



DG2019-42

LBAによるマルチプレック スアッセイの現状と課題

Current State and Issues Facing Multiplex LBAs

<http://bioanalysisforum.jp/>



DG Members

Name	Company
前田 健一 Kenichi Maeda	積水メディカル株式会社 <i>SEKISUI MEDICAL CO., LTD.</i>
平澤 由貴 Yoshitaka Hirasawa	株式会社イナリサーチ <i>Ina Research Inc.</i>
木下 誠司 Seiji Kinoshita	株式会社LSIメディエンス <i>LSI Medience Corporation</i>
摺木 志保 Shiho Suruki	協和キリン株式会社 <i>Kyowa Kirin Co., Ltd.</i>
谷口 康徳 Yasunori Taniguchi	株式会社新日本科学 <i>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.</i>

<http://bioanalysisforum.jp/>

※アドバイザー：清水 浩之(田辺三菱製薬株式会社)



活動の内容 (*Contents of our activity*)

- ◆ 2019年6月 Jun 2019
 - ✓ DGサポーターからDGメンバー募集
Member recruitment
- ◆ 2019年7月30日 Jul 30, 2019
 - ✓ キックオフ会議 Kick off meeting
- ◆ 2019年8月～12月 Aug to Dec 2019
 - ✓ Web会議（平均月1回）及びメールによる議論
Monthly teleconferences and e-mail conversations
- ◆ 2020年1月～2月 Jan to Feb 2020
 - ✓ 議論のまとめ及びシンポジウム発表準備
Summary of discussion and poster preparation

<http://bioanalysisforum.jp/>





背景及び目的

- ◆ Ligand binding assay (LBA) において Electrochemiluminescence (ECL) やLuminex 等によるマルチプレックスアッセイが利用されている。
- ◆ 一回の測定で多項目の濃度測定が可能となる一方で、シングルプレックスアッセイ時とは異なる課題があると推測される。例えば、マルチプレックスアッセイの評価方法や評価基準に関しては、C-Path のPoints to Consider Document* では対象外となっており、各社それぞれのポリシーで実施方法や基準が設定されていると推測する。

*: Points to Consider Document: Scientific and Regulatory Considerations for the Analytical Validation of Assays Used in the Qualification of Biomarkers in Biological Matrices issued by C-Path



背景及び目的

- ◆ 本DG では、LBA によるマルチプレックスアッセイの使用目的や使用プラットフォーム、バリデーションの実施状況とその評価基準や評価方法の設定を議論した。また、バイオアナリシス分野におけるLBA によるマルチプレックスアッセイの実情を調査し、今後のバイオアナリシスに生かすことを目的とした。

<http://bioanalysisforum.jp/>





Background and Objective

- ◆ Multiplex ligand binding assays (LBAs), such as Electrochemiluminescence (ECL) or Luminex, are commonly used.
- ◆ Multiplex LBAs are able to measure multiple analytes simultaneously in a single assay; however, there seems to be some issues centric to multiplex LBAs which differ from that of singleplex LBAs. For example, the evaluation and acceptance criteria of multiplex LBAs are excluded from the scope of the Points to Consider Document: Scientific and Regulatory Considerations for the Analytical Validation of Assays Used in the Qualification of Biomarkers in Biological Matrices issued by C-Path. It appears to the members of this DG that the evaluation of multiplex LBAs is performed according to various policies established separately by each company.



Background and Objective

- ◆ This DG mainly focused on the intended purpose, platform selection, decisions on whether to validate multiplex LBAs, and the validation method itself. Additionally, we investigated the current state of multiplex LBAs in bioanalysis as well as discussed in detail issues multiplex LBAs are facing along with mitigation efforts.





議論の内容1 (Contents of discussion)

- ◆ マルチプレックス測定の実況 (Current State of Multiplex LBAs)
 - ✓ 使用目的
 - ✓ プラットフォーム
 - ✓ 申請資料やGLP試験への利用状況
- ◆ バリデーシヨンの評価方法及び基準 (Evaluation and Criteria of Method Validation)
 - ✓ バリデーシヨン実施状況及び目的
 - ✓ 評価項目及び基準
- ◆ バリデーシヨン成立事例 (Examples of Validation of Multiplex LBAs)





議論の内容2 (*Contents of discussion*)

- ◆ マルチプレックス測定の利用状況 (Operation of Multiplex LBAs)
 - ✓ QC試料
 - ✓ バッチ採用基準
 - ✓ 実試料の再測定基準及び実施方法
 - ✓ 測定キットのロット間差担保
- ◆ トラブルと対処 (Troubleshooting)
- ◆ アンケート結果 (Results of a Questionnaire Survey)





マルチプレックス測定の実況

Current State of Multiplex LBAs

<http://bioanalysisforum.jp/>



JBF 利用目的

どのような時に利用するか？

DG内の意見

- ◆ **限られた実試料量で複数分析対象がある**場合
- ◆ 多数の分析対象を類似プラットフォームで測定したい場合
- ◆ **網羅的に解析したい**場合
- ◆ **作業の効率化を図る**場合

測定対象は？

DG内の意見

- ◆ 動物の血清, 血漿, 尿
- ◆ ヒトの血清, 血漿
- ◆ 細胞培養上清





プラットフォームの選択基準

プラットフォーム選択時に考慮するのは？

DG内の意見

- ◆ 分析対象の市販**キットの有無**
- ◆ スクリーニングや急ぎの場合は**同時分析対象数**や**キットの入手速度**
- ◆ **キットの費用**
- ◆ 測定時の**実試料使用量**
- ◆ 分析対象数が30以上の場合は費用面や実試料使用量を考慮してLuminexを選択
- ◆ **感度や定量範囲**（ただし、Luminexの場合、定量下限が変わってしまう可能性あり）
- ◆ **再現性**の面でECLを優先
- ◆ **バリデーションのガイドラインの適用しやすさ**の面でECLを優先

<http://bioanalysisforum.jp/>





測定キットの利用状況

市販キットを使用するか？

自家調製の測定系を使用するか？

DG内の意見

- ◆ 基本的に市販キットを用いた測定
- ◆ 市販キットがない分析対象だったため、自家調製で2plexや12plexの測定系を組んだ例がある

<http://bioanalysisforum.jp/>





申請用資料及びGLP試験での利用状況

DG内の意見

申請用資料への利用について

- ◆ ECLを利用した非臨床試験で経験がある.
- ◆ 信頼性基準でECL及びLuminexを利用した臨床試験の経験がある.
- ◆ 信頼性基準でLuminexを利用した非臨床試験の経験がある.
- ◆ GLP試験におけるサイトカイン測定の要望がある.

GLP試験での利用について

- ◆ バリデーションを取得して, GLP試験の一項目で使用経験がある.
- ◆ バリデーションは行なっていないが, 試験内で再現性等を確認し, GLP試験の一項目で使用経験がある.
- ◆ GLP試験の要望があり, バリデーションも取得予定.
- ◆ GLP試験で利用した経験はない.



バリデーシヨンの 評価方法及び基準

Evaluation and Criteria of Method Validation

<http://bioanalysisforum.jp/>



バリデーシヨンの実施状況(ECL)

DGメンバーの実施状況

バリデーシヨン取得の測定試験として

- ◆ 信頼性基準下での治験時のヒト臨床実試料のバイオマーカー測定
- ◆ 非GLP試験下での非臨床毒性試験のバイオマーカー測定

バリデーシヨンを取得しない測定試験として

- ◆ 探索目的のヒト臨床実試料のバイオマーカー測定
(実試料が集まってからの一括測定等)
- ◆ 非臨床試験のバイオマーカー測定

<http://bioanalysisforum.jp/>





バリデーシヨンの実施状況(Luminex)

DGメンバーの実施状況

バリデーシヨン取得の測定試験として

- ◆ 信頼性基準下での治験時におけるヒト臨床実試料のバイオマーカー及びADA測定
- ◆ 非GLP試験下での非臨床毒性試験のバイオマーカー測定
- ◆ GLP試験の一項目での測定

バリデーシヨンを取得しない測定試験として

- ◆ 探索目的のヒト臨床実試料のバイオマーカー測定
(実試料が集まってからの一括測定等)
- ◆ In vitroのサイトカイン測定
- ◆ 非臨床試験のバイオマーカー測定

以下にDGのメンバー内でのバリデーシヨン実施時の評価方法について取り纏めた



バリデーション時の評価項目

DGのメンバー内でのバリデーション実施時の評価項目

LBAのガイドラインに準じて以下の内容で実施

- ◆ 検量線, 定量限界, 再現性, 希釈直線性及び希釈平行性, 選択性, 安定性
- ◆ 各施設マルチプレックスに特化したSOPはない

マルチプレックス測定においては, 分析試料を一律希釈した際に各分析対象ごとに測定値の評価を行うが, 一部の分析対象が基準を満たさない場合が想定され, 対応が求められる





検量線，定量限界の評価基準-1

- ◆ 適合基準
 - ✓ LBAガイドラインに従い，真度 $\pm 20\%$ 以内（定量上限及び下限は $\pm 25\%$ 以内）
 - ✓ バリデーション前の予備検討結果から真度 $\pm 30\%$ 以内に緩めた例もあった
- ◆ Luminexの測定においては「定量下限の蛍光強度の平均値- 3 SD > Blankの蛍光強度の平均値+3SD（6日間）」とする意見もあった
 - ✓ 定量下限の蛍光強度がBlankの蛍光強度と近い値になる場合もあるため





検量線，定量限界の評価基準-2

- ◆ ECL及びLuminexのキットにおいては検量線範囲がロットごとに異なることがあり，可能ならば実試料を全て測定できるようにキットを準備
 - ✓ 測定キットのロットが変わり，バリデーション時と実試料測定時に検量線範囲が変わる際には，定量範囲の設定が通常単一分析対象測定とは異なり，運用での対応となる（各ロットの検量線範囲を使用する等）

「トラブル事例 トラブル③：標準物質のロット変更」
57～61ページ参照





JBF 再現性の評価基準-1

Buffer試料を用いた再現性評価

- ◆ 再現性試料は3または5濃度で設定, 3または6日間の再現性
- ◆ 適合基準例
 - ✓ 真度 $\pm 20\sim 30\%$ 以内
 - ✓ 精度 $20\sim 30\%$ 以下

Buffer及び標準物質を用いて, 定量限界を含む5濃度の試料調製が可能





JBF 再現性の評価基準-2

マトリックス試料を用いた再現性評価

- ◆ 再現性試料は3濃度で設定, 3または6日間の再現性
- ◆ マトリックス使用時には事前に測定値を確認し, 妥当な再現性試料を選択する (標準物質を添加することもあり)
- ◆ 適合基準例
 1. 真度の評価は実施せず, 精度30%以下
 2. 初回値に対する真度 $\pm 30\%$ 以内, 精度30%以下

マトリックス試料を用いた定量限界試料の調製は困難であり, 3濃度での再現性試料を調製 (定量限界試料はBuffer系試料で確認) との意見もあった.

但し, 各分析対象の測定値に大小があり, 厳密に濃度設定すると各分析対象に対して異なる希釈倍率となり, マルチプレックス測定での対応が不可となる.



希釈直線性及び希釈平行性の評価基準-1

◆ 評価試料

- ✓ 標準物質添加マトリックス試料（希釈直線性）
- ✓ 標準物質未添加マトリックス試料（希釈平行性）

◆ 適合基準例

1. 希釈前測定値に対して真度 $\pm 20\%$ 以内
2. 希釈試料の測定値（4濃度）と希釈倍率の決定係数（ R^2 ） ≥ 0.98
3. 希釈倍率間の測定値の精度 $20\sim 30\%$ 以下（希釈平行性の場合）





希釈直線性及び希釈平行性の評価基準-2

- ◆ マルチプレックス測定特有の問題として、各分析対象の希釈直線性（平行性）が成立する範囲が異なる場合がある
 1. 実試料を各希釈倍率で別々に実施
 2. マルチ測定の目的が薄れるため同一の希釈倍率で実施（評価項目の重要度により対応）

- ◆ 実試料の測定値が定量上限を超えないようなパネルでは、希釈直線性や平行性の実施が不要の意見もあった





JBF 選択性の評価基準-1

- ◆ 評価試料
 - ✓ 個体別試料に標準物質を添加
- ◆ 適合基準例
 - ✓ 真度±20%以内

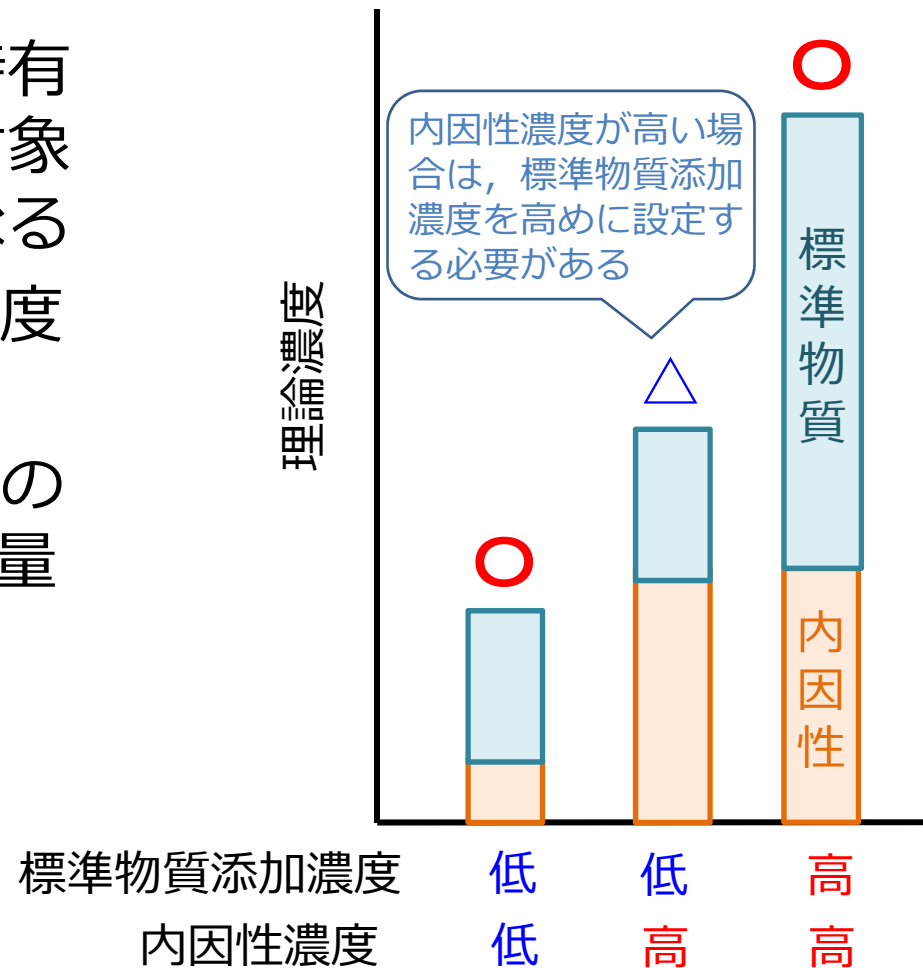
$$\text{真度(\%)} = \frac{\text{選択性試料中分析対象測定値}}{\text{内因性分析対象測定値} + \text{標準物質添加濃度}} \times 100$$

$$\text{真度(\%)} = \frac{\text{選択性試料中分析対象測定値} - \text{内因性分析対象測定値}}{\text{標準物質添加濃度}} \times 100$$

(注釈) 選択性試料の真度は評価は、上記どちらかの計算式にて評価

選択性の評価基準-2

- ◆ マルチプレックス測定特有の問題として、各分析対象により内因性濃度が異なる
 - 適切な標準物質添加濃度が異なる
 - 予備検討で個体別試料の選択及び標準物質添加量を設定する必要あり



<http://bioanalysisforum.jp/>



JBF 安定性の評価基準

- ◆ 評価試料
 - ✓ マトリックス試料（標準物質未添加又は添加）を2または3濃度

- ◆ 適合基準例
 - ✓ 初期値に対する真度 $\pm 20\sim 30\%$ 以内

- ◆ 内因性濃度が低く検出できない場合、評価しないという意見もあった（測定値が得られた実測定試料で評価対応）





バリデーションの評価方法及び基準

まとめ

- ◆ バリデーションの実施基準は基本的に**LBAのガイドラインに準じて設定**
- ◆ LBAガイドラインよりも**判定基準を緩める事例あり**
- ◆ 予想される変化に応じて、**適合基準を緩めることを許容しても良いと考える**（判定基準についてはアンケートを実施）
- ◆ キット添付品の標準物質を使用する場合、複数分析対象の標準物質が混合されており、**測定キットのロット変更時の検量線・QC試料調製には運用面での規定が必要**
- ◆ **選択性評価時の個体別試料及び標準物質添加濃度は各分析対象の内因性濃度を考慮して設定する必要がある**





バリデーション成立事例

Examples of Validation of Multiplex LBAs

<http://bioanalysisforum.jp/>



バリデーシヨンの成立事例1

項目		内容
対象		バイオマーカー測定（血漿）
プラットフォーム		FCM（Cytometric Bead Array）
評価の位置付け		信頼性基準
分析対象数		3
バリデーシヨ ン 項目	検量線	Buffer系で調製
	真度・精度	マトリックスに標準物質を添加して調製 3濃度で3日間
	直線性	3試料×4濃度（Bufferで希釈）
	安定性	マトリックスに標準物質を添加して調製
評価基準設定	検量線	検量線の R^2 を評価（99%以上）
	真度・精度	精度 $100 \pm 20\%$
	直線性	相対値が $100 \pm 20\%$ 以内, 決定係数（ R^2 ）が0.98以上
	安定性	初期値の $\pm 20\%$

<http://bioanalysisforum.jp/>



JBF バリデーシヨンの成立事例2

項目		内容
対象		バイオマーカー測定（細胞培養上清）
プラットフォーム		ECL
評価の位置付け		信頼性基準
分析対象数		2
バリデーシヨ ン項目	検量線	Buffer系で調製
	真度・精度	ECL測定：Buffer系で調製，6濃度，1回 細胞培養～測定：3ドナーの培養上清，3回
	直線性	なし（希釈倍率は一定として測定）
	安定性	細胞，培養上清
評価基準設定	検量線	真度100±30%以内（下限は100±50%）
	真度・精度	精度100±30%以内・30%以下（下限は 100±50%・50%）
	安定性	初期値の±30%以内

<http://bioanalysisforum.jp/>





JBF バリデーシヨンの成立事例3

項目		内容
対象		バイオマーカー測定（血漿）
プラットフォーム		Luminex
評価の位置付け		信頼性基準
分析対象数		6
バリデーシヨ ン項目	検量線	Buffer系で調製
	真度・精度	Buffer（キット添付QC）及びマトリックス系で5濃度で3日間
	直線性	3濃度
	安定性	マトリックス試料（標準物質未添加試料）
評価基準設定	検量線	真度100±30%
	真度・精度	真度100±30%, (Buffer系はキット基準値内) 精度30%以下
	直線性	基準なし
	安定性	真度100±30%

<http://bioanalysisforum.jp/>



JBF バリデーシヨンの成立事例4

項目		内容
対象		抗体測定（血漿）
プラットフォーム		Luminex
評価の位置付け		信頼性基準
分析対象数		12
バリデーシヨ ン項目	検量線	Buffer系で調製
	真度・精度	Buffer系で5濃度（n=3）で6日間
	MRD	マトリックスに標準物質を添加後，Bufferで希釈（5濃度，各n=4，4個体）
	安定性	マトリックス試料（標準物質添加試料）
評価基準設定	検量線	真度 $100 \pm 20\%$ （上限と下限は $100 \pm 25\%$ ） 定量下限蛍光強度(FI) - 3SD > ブランクのFI + 3SD
	真度・精度	真度 $100 \pm 20\%$ （上限と下限は $100 \pm 25\%$ ） 精度20%以下（上限と下限は25%以下）
	MRD	真度 $100 \pm 20\%$ ，精度20%以下
	安定性	真度 $100 \pm 25\%$

<http://bioanalysisforum.jp/>



バリデーシヨンの成立事例5

項目	内容	
対象	バイオマーカー測定（尿）	
プラットフォーム	Luminex	
評価の位置付け	GLP	
分析対象数	7	
バリデーシヨ ン項目	検量線	Buffer系で調製
	真度・精度	Buffer系（キット添付QC）で調製 3濃度, n=6, 1回. 2濃度, n=1, 3日.
	直線性	3濃度
	添加回収	2濃度
	安定性	マトリックス試料（標準物質未添加試料）
評価基準設定	検量線	真度100±25%以内（上限・下限は100±30%）
	真度・精度	真度100±30%以内, 精度30%以下
	直線性	真度100±25%以内
	添加回収	回収率100±25%以内
	安定性	初期値±25%以内

<http://bioanalysisforum.jp/>



バリデーシヨンの成立事例6

項目	内容	
対象	バイオマーカー測定（血漿）	
プラットフォーム	ECL	
評価の位置付け	GLP	
分析対象数	4	
バリデーシヨ ン項目	検量線	Buffer系で調製
	真度・精度	Buffer系で調製 4濃度, n=6, 1回. 4濃度, n=2, 3日.
	直線性	7濃度
	添加回収	2濃度
	安定性	マトリックス試料（標準物質添加試料）
評価基準設定	検量線	真度100±20%以内（上限・下限100±25%）
	真度・精度	真度100±25%以内, 精度25%以下
	直線性	真度100±25%以内
	添加回収	回収率100±25%以内
	安定性	初期値±25%以内

<http://bioanalysisforum.jp/>



測定時の運用

Operation of Multiplex LBAs

<http://bioanalysisforum.jp/>



JBFF QC試料の設定方法

1. キット添付QC試料を使用

DGメンバーの経験：キット添付QC試料が添付文書記載の適合基準を満たさないことがある。

2. QC試料を調製

- ✓ 標準物質からBufferを使用して調製する。
- ✓ マトリックス使用の場合，標準物質未添加で分析対象に適切な濃度のマトリックス試料があれば使用する。測定値が得られない分析対象については，マトリックスにキット添付標準物質を添加する。プレート上のQC試料が増加してしまうデメリットがある。

3. 設定なし

非GLP試験の場合，キットにQC試料がない場合など





JBFF バッチの採用基準

- ◆ 分析対象ごとに検量線及びQC試料の測定結果を判定し、適合基準を満たさなかった分析対象のみ再測定を実施する。
- ◆ 検量線及びQC試料の適合基準を満たさなかった分析対象が少数であれば手技に問題はないとして全分析対象の測定結果を採用するという事例もあった。

「トラブル事例 トラブル①：一部の分析対象で適合基準を満たさない」 47ページ参照



 **実試料の再測定基準****1. 定量上限を超えた場合**

- ✓ 希釈再測定を実施

2. 二重測定のCV > 20%

- ✓ DGメンバーはCVを20%以上に設定した経験がある
- ✓ 複数の分析対象を測定し、ある1実試料の1つの分析対象のみのCVが適合基準を満たさない場合は、再測定を実施

3. Luminexにおいて、Beadsカウント < 50

上記のいずれか又は複数を設定する例があった



JBF 再測定の実施方法

- ◆ 初回測定と同様に試薬を調製し、測定を実施する。再測定の対象となる分析対象のみのデータ取得及び解析を実施する。
- ◆ Luminexにおいて、Beadsの凝集がみられ、Beadsカウントが50未満となった場合、プレートを洗浄して再度測定するとBeadsの凝集が改善され、Beadsカウントが上昇する場合がある。

「トラブル事例 トラブル① ～分類②の対処法（DGメンバーの見解）～」50～51ページ参照





JBFF 測定キットのロット間差の担保

- ◆ 同一試験では同一ロットを使用する.
- ◆ 同一被験者は同一ロット, 同一プレートでの測定が好ましい.
- ◆ ロットが変更となる場合は, 標準物質のロットを統一したり, ロット変更時に新旧ロットでQualification Runを実施する. 標準物質のロットが変更となる場合は, 実試料を新旧ロットで測定して定量値を確認することを考慮する.
- ◆ ロット間差を確認しないこともある.

「トラブル事例 トラブル③：標準物質のロット変更」及び
「トラブル④：キットのロット変更」57～62ページ参照



トラブルと対処

Troubleshooting

<http://bioanalysisforum.jp/>



トラブル事例

DGメンバーの意見, アンケートで多かった事例

1. 一部の分析対象で適合基準を満たさない
2. 希釈倍率の設定が難しい
3. 標準物質のロットにより定量範囲が変わってしまう
⇒対応についてDGメンバーの見解を協議

その他の事例

4. キットのロット変更による事例
5. クロストークが疑われる事例
⇒事例と対応について紹介





トラブル①：一部の分析対象で適合基準を満たさない
～DGメンバー、アンケートで挙げられた事例～

DGメンバー

一部の実試料において複数分析対象のうちの**1分析対象のみreplicateのCVのバラつきが大きく**、データの採否を悩んだ。

(複数意見, アンケートでも同様の意見)

DGメンバー

キットを使用した測定で常に**QC試料が適合基準外れる分析対象がある**。

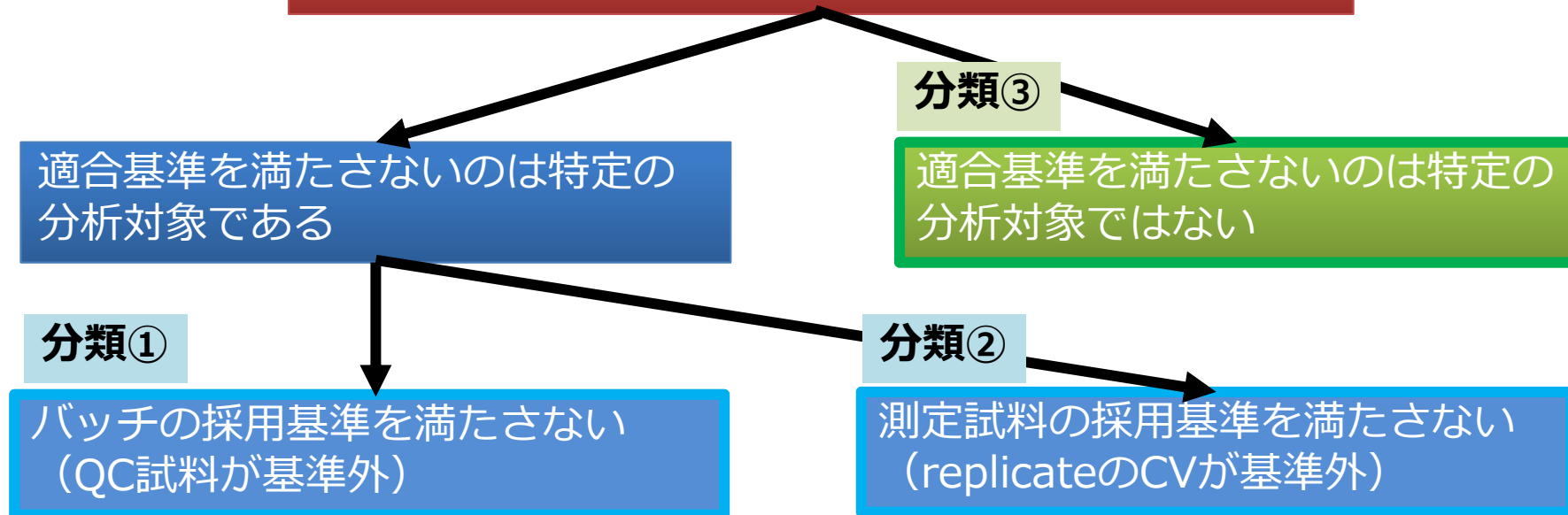
(複数意見)

一部の分析対象で適合基準を満たさない事例があった
という声が多数



トラブル①：一部の分析対象で適合基準を満たさない
～事例分類～

一部の分析対象で適合基準を満たさない



意見が多かったのは分類①②の事例
DGメンバーで分類①②③の事例の対処法について
見解をまとめた

トラブル①：一部の分析対象で適合基準を満たさない
～分類①の対処法（DGメンバーの議論）～

分類①

特定の分析対象がバッチの採用基準を満たさない
（QC試料が基準外）

対処法1: キット付属以外のQC試料を準備する



キット付属のQC試料が採用基準を満たさないことが多いです。

（複数意見）

キット付属以外のQC試料を準備すると改善することもあるので、
まずは「**標準物質からQC試料を調製する**」ことを試します。

（複数意見）



標準物質から調製したQC試料でもダメだった経験があります。
そのときは**血清などの生体試料**を小分け保存してQC試料として
使用しました。ただ、**安定性の担保**が難しいです。

トラブル①：一部の分析対象で適合基準を満たさない
～分類①の対処法（DGメンバーの議論）～

分類①

特定の分析対象がバッチの採用基準を満たさない
（QC試料が基準外）

対処法2：救済措置を設ける

分析の**目的に応じて採用基準を変える**という選択肢もありますね。例えば、「QC試料のシグナルの濃度依存性を確認できたら大小関係については信頼できる」といった対応も可能ではないでしょうか。

「基準外となった分析対象が少数であれば手技に問題はないとして全分析対象の測定結果を採用する」とした経験もあります。



これらの場合、**データの解釈には注意が必要**ですね。スクリーニングや探索目的にのみ使用した方が良いかもしれません。



トラブル①：一部の分析対象で適合基準を満たさない
～分類①の対処法（DGメンバーの議論）～

分類①

特定の分析対象がバッチの採用基準を満たさない
(QC試料が基準外)

対処法3: シングルプレックス測定を試す

シングルプレックス測定で改善することもあるので、重要な因子であれば**シングルプレックス測定するのも一案**です。

マルチプレックス測定が選択されている理由が「少量の試料で複数分析対象を評価したい」という場合、分けて測定するのはできれば避けたいですね。

トラブル①：一部の分析対象で適合基準を満たさない
～分類①の対処法（DGメンバーの見解）～

分類①

特定の分析対象がバッチの採用基準を満たさない
(QC試料が基準外)

第1選択：キット付属以外のQC試料を使用する

- キット付属の標準物質からQC試料を調製する
- 生体試料（例：血清）をQC試料とする

第2選択：バッチ採用基準に救済措置を設ける

- 分析の目的に応じてQC試料の適合基準を変える
- 基準外となった分析対象が少数であれば手技に問題はないとして全分析対象の測定結果を採用する

第3選択：基準を満たさない分析対象はシングルプレックス測定する

トラブル①：一部の分析対象で適合基準を満たさない
～分類②の対処法（DGメンバーの議論）～

分類②

測定試料の採用基準を満たさない
(replicateのCVが基準外)

まずは再測定することが多いですね。再測定する試料がない場合は初回分析値を参考値として報告するか欠測値としています。

(複数意見)

基本的には全ての処理をやり直しますが、**LuminexでBeads count<50のためにCVの基準値を外れた場合**、同時にプレートに調製した検量線、QC試料、**該当測定試料の残余を再測定に供することも許容されるのではないのでしょうか。**

再測定でも**同じ試料が基準外となる**ことがあり、**マトリックス成分が影響している可能性**を考えています。この場合は初回分析値を参考値として報告するか欠測値とすることが多いです。

トラブル①：一部の分析対象で適合基準を満たさない
～分類②の対処法（DGメンバーの見解）～

分類②

測定試料の採用基準を満たさない
(replicateのCVが基準外)

 第1選択：再測定する

- 最初の処理から全てやり直す
- 同じプレートから再測定する（Luminexの場合）

 第2選択：参考値扱いとする/欠測値とする

- 再測定に必要な量の試料がない場合は初回分析値を参考値とする
- 再測定でも同じ試料の同じ分析対象のCVが基準外となった場合は初回分析値を参考値とする

トラブル①：一部の分析対象で適合基準を満たさない
～分類③の対処法（DGメンバーの議論）～

分類③

適合基準を満たさないのは特定の分析対象ではない



この場合も**再測定**することが多いですね。再測定する試料がない場合は初回分析値を参考値として報告するか欠測値としています。

（複数意見）

マルチプレックス測定全ての分析対象で適合基準を満たす確率はシングルプレックス測定よりも低いので、確率論的に妥当であればより**緩和した基準を設定**しても良いのでは？

（アンケートでも同様の意見）



その場合、「適合基準を満たさないのは特定の分析対象ではないことを示す」「緩和基準は妥当であることを示す」必要があるため、バリデーション試験が重くなりますね。長期・大規模・再測定が難しい試験で考慮すれば良いのではないのでしょうか。緩和基準設定方法の詳細は要議論と思います。


トラブル①：一部の分析対象で適合基準を満たさない
～分類③の対処法（DGメンバーの見解）～

分類③

適合基準を満たさないのは特定の分析対象ではない

**第1選択：再測定する**

- マルチプレックス測定で再測定し，初回測定で基準外となった分析対象のみ再測定結果を採用する

**第2選択：参考値扱いとする/欠測値とする**

- 再測定に必要な量の試料がない場合

**第3選択：救済措置を設定する**

- 多数の分析対象が同時にバッチ採用基準を満たす確率はシングルプレックス測定より低い⇒確率を考慮してバッチ採用基準を緩和する



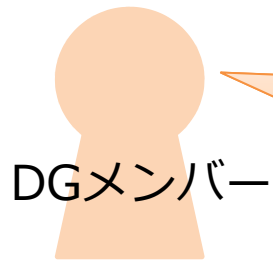
トラブル②：希釈倍率の設定が難しい
～DGメンバー、アンケートで挙げられた事例～



DGメンバー

分析対象によって適した希釈倍率が異なる

(複数意見)



DGメンバー

実試料分析における適切な希釈倍率を事前に設定することが難しい

(アンケートでも同様の意見)

**最適な希釈倍率は測定対象ごとに異なる
⇒希釈倍率をどのように設定しているか？**

トラブル②：希釈倍率の設定が難しい ～対処法（DGメンバーの議論）～

希釈倍率をどのように設定すべきか？



キット指定のMRDで一律希釈することが多いです。最適の希釈倍率が分析対象ごとに若干異なる場合は中間の希釈倍率とします（例：2, 4, 8倍の場合は4倍とする）。**大きく異なる場合は複数の希釈倍率に分ける**他ないですが、マルチプレックス測定の特長が生かしきれないのが残念ですね。

- ①希釈直線性・希釈平行性が成立する，マトリックスの影響が小さくなる希釈倍率
- ②測定試料が定量範囲内に入る希釈倍率の両方を考慮する必要があるのでは？



①はキット指定のMRDで概ね満たすのではないのでしょうか（必要に応じてバリデーション試験で確認）。②は可能であれば事前検討で評価したいですが，入手が難しい場合は①のみ考慮して設定することになりますね。



トラブル②：希釈倍率の設定が難しい
～対処法（DGメンバーの見解）～

希釈倍率をどのように設定すべきか？

第1選択：キット指定のMRDで一律希釈する

- 最適な希釈倍率が分析対象ごとに若干異なる場合は中間の希釈倍率とする

第2選択：複数の希釈倍率に分けて測定する

- 最適な希釈倍率が分析対象ごとに大きく異なる場合（細胞培養上清等に多い）

<http://bioanalysisforum.jp/>



トラブル③：標準物質のロット変更
～DGメンバー，アンケートで挙げられた事例～

DGメンバー

標準物質（Calibrator Blend）濃度がロット依存のため、
キットのロットが変わると定量範囲が変わってしまう

（複数意見，アンケートでも同様の意見）

標準物質は複数の分析対象の混合物として提供されており、
ロットごとに含有比が異なる
⇒ロット変更時の対応について苦慮する声が多い

トラブル③：標準物質のロット変更
～対処法（DGメンバーの議論）～

標準物質のロットが変わると定量範囲も変わってしまう

対処法1：同一試験内では標準物質のロットを統一する

標準物質のロットが試験内で変わらないように準備します。

（複数意見）

できればロット変更は避けたいのですが、長期の試験や想定以上に再測定が発生した場合に、**ロット変更せざるを得なかった**経験があります。

（複数意見）

トラブル③：標準物質のロット変更 ～対処法（DGメンバーの議論）～

標準物質のロットが変わると定量範囲も変わってしまう

対処法2：ロットごとに定量範囲を変える

バリデーション試験(ロット変更前)の検量線範囲が10-1000pg/mL、ロット変更後の検量線範囲が12-1200pg/mLの場合、ロット変更後の定量範囲はどうしますか？

ロット変更時にQualification runを実施し、**ロット変更後の検量線範囲を定量範囲とします**。上記の例の場合、定量範囲は12-1200pg/mLとし、定量下限未満の試料は「BLQ (<12pg/mL)」等LLOQ濃度がわかるように注釈をつけて報告します。

(複数意見)

定量範囲はバリデーション試験の検量線範囲と変更後ロットでの検量線範囲の重複部分としたこともあります。上記の例の場合、定量範囲は12-1000pg/mLとしました。

トラブル③：標準物質のロット変更 ～対処法（DGメンバーの議論）～

標準物質のロットが変わると定量範囲も変わってしまう

対処法3：分析対象ごとに標準物質を入手する

標準物質が複数の分析対象の混合物として提供されていることが原因なので、**分析対象ごとに市販されれば良い**のですが・・・

(アンケートでも同様の意見)

キットのメーカーに依頼したことがあるのですが、その時は**分析対象ごとの提供は不可との回答**でした。

別メーカーのリコンビナント品を購入して標準物質として使用することも考えられますが、予備検討も必要なので手間や試験規模を考慮して判断すべきですね。また、キットの標準物質と異なる結果が出た場合、判断に迷うかもしれません。

トラブル③：標準物質のロット変更 ～対処法（DGメンバーの見解）～

標準物質のロットが変わると定量範囲も変わってしまう

第1選択：試験内でロットを統一する

- 長期試験や想定以上に再測定が発生した場合は不可

第2選択：ロットごとに定量範囲を変更する

- 定量範囲はロット変更後の検量線範囲とする
- 定量範囲はバリデーション試験とロット変更後の検量線範囲の重複範囲とする
- いずれもLLOQ濃度がわかるように注釈に記載して結果を報告する

第3選択：分析対象ごとに標準物質を入手する

- メーカーに依頼したが不可だったという事例あり
- キットと別メーカーの標準物質を購入する（予備検討の手間や試験規模を考慮して判断）



トラブル④：キットのロット変更 ～事例と対応～

DGメンバー



キットのロット変更後に特定の分析対象のキット添付のQC試料がキット記載の採用基準を満たさなくなりました。

他の分析対象は基準を満たしていたため、該当ロットのキットに問題はないと判断しました。試験計画書でQC試料を精度管理としていたが、該当ロットの分析対象にはバッチ採用基準を設定せず、基準を満たさない分析対象も測定値を採用しました。

以降の試験では同一被験者の全ての時点の実試料が揃ってから同一測定バッチで測定を実施するようにしていますが、長期の試験の場合は安定性も考慮する必要がありますね。また、「QC試料のシグナルの濃度依存性を確認できたら大小関係については信頼できる」のように分析の目的に応じて基準を緩和することもあります。



トラブル⑤：クロストーク ～事例と対応～

DGメンバー

ある分析対象の未知試料のシグナルが他の分析対象よりも大幅に高く、他の分析対象の測定結果が不安定になったことがあります（QC試料の真度が基準外となる、CVが大きくなる）。

高シグナルの分析対象のみシングルプレックスで測定したところ、結果が安定したことから、クロストークを疑っています。

バリデーション試験でクロストークを評価するには「特定の分析対象の標準物質だけ含量を多くしたときの影響を確認する」必要がありますが、標準物質を個別に入手できないことが多いので難しいですね。実試料でクロストークが疑われる場合に評価すれば良いと思います。

<http://bioanalysisforum.jp/>



アンケート結果

Results of a Questionnaire Survey

<http://bioanalysisforum.jp/>





アンケート概要

- ◆ 実施期間： 2019年12月9日～12月20日
- ◆ 設問数： 19問
- ◆ 収集回答数： 27件

<http://bioanalysisforum.jp/>

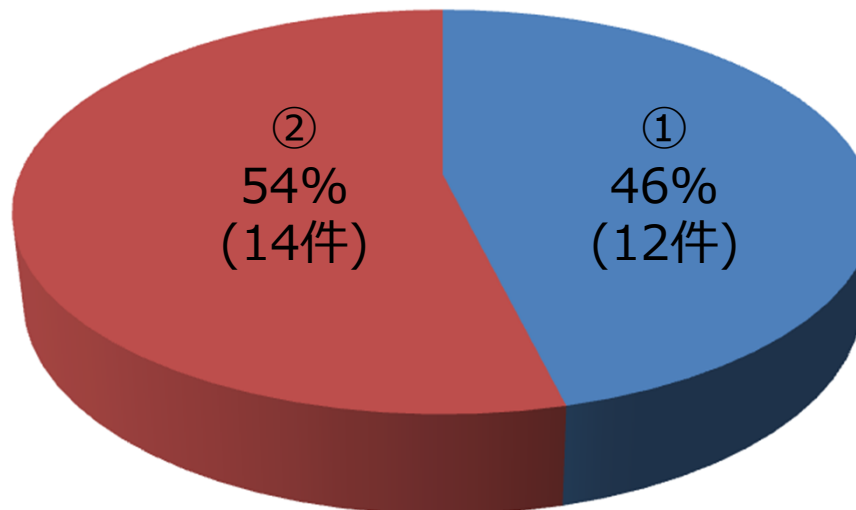




Q1 所属について

①製薬企業

②CRO

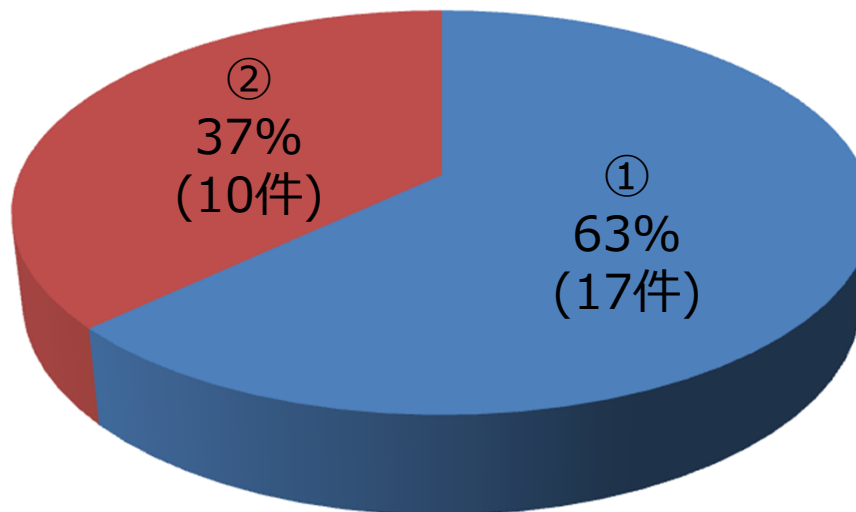


<http://bioanalysisforum.jp/>



Q2 マルチプレックス測定の実験について

- ① 経験あり
- ② 経験なし



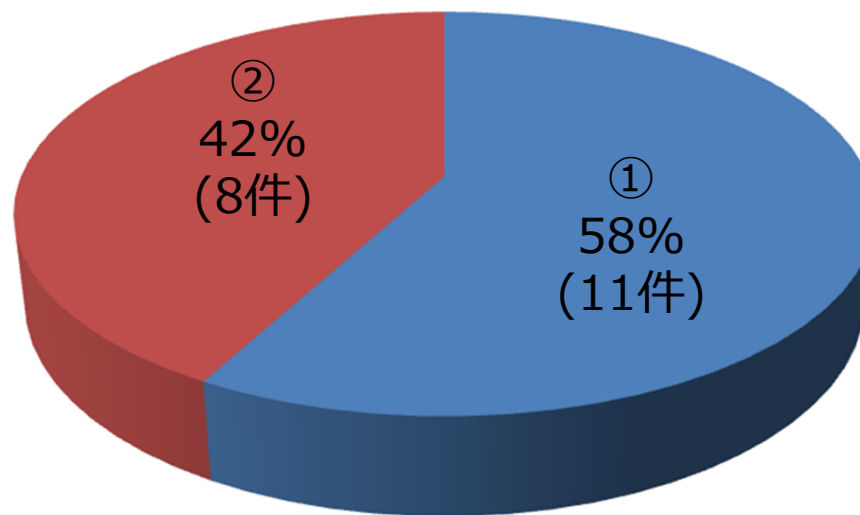
<http://bioanalysisforum.jp/>



Q3 プラットフォームについて

- ① ECL
- ② Luminex

回答者背景			
①	ECL	1試験	2
		2~4試験	7
		5試験以上	2
②	Luminex	1試験	0
		2~4試験	3
		5試験以上	5

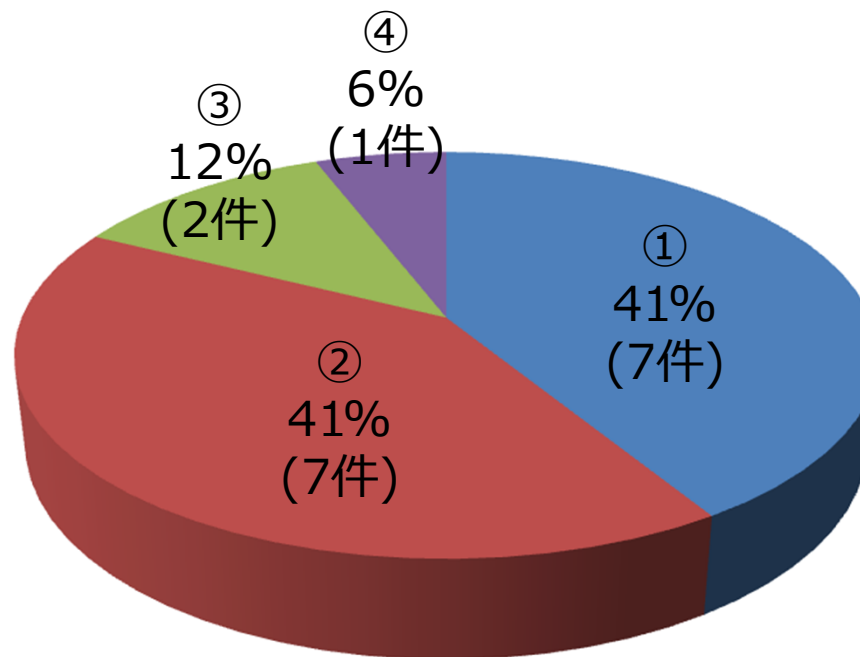


<http://bioanalysisforum.jp/>



Q4 選択の理由について

- ①少量の試料で複数項目を評価したい場合
- ②多項目を探索的・網羅的に測定したいとき
- ③コストや作業時間の低減のため
- ④特殊な試料の場合

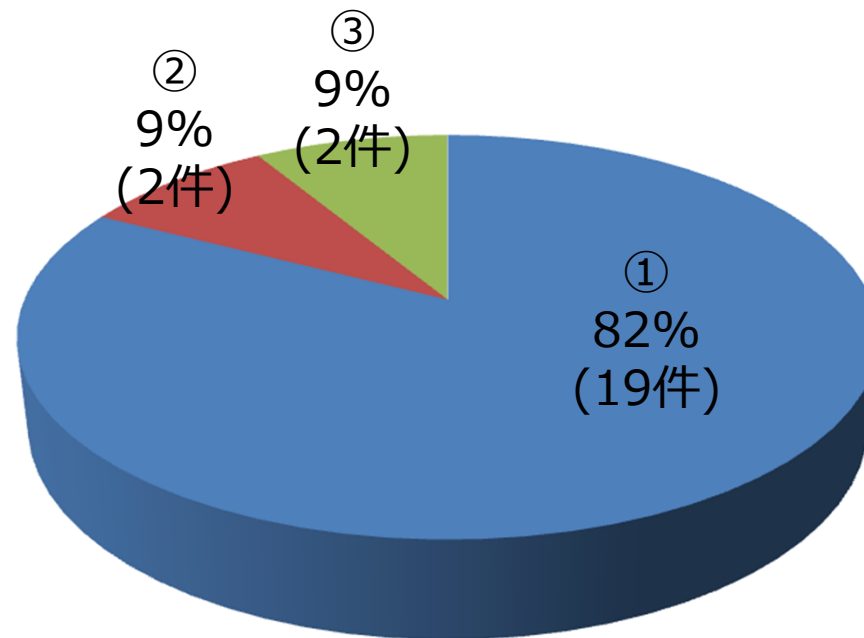




Q5 使用目的について

- ① バイオマーカー測定
- ② ADA測定
- ③ イムノグロブリンのサブクラスやアイソタイピング

回答者背景			
①	バイオマーカー測定	1試験	2
		2~4試験	8
		5試験以上	7
②	ADA測定	1試験	0
		2~4試験	2
		5試験以上	0
③	イムノグロブリンのサブクラスやアイソタイピング	1試験	2
		2~4試験	0
		5試験以上	0



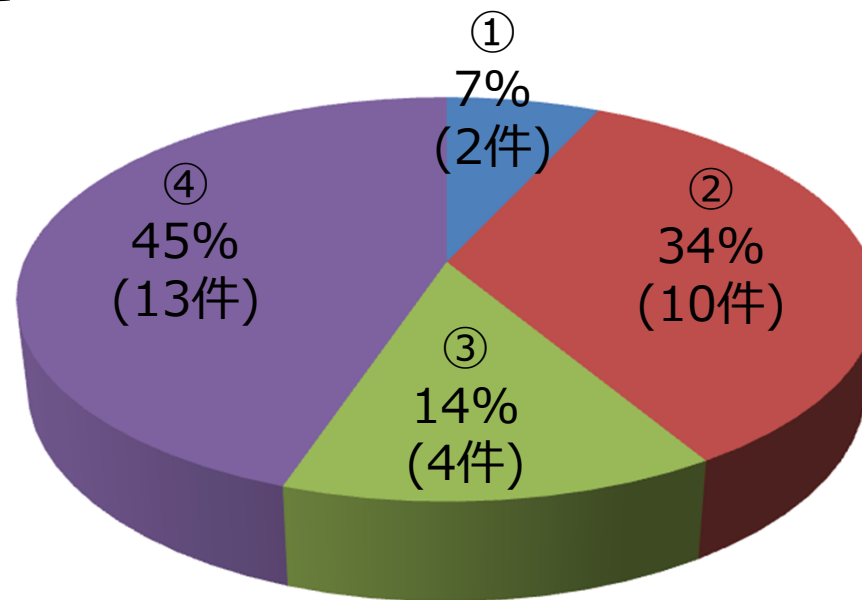
http://bioanalysisforum.jp/



Q6 分析対象について

- ①動物の細胞株，細胞培養上清など
- ②動物の血漿，血清，尿など
- ③ヒトの細胞株，細胞培養上清など
- ④ヒトの血漿，血清，尿など

回答者背景				
動物	①	細胞株，細胞培養上清 など	1試験	2
			2～4試験	0
			5試験以上	0
	②	血漿，血清，尿など	1試験	1
			2～4試験	7
			5試験以上	2
ヒト	③	細胞株，細胞培養上清 など	1試験	1
			2～4試験	1
			5試験以上	2
	④	血漿，血清，尿など	1試験	5
			2～4試験	7
			5試験以上	1

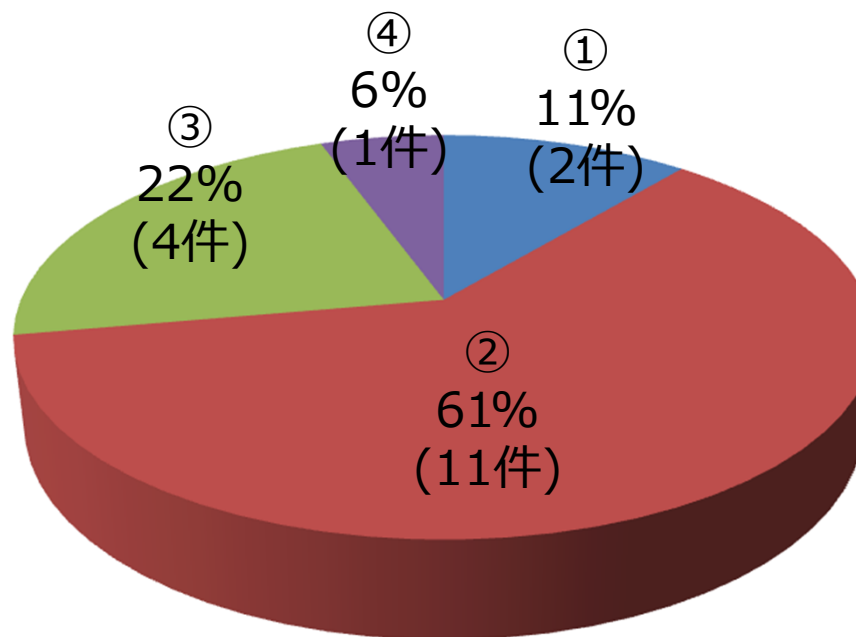


<http://bioanalysisforum.jp/>



Q7 プラットフォームの選択において優先する事項について

- ①使用する試料量
- ②再現性の良さ
- ③スループットの良さ
- ④過去の実績



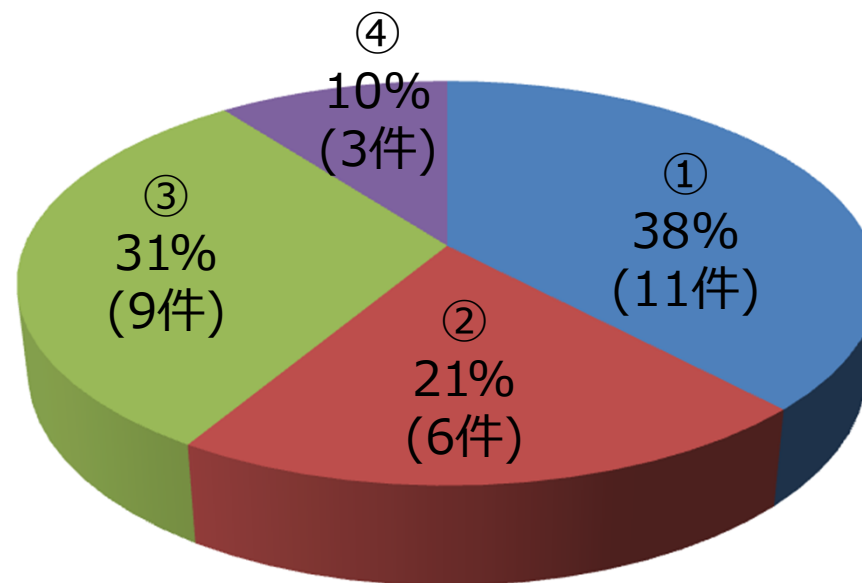
<http://bioanalysisforum.jp/>



Q8 データの位置づけについて

- ①探索・検討レベル
- ②社内意思決定または非GLP試験レベル
- ③信頼性基準試験レベル
- ④GLP試験レベル

回答者背景			
①	探索・検討レベル	1試験	3
		2~4試験	5
		5試験以上	3
②	社内意思決定または非GLP試験レベル	1試験	2
		2~4試験	3
		5試験以上	1
③	信頼性基準試験レベル	1試験	4
		2~4試験	4
		5試験以上	1
④	GLP試験レベル	1試験	1
		2~4試験	1
		5試験以上	1



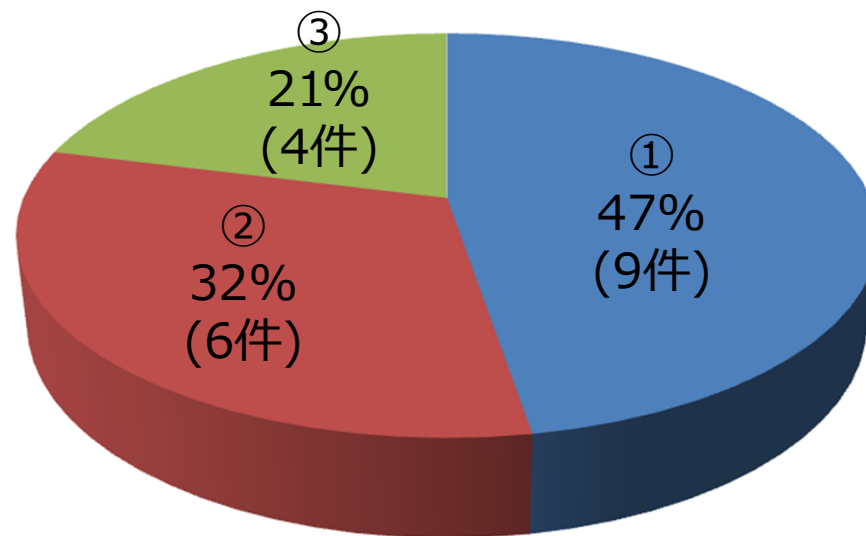
<http://bioanalysisforum.jp/>



Q9 バリデーションの経験について

- ① ECLの経験あり
- ② Luminexの経験あり
- ③ 経験なし

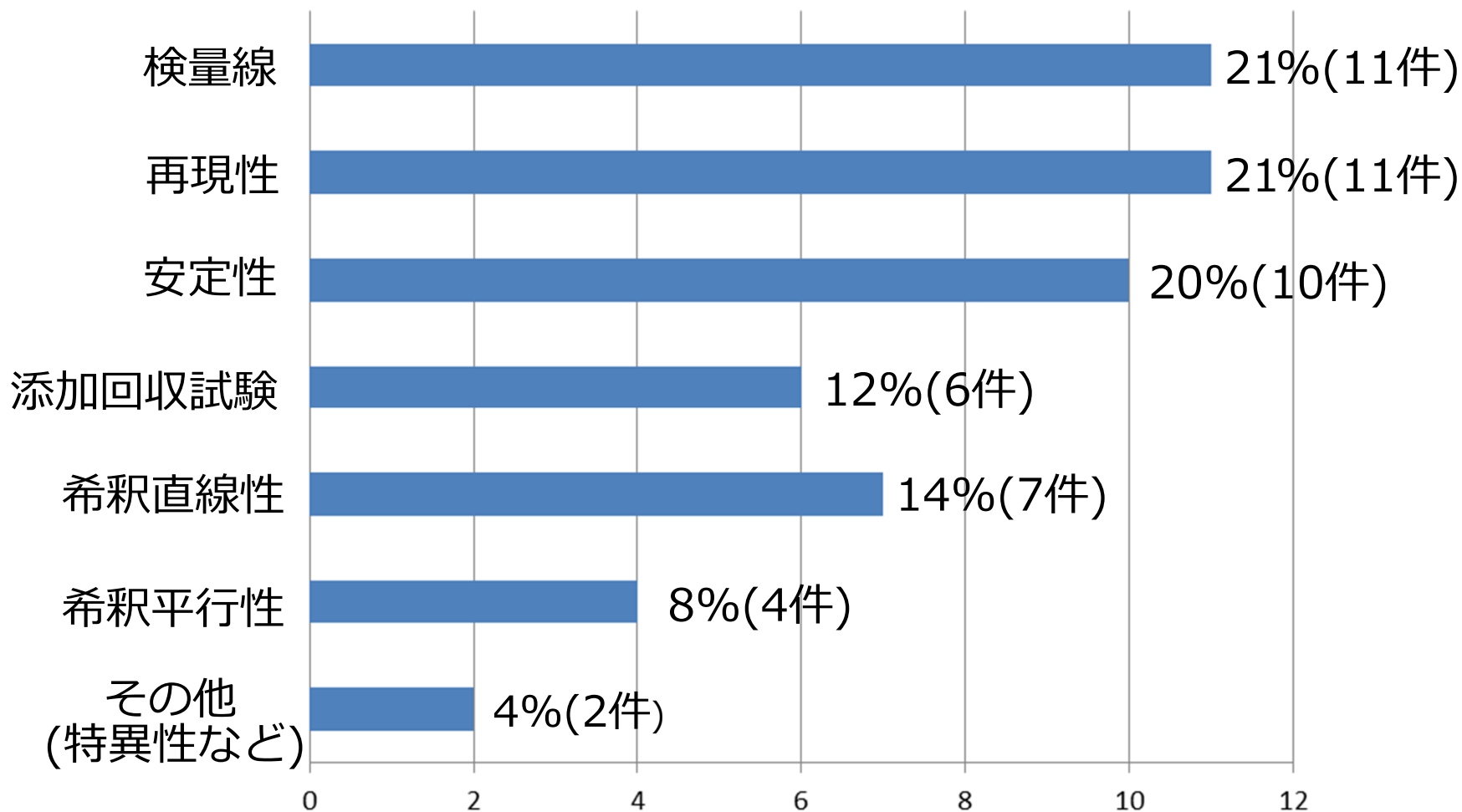
回答者背景			
①	ECL	1試験	5
		2~4試験	3
		5試験以上	1
②	Luminex	1試験	4
		2~4試験	0
		5試験以上	2
③	経験なし		4



<http://bioanalysisforum.jp/>



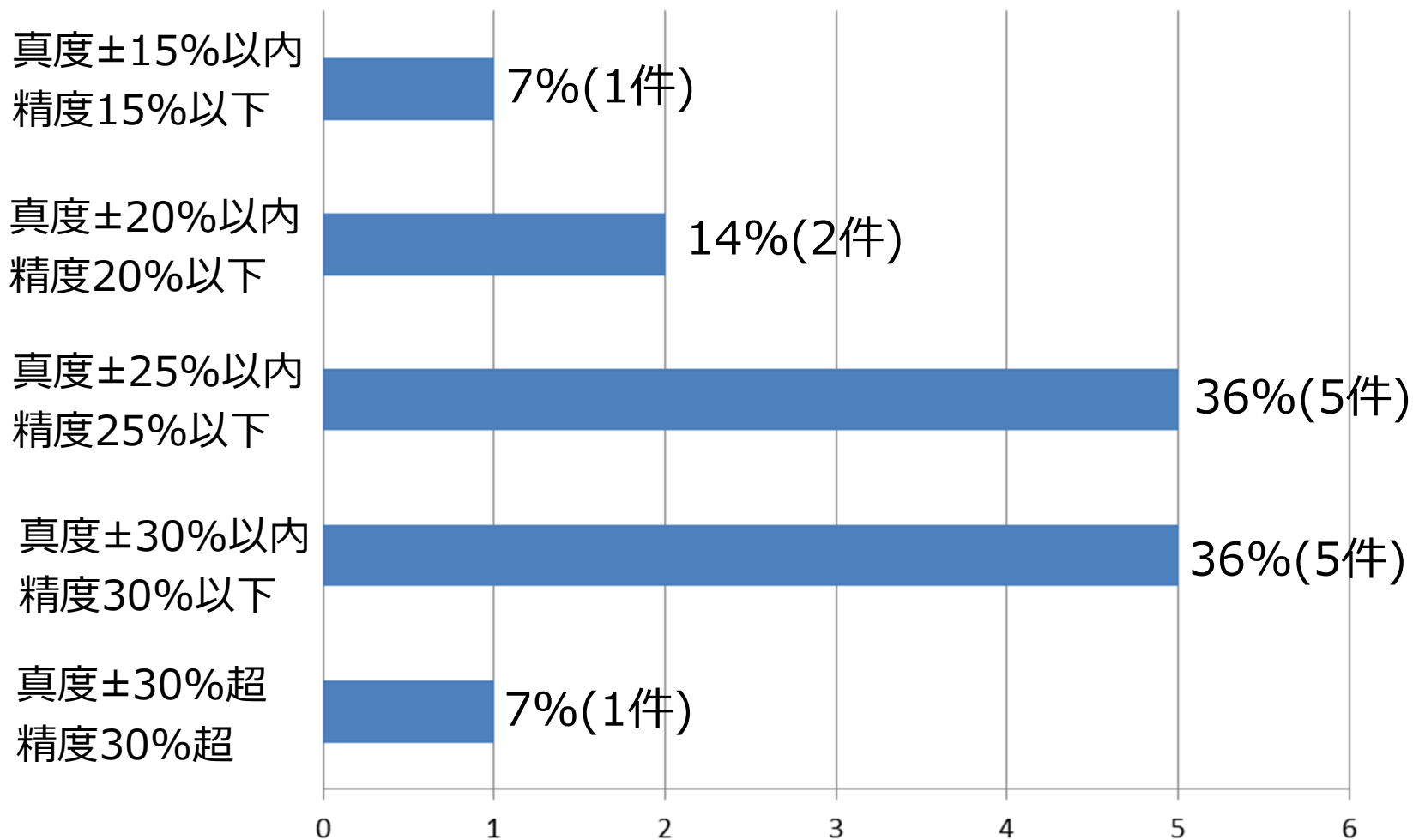
Q10 バリデーションの評価項目について(ECL)



<http://bioanalysisforum.jp/>



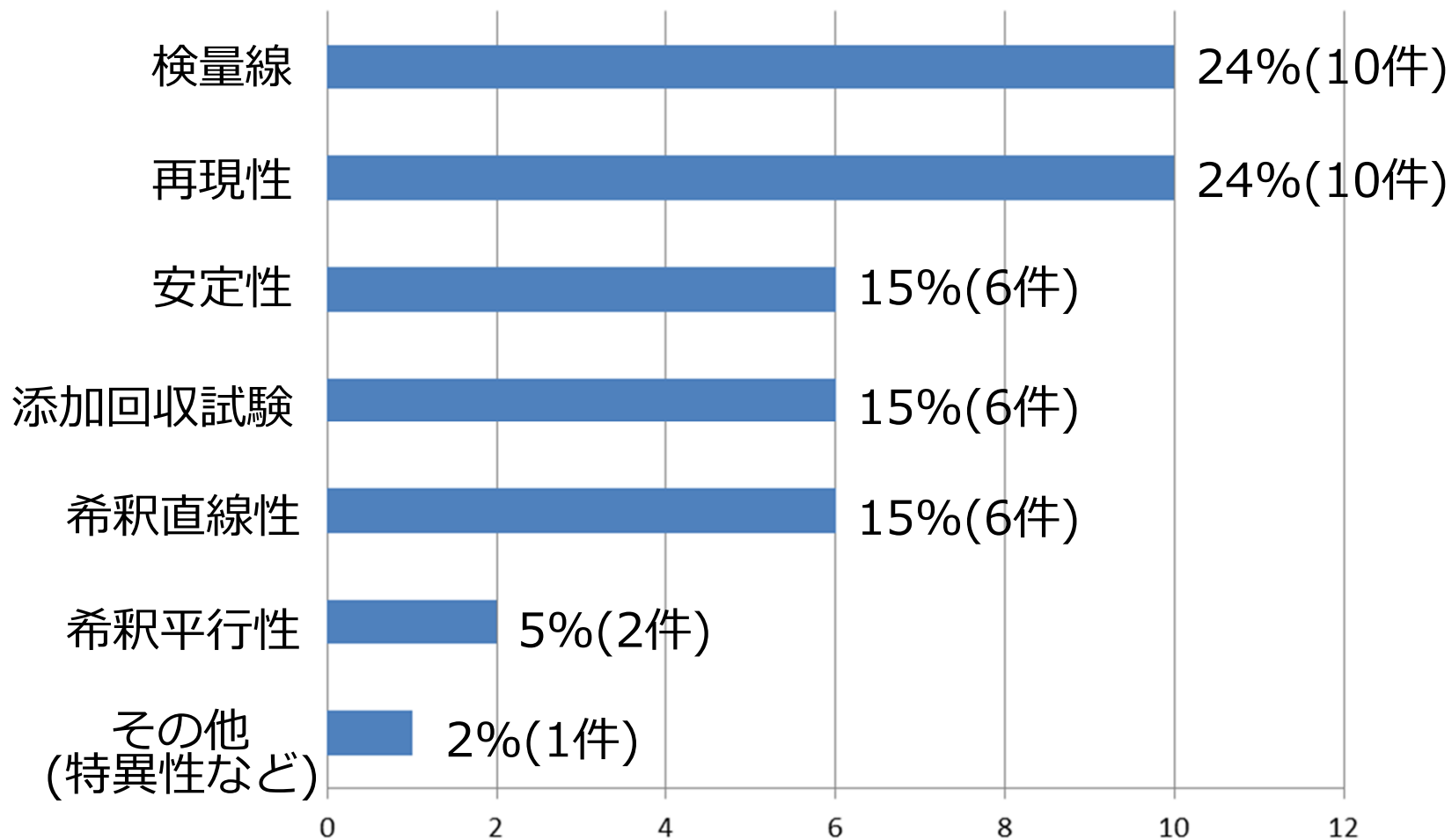
Q11 再現性の適合基準について(ECL)



<http://bioanalysisforum.jp/>



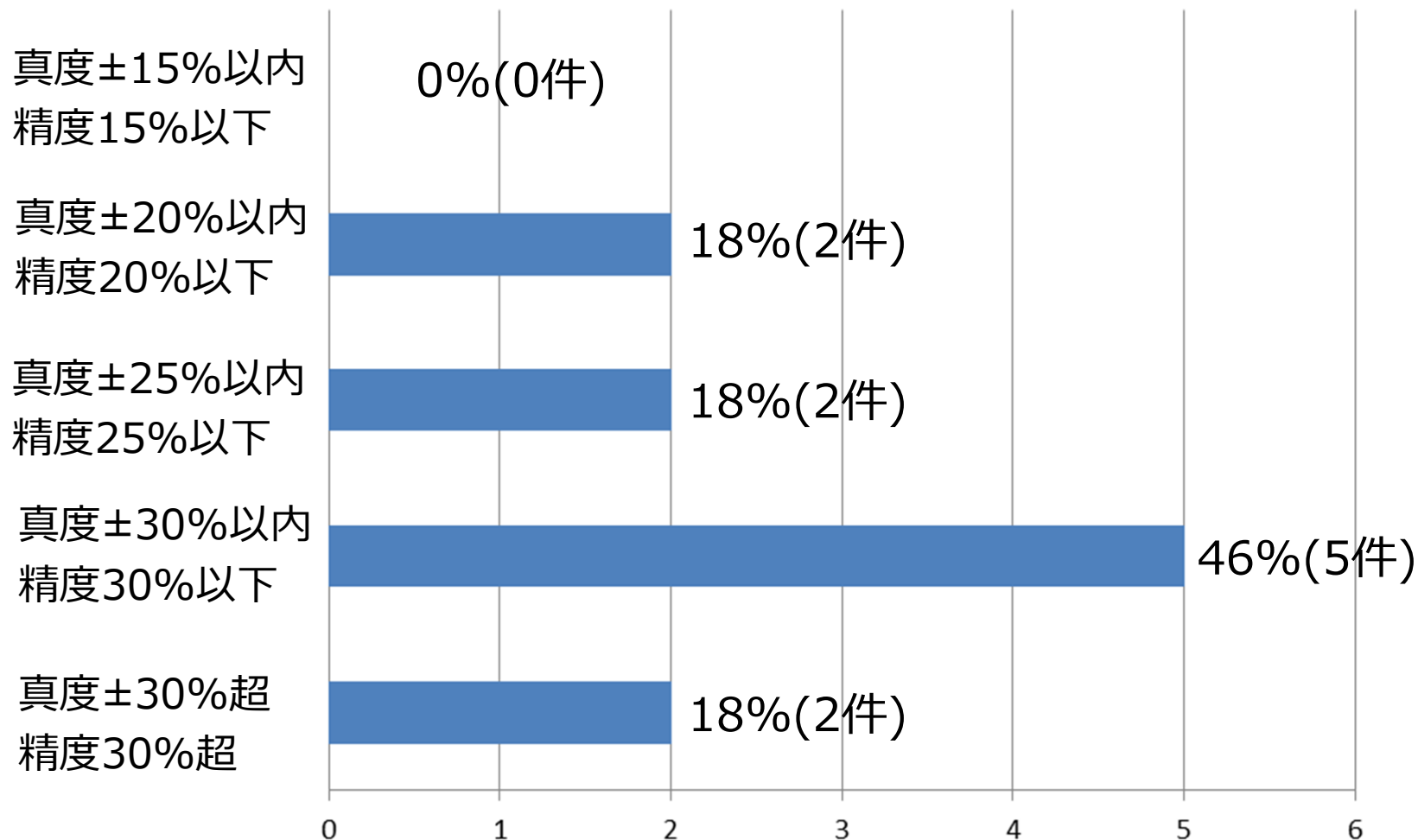
Q12 バリデーシヨンの評価項目について(Luminex)



<http://bioanalysisforum.jp/>



Q13 再現性の適合基準について(Luminex)

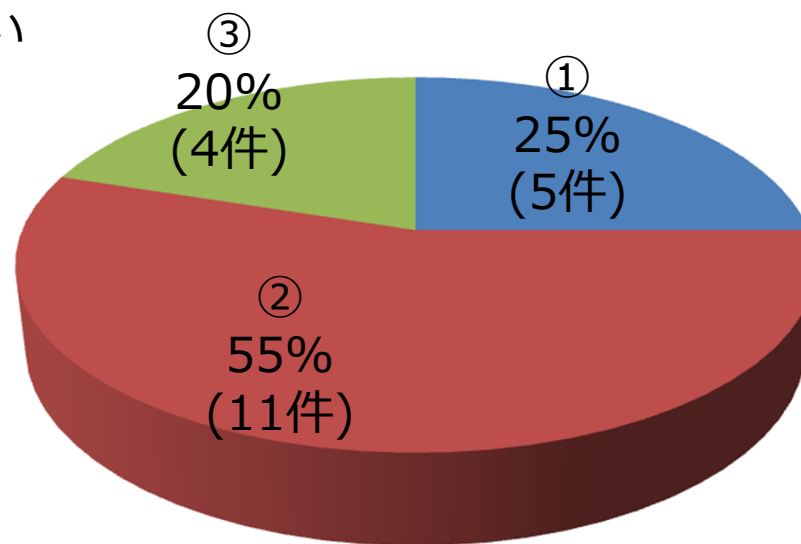


<http://bioanalysisforum.jp/>



Q14 バリデーションの適合基準について

- ①基準から外れた分析対象の結果は使用不可としている
- ②測定系の特性を理解した上で結果を考察に使用している
- ③その他
 - ・状況によって①か②にしている.
 - ・"そのレベルの分析法" として, データの採用及び評価に使用する.
 - ・結果を参考値として使用する.
 - ・基準を満たさなかったことがない

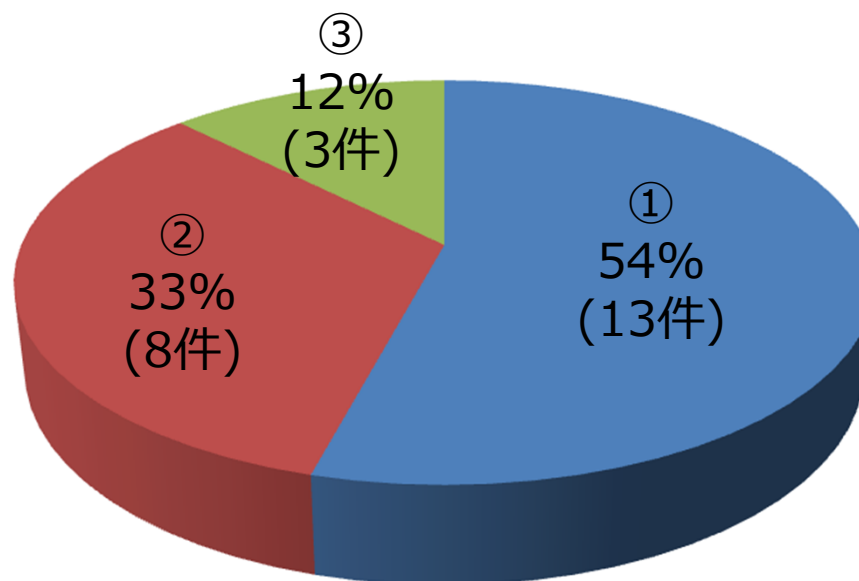


<http://bioanalysisforum.jp/>



Q15 QC試料の設定について

- ①キット付属のQCを使用している
- ②自社で作成した試料を設定している
- ③設定していない

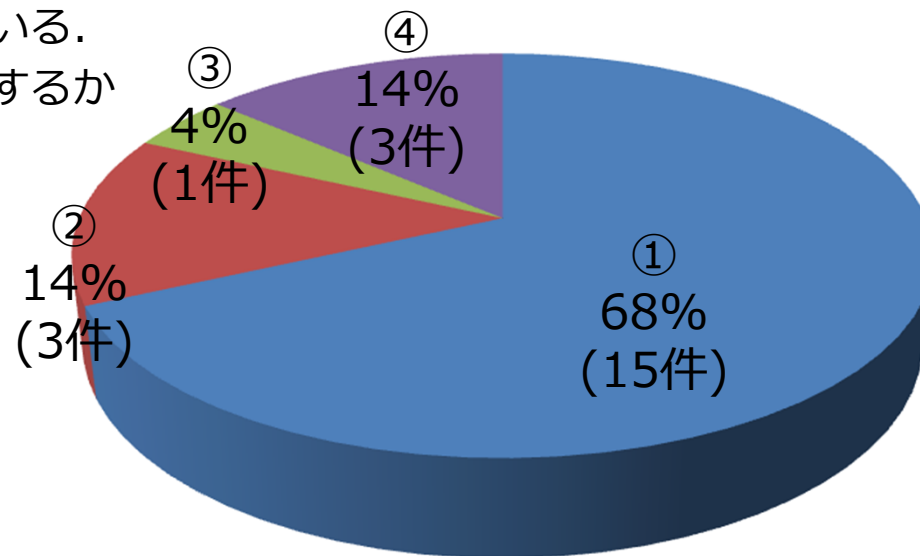




Q16 QC試料が適合基準を外れた場合について

- ①QCが外れた分析対象を再測定している
- ②10項目中8項目が基準を満たしていればOKなどの救済処置を設定している
- ③QC試料の値は参考値として，基準では管理していない
- ④その他

- ・状況によって①②③のどれかにしている.
- ・目的次第で再測定するか，参考値とするか判断する.
- ・再測定が困難という場合がありえる.

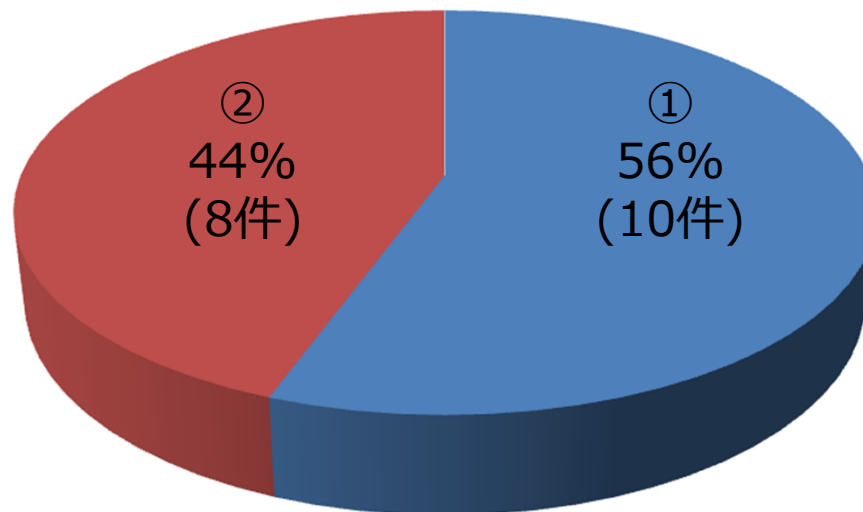


ysisforum.jp/



Q17 キットのロット間差について

- ①担保している(その場面に合ったらする)
- ②担保していない



<http://bioanalysisforum.jp/>



Q17 キットのロット間差について

[担保している場合の方法]

- ◆ 別ロットのキット間で同一試料を測定し、データを比較して担保している。更に、それぞれのロットで検量線を作成してQCと共に管理図を作成して品質を保証している。
- ◆ 新ロットのキットと標準品から作製した検量線を使用し、旧ロットの標準品で作製したQCを測定して基準値以内に入れば担保できたと考える。
- ◆ 同一試料を測定し、乖離度30%以内であることを確認する。
- ◆ 検量線及び真度精度を確認する。
- ◆ 一方で検量線を作成、両ロットのQC試料の真度で評価する。

Q17 キットのロット間差について

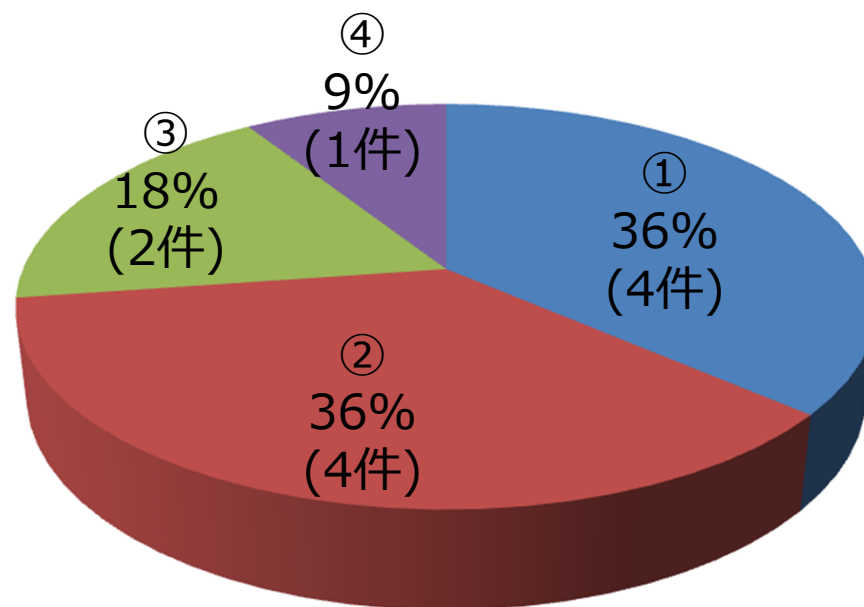
[担保していない場合の理由]

- ◆ 試験内でロットが変わらないようにしている.
- ◆ それぞれのロットで検量線を作成して測定しているため問題無いと考えている.
- ◆ 実施したほうが良いと思うが、費用などの面からそこまではしていない.
- ◆ 経験している試験がレギュレーション範囲外であることと、検量線と精度管理QCでバッチごとに確認しているため.
- ◆ 使用ロットでデータ採用基準を満たすことを確認のうえ使用する.



Q18 トラブルについて

- ①特定の分析対象が基準外となる
- ②希釈倍率設定
- ③標準品のロット変更
- ④キットのロット間差





Q18 トラブルについて

[特定の分析対象が基準外となる]

- ◆ QCの真度, 精度が基準内に入らないことが多い.
- ◆ 一部基準を満たさない物質があった.

[希釈倍率設定]

- ◆ 広い希釈範囲でパラレリズムが成立するマーカーと成立しないマーカーがあった. 成立しないマーカーは狭い希釈範囲とした.
- ◆ 各項目での検出濃度範囲がバラバラで, 複数希釈率を設定し, 複数回測定が必要となった.



Q18 トラブルについて

[標準品のロット変更]

- ◆ ロットによってStock solutionの濃度が変わるので、ロットごとに検量線を設定した。
- ◆ kit付属のキャリブレーターのロット変更（測定対象の混合物の含有比率が違う）で検量線範囲を変更せざるをえなかった（ECL）。

[キットのロット間差]

- ◆ ロット間差が大きい。

Q19 その他議論したいことなど

- ◆ 申請資料に使うなどの実用可能と考える線をどこに引くか提案してほしい。また、探索目的として使用するようなレベルの再現性や選択性については、明らかにしたうえで議論してほしい。
- ◆ マルチプレックスにガイドラインの基準は適さない。探索的な測定が多いので、Fit for purposeでの測定で良いと思う。
- ◆ 標準品を分けて市販してほしい。
- ◆ 臨床試験検体測定でQualificationレベルで実施されているケースがどれくらいあるか。
- ◆ 複数物質のうち、1つだけが判断基準を満たさない場合、対策が取れない。
- ◆ シングル測定と複数測定で真度精度など影響されるかどうかについて、バイオマーカー測定の場合に、バリデーションでどこまで追及すべきか。

Q19 その他議論したいことなど

- ◆ ECLのキットではキャリブレーターが混合された状態で送られてくるため、それぞれの濃度をこちらで設定することができない。
- ◆ マルチプレックスならではのバリデーション項目はないか。項目間のクロスリアクションの検証など。
- ◆ ロットごとに検量線範囲が違っているので継続試験の場合に困る。また、データ処理した際に、自動でフィットの悪い点が除外されて定量上限や下限も除外されるため、それを許容していいものか迷う。
- ◆ レギュレーション下でキットを用いて実施した場合、恒久的確保の担保と、製造中止になった場合の対応（フルバリなのか、パーシャルで対応かなど）について。

Q19 その他議論したいことなど

- ◆ 採用基準の指標. バイオマーカー（内因性物質）が多いと思われるので，代替マトリックスの選定方法もしくは標準的な代替マトリックスの設定.
- ◆ 確率論的に，測定対象すべてのQC試料が基準を満たす確率はシングルプレックスに比べてかなり低くなるが，統計学的な基準を設定することはできないか.
- ◆ バリデーションにおける真度，精度についてどこまで許容できると考えるか.

など

多数のご意見有難うございました