結融解(3回)、調製後の室温安定性など。

1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

1-2 ビースアレイ

【その他】

論議した内容	DG内での意見
マルチプレックスとシングルプレックスで真度・精度の確認をしているか？	マルチプレックスのみで確認している。
取扱説明書での回収率が低い場合にはどうしているか？	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。
どのような時にCBA*を選択するか？	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。 現在はCBA*より高感度で多項目測定可能なLuminexなどが使用される事が多い。

* Cytometric Beads Array

1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

1-3 受容体占有率測定 (Receptor Occupancy: RO)

【測定法の概要】

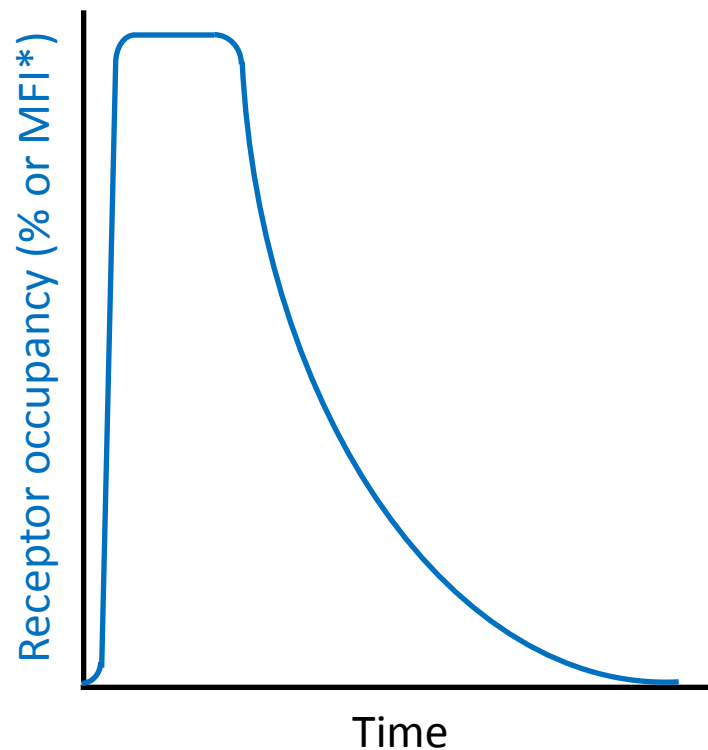
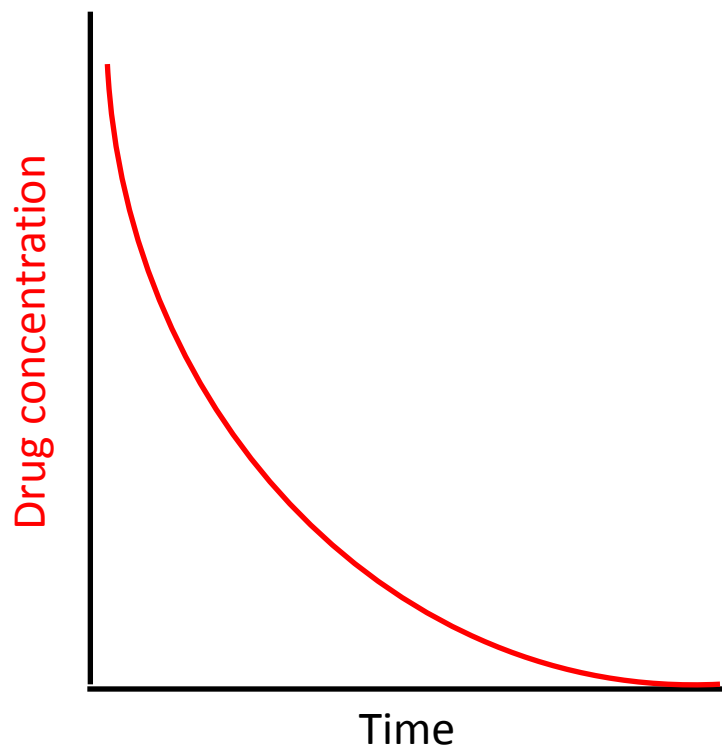
標的となる細胞表面上の受容体が薬剤抗体により占有される程度を定量する。

基本的に(1)遊離型の受容体、(2)結合型を含むすべての受容体をセットで定量する。

非臨床では薬剤抗体投与サル・マウス血液や、臨床に向けてヒト全血に薬剤抗体をスパイクするなどして、Pre-dose に対する薬剤添加群のROの推移を測定することが多い。

1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

1-3 受容体占有率測定 (Receptor Occupancy: RO)



* Mean fluorescence intensity

1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

1-3 受容体占有率測定 (Receptor Occupancy: RO)

【測定方法の確立】

検討項目	内容
染色試薬	<ul style="list-style-type: none"> 市販品で実績のある抗体などがあれば使用する。 Freeを検出する抗体は薬剤抗体を標識して用いることが多い。 Totalを検出する抗体は入手できないケースもある。 染色抗体の用量依存性を確認し、適切な使用濃度を定める。
測定試料	<ul style="list-style-type: none"> 全血を使用する。 全血で薬剤添加されている状態から、PBMC分画は基本行わない (抗体結合の平衡状態に影響するため) (vivo)ROのPre値の設定は複数日の平均値を用いることが多い。
その他	1-1 イムノフェノタイピングの方法に準ずる。

1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

1-3 受容体占有率測定 (Receptor Occupancy: RO)

【バリデーション項目】

項目	内容
特異性	市販品の場合は添付書の情報を引用。濃度依存性の確認はする。
選択性	実施していない。
個体間差	1-1 イムノフェノタイピングに準ずる。
真度	実施していない。
同時再現性	n=3、CVは25%程度。
測定範囲	Geomeanと陽性率%をみながら定量的に測定できる範囲を判断する。
全血安定性	<ul style="list-style-type: none"> 臨床測定系を構築する場合などには、採血直後と、採血後1日、2日、3日目の保存安定性を確認することがある。 5検体程度を使用し、採血直後のROの値との乖離の程度を評価。

1. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

1-3 受容体占有率測定 (Receptor Occupancy: RO)

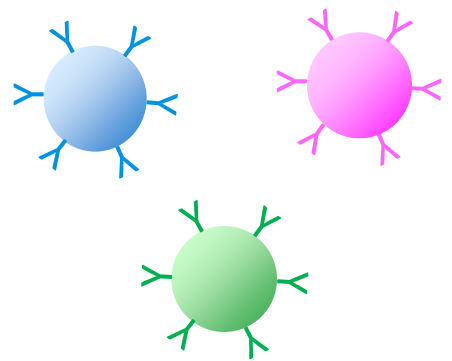
【その他】

議論した内容	内容
Totalの測定方法について	1)薬物抗体で飽和させ、その抗体を検出する方法 2)非競合抗体を用いて検出する方法 ※非競合抗体を改めて取得したりはしない。
Beadsを使用したMESFなどの使用経験について	メンバー内での使用経験はない。米国では浸透しているという情報もあり。
バリデーション時の検体は健康成人か、患者由来のものか	健康成人検体のみ使用実績あり。患者検体を使用するのは手続などで難しい印象を持っている。

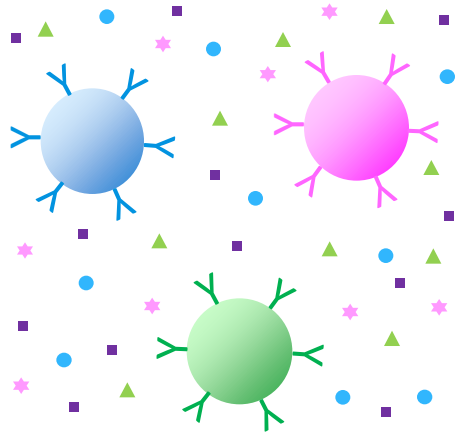


2. Luminex

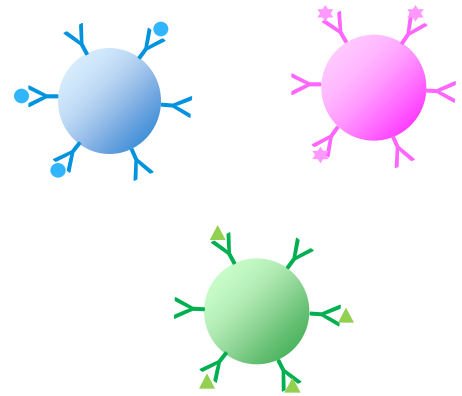
Dispense capture beads



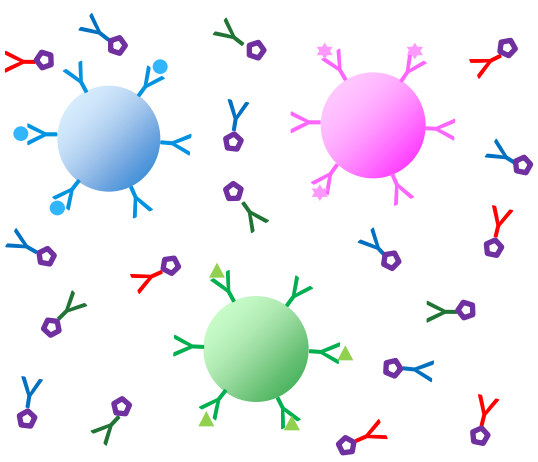
Add samples



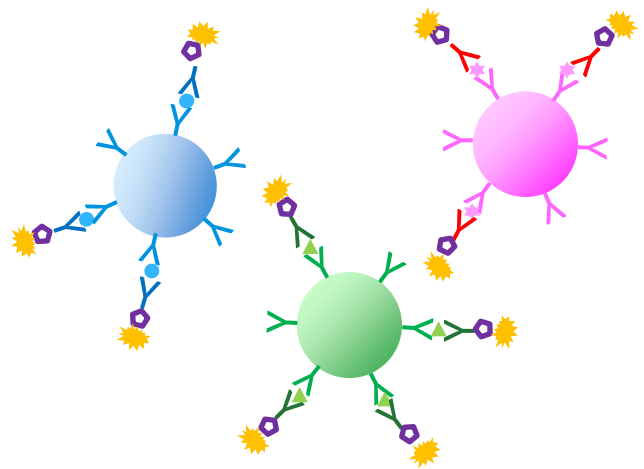
Remove unbound materials



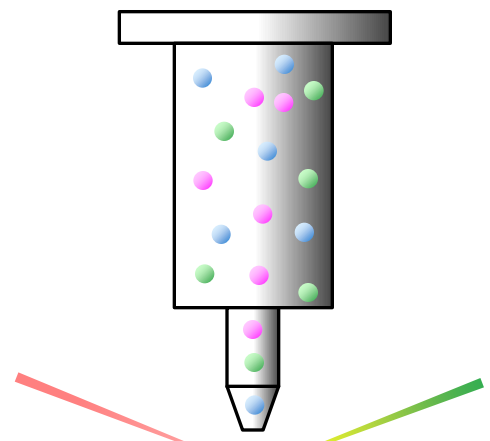
Add biotinylated detection antibodies



Incubate with a reporter streptavidin-phycoerythrin conjugate



Fluorescent sorting and data reduction



DG2016-27

Classification laser Reporter laser 23

<http://bioanalysisforum.jp/>

2. Luminex

内因性物質の定量

(Quantitative analysis of endogenous substances)

【測定方法の確立】

試薬の選択: メーカーによりキットの測定項目の組み合わせや定量範囲が異なるため、測定項目に合わせて選択。動物専用キットを選択。

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。

血清、血漿、尿あるいは培養上清などを使用。

2. Luminex

内因性物質の定量

【バリデーション項目】

- 特異性: 実施していない。
- 同時再現性: 3濃度をn=6で測定。
変動係数(CV)25%以内、相対誤差(RE)±25%以内。
- 日間再現性: 3濃度をn=1×5日間測定。CV25%以内、RE±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。RE±25%以内。
- 添加回収: 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。CV25%以内、RE±25%以内。
- 安定性: 3濃度をn=1で測定。初期値の±25%以内。
凍結保存安定性、凍結融解安定性(3回)。
- 測定者間差: 実施していない。

2. Luminex

内因性物質の定量

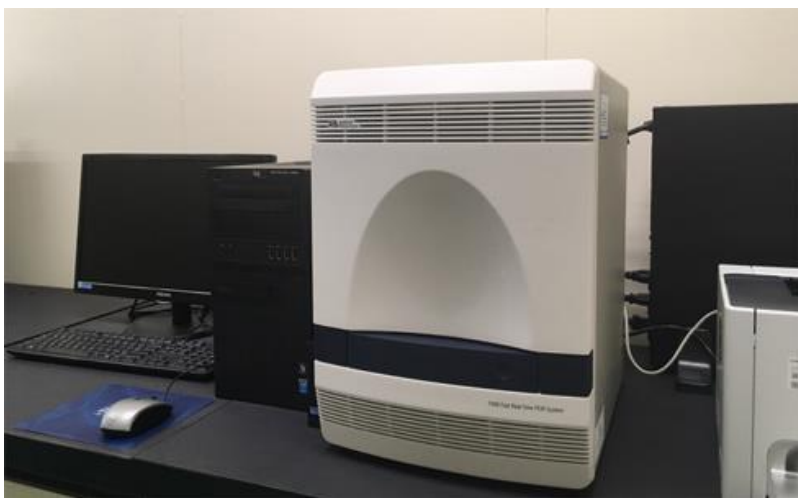
【その他】

論議した内容	DG内での意見
マルチプレックスとシングルプレックスで真度及び精度の確認を実施しているか？	マルチプレックスのみで確認している。
どのような時にLuminexを選択するか？	少量サンプル(最少12.5 μ L/well)を用いて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。
動物専用のキットが無い場合はどのように対応しているか？	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。
高濃度サンプルはどのように調製しているか？	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。

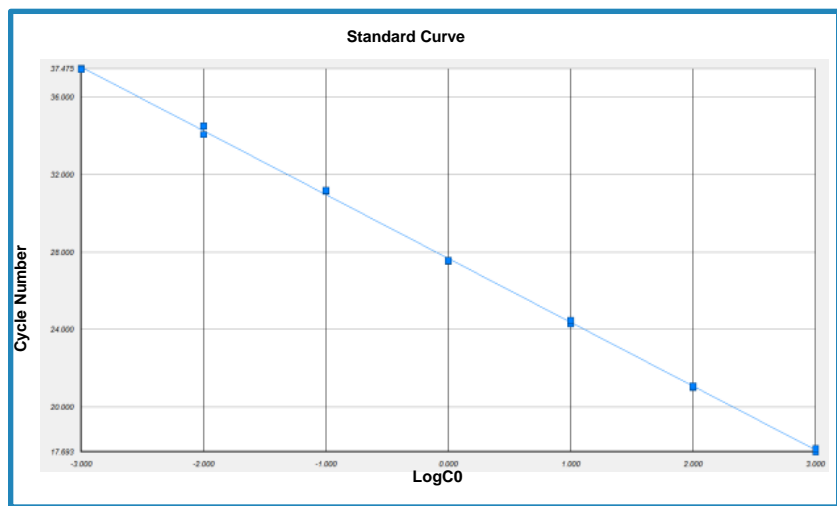
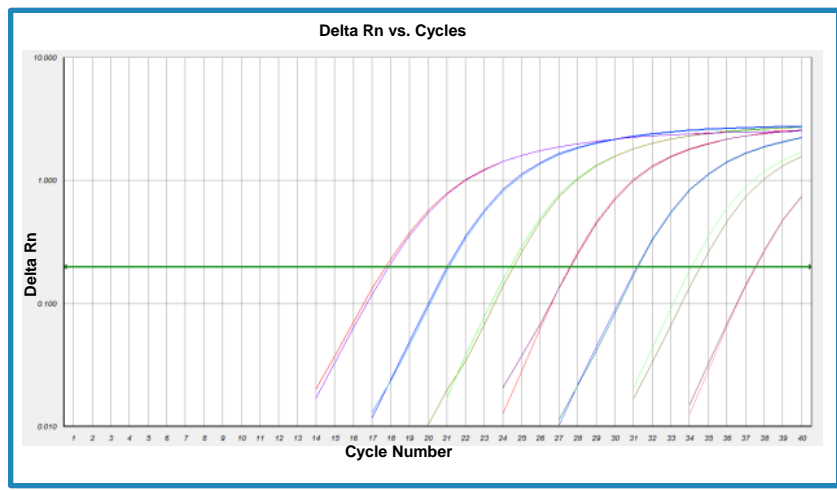
* Cytometric Beads Array



3. qPCR



7500Fast リアルタイムPCRシステム



<http://bioanalysisforum.jp/>

3. qPCR

投与した核酸や細胞の測定 (Dose-determining assay of transgene or cells)

【測定方法の確立】 (1/2) <サンプル調製>

- 試料の選択: 主に全血や組織。
血清や唾液が対象の場合もある。
- 組織採取: 主にホール組織で調製(偏りがある場合もある)。
臓器・個体ごとにコンタミ対策(DNAawayなどで器具を拭き取る等)を徹底。
- サンプル調製試薬の選択: 主にQIAGENのDNA/RNA抽出キット。
- サンプルの品質確認: DNA/RNA濃度測定、純度(A260/280)確認。
Qubit, PicoGreenを用いたdsDNA特異的蛍光検出法, 又はRiboGreenを用いたRNA特異的蛍光検出法で確認。
Bioanalyzerでの確認。

3. qPCR

投与した核酸や細胞の測定

【測定方法の確立】 (2/2) <測定>

- プライマー・プローブ: 自社設計、市販プローブ、Thermoなどに依頼設計など様々。
- 逆転写/PCR試薬: Thermo Fisher、Applied Biosystems、IDTなどから選択。
- 測定方法: インターカレーター法 (SYBR Green I) またはプローブ法 (TaqMan)。
- Reference Gene: 基本はGAPDHや β -actinを選択、その他HPRTなど。
必要に応じて2種類以上を実施する場合あり。
- テンプレート添加量: FDAガイダンスにはこだわらず、ngオーダーのDNAを添加。
- サンプルにスパイクするゲノム核酸: 種は合わせているが、系統まで合わせていない。
※または、実施していない。
- 抽出核酸Quality: 抽出核酸がPCR実施に十分な質を保持していることの証明。
mRNA検出の際はreference geneがあるので実施しない。
DNA検出の際はreference geneを用いて実施する。

3. qPCR

投与した核酸や細胞の測定

【バリデーション項目】 (1/2)

- 特異性： NTC (No template control) で試薬内で非特異的な反応の有無の確認 (primer dimer等)。
NC (Negative control) でbackgroundとなる核酸への非特異的反応の有無の確認。
- 検量線の直線性： 基本は $R^2 > 0.98$ または 0.99 、増幅効率：85-110% または $\pm 20\%$ と設定。
さらに、各濃度のduplicateのCt値の差が1.5以内、
LLOQのCt値が35以内、各濃度のRE及びCVが20%以内、
などを設定する施設あり。
- 真度： 日内再現性で確認する。
- 添加回収： **実施していない(試料毎に抽出効率が異なるため)。**

3. qPCR

投与した核酸や細胞の測定

【バリデーション項目】 (2/2)

日内再現性:	3~4濃度、n=3、RE:20%、CV:20%
日差再現性:	3~4濃度、n=3、RE:20%、CV:20%
希釈直線性:	実施していない。
安定性:	全血:冷蔵、凍結保存、凍結融解の安定性 ホモジェナイズ液:凍結保存、凍結融解の安定性 抽出核酸:冷蔵、(冷凍保存、凍結融解)の安定性 例数:n=3 基準:Ct値の変動が初期値から1.5以内など。
組織中の核酸の安定性:	実施していない(現実的にできない)。
マトリックスの影響:	抽出核酸の濃度をいくつか用意し、これにQC試料を 添加してCt値の差が1.5以内かを確認する。

※実施していない施設もあり

3. qPCR

投与した核酸や細胞の測定

【その他】(1/2)

論議した内容	DG内での意見
組織内分布の不均一性は確認していますか？	細胞とウイルスの場合は、蛍光標識した物質をIVIS*を用いた ex vivoで確認が可能。
どのように破碎・ホモジナイズしていますか？	ビーズでの破碎後にLysis Bufferで一晩インキュベート、鉄球で破碎、液体窒素と乳鉢・乳棒ですり潰す、など。
サンプル調製時のDNase/RNaseの添加有無でサンプル品質に差が見られますか？	比べたことがないのでわからない。
Standard, primerの品質にcriteriaを設けていますか？	StandardはCOAで良しとしている。Primerは特に設けていない。
検量線用のスタンダード希釈系列の希釈液は水でしょうか？	水で希釈(バリデーションで、マトリクス効果が無い事を確認の上)。DNAの場合は使用動物のgDNAで希釈する施設もあり。

* In vivo imaging system

3. qPCR

投与した核酸や細胞の測定

【その他】(2/2)

論議した内容	DG内での意見
LLOQと検出限界はどのように決めていますか？	検出限界：95%の信頼性で検出できるコピー数を求める(n=12)。 LLOQ: 真度、精度で保障できるコピー数
定量下限と検出限界の間に出てくるサンプルの取り扱い	参考値扱い、またはNDとしている。
最終的な評価の単位について また動物gDNA中のウイルス あるいはヒトDNAの定量的場合の表記は？	内在性のmRNAの場合: copy/ug total RNA ヒトDNAの場合: copy/ug total DNA ウイルスの場合: viron/ug total DNA 細胞の場合: cells/organとcells/mgの併記 Alu配列の場合: 実測値から細胞あたりの数を計算し1細胞あたり何個と示す。
mRNAの定量法はどうしていますか？	検量線法か $\Delta\Delta Ct$ 法、どちらの場合もある。ケースバイケース。
384well or 96well？	どちらも利用されており、施設により異なる。