

DG2024-76

LBA基礎講座

-薬物濃度分析に必要な知識・経験・疑問-

DG2024-76

Basic Course of LBA

- Knowledge, experience, and queries required for drug concentration analysis-



DGメンバー

名前	所属
岡 知寛 (リーダー) Tomohiro Oka	シミックファーマサイエンス株式会社 CMIC Pharma Science Co., Ltd
小野 春奈 Haruna Ono	株式会社サンプラネット Sunplanet Co., Ltd
七種 大樹 Daiki Saikusa	株式会社東レリサーチセンター Toray Research Center, Inc
森 理人 Masato Mori	興和株式会社 Kowa Company, Ltd
清水 浩之 (オブザーバー) Hiroyuki Shimizu	田辺三菱製薬株式会社 Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation
宮山 崇 (オブザーバー) Takashi Miyayama	中外製薬株式会社 Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.
山本 健一 (オブザーバー) Kenichi Yamamoto	株式会社新日本科学 SHIN NIPPON BIOMEDICAL LABORATORIES, LTD.

背景と目的

近年、抗体医薬をはじめとする多様なモダリティを用いた医薬品の研究開発が広がっており、それらの濃度測定には主に Ligand binding assay (LBA) が用いられる。



LBAは細かな操作等、様々な影響を受けやすい測定系であるにもかかわらず、LC-MSに比べて議論の場や初心者向けの教材が少ない。
(LBA従事者の経験談・実体験を収集する機会に乏しい)



LBA初心者が困った際に参照できる、**経験談**や**実体験**を多く盛り込んだ教材の作成を目指す。

本DGでは、LBA初心者であるメンバー（経験4年以内）が日々の濃度測定業務での疑問点を持ち寄り、議論した。また、より多くの経験則を収集したい内容についてアンケートを実施し、更に議論を深めた。

活動内容

- 2024/6 キックオフミーティング
- 2024/6~7 議論シートの作成
各DGメンバーが議論したいことを洗い出し、議論シートを作成した。
- 2024/7~9 議論シートに基づいた議論
- 2024/9~10 アンケート作成
DGメンバーが深く知りたい項目について、アンケートを作成した。
- 2024/10 アンケート実施
- 2024/11 アンケート結果の共有、議論
- 2024/11 F2F mtg
- 2024/12~2025/2 ポスター作成

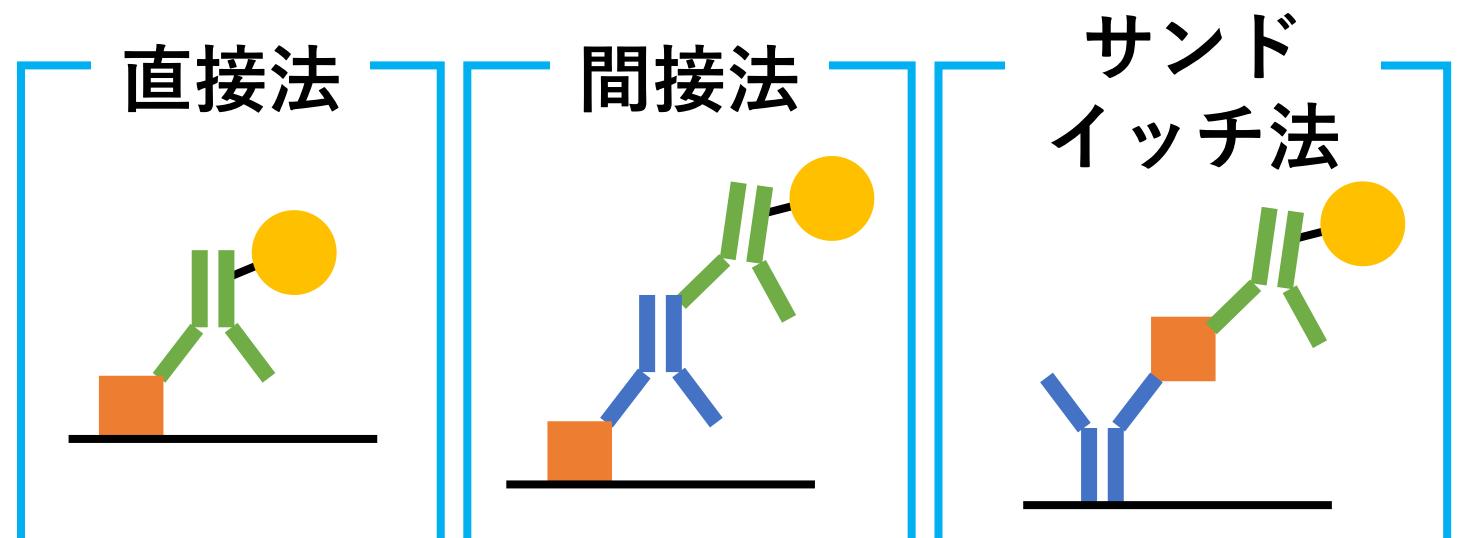
はじめに：LBAとは

LBAでは、抗原-抗体反応を利用しており、検出に用いる抗体の標識方法により様々な手段で測定することができる。

- 例) 酵素標識：ELISA
 電気化学発光標識：ECL
 放射性同位元素標識：RIA など

また、測定対象物質と重要試薬の種類により複数のアッセイ方法がある。

- 例) 直接法
 間接法
 サンドイッチ法 など



■ : 測定対象 (抗原・抗体など) Y : 一次抗体 Y● : 標識抗体

LBA測定の流れ (1/2)

サンドイッチELISAを用いたLBA測定の流れは以下の通りである。

 躓きポイント①：測定法の選択方法は？

i. Capture試薬の固相化。

 躓きポイント②：重要試薬の選択方法は？



ii. ウェルを洗浄後、ブロッキング剤添加。

 躓きポイント③：洗浄方法は？
④：ブロッキング剤の選択方法は？

洗浄液の種類だけでなく、液切り方法も結果に影響を与える。

iii. ウェルを洗浄後、測定サンプルを添加。

 躓きポイント⑤：ブランクシグナルの低減方法は？
⑥：検量線範囲の決定方法は？

LBA測定の流れ (2/2)

サンドイッチELISAを用いたLBA測定の流れは以下の通りである。

- iv. ウェルを洗浄後、Detection試薬を添加。
- v. ウェルを洗浄後、反応試薬を添加。
- vi. 測定法に準じた機器にて測定する。



躓きポイント⑦：分析法構築時に検討する項目は？
⑧：トラブル対応。

LBA初心者で躓きやすそうな点を挙げ
アンケートを実施、メンバーで議論した。

本DGでの議論内容

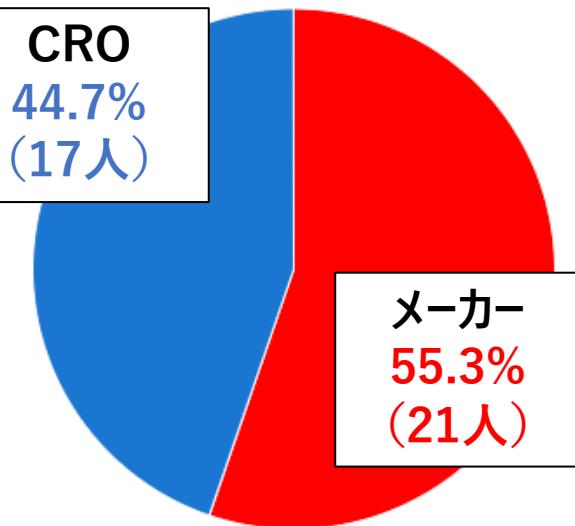
- **測定法の選択**：各測定法の特徴・選択方法
- **重要試薬**：重要試薬の選定方法・濃度選択
- **検量線**：検量線範囲の選定・解析方法
- **選択性**：ブランクシグナル低減のために
- **分析法開発**：分析法開発の流れ
- **ブロッキング**：ブロッキング剤の選定方法・濃度
- **洗浄**：洗浄液の選定方法・注意点
- **トラブルシューティング**：トラブル共有方法・コンタミ・ピペット操作
- **LBA技術習得**：LBA実施時の困りごと・参考にした資料

アンケートについて

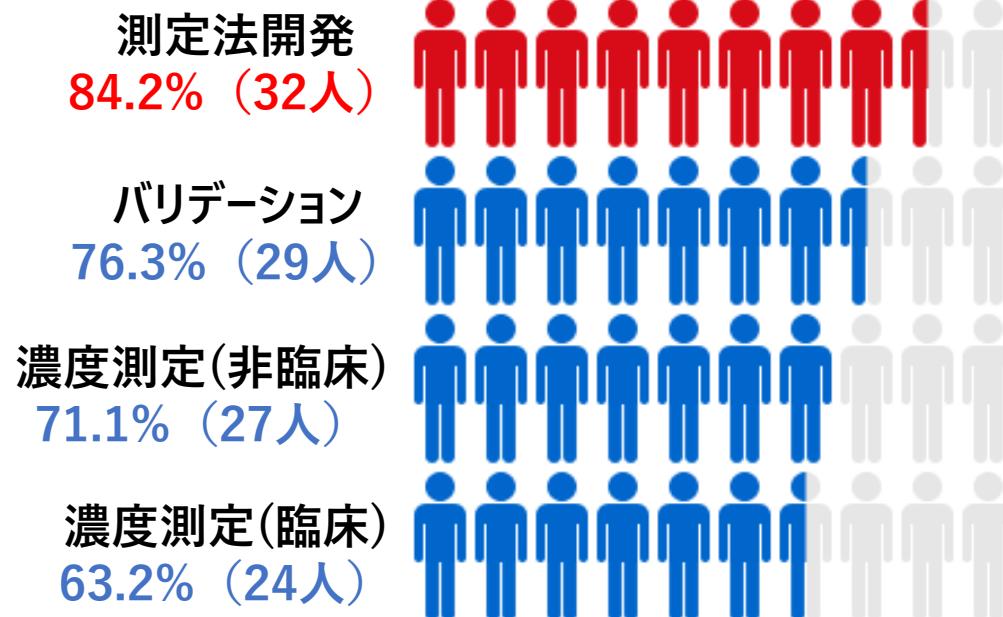
DGメンバーが深堀したい項目について、アンケートを実施した。

- 実施期間：2024/10/21~2024/10/30
- 回答数：38名
- ご回答者の背景：

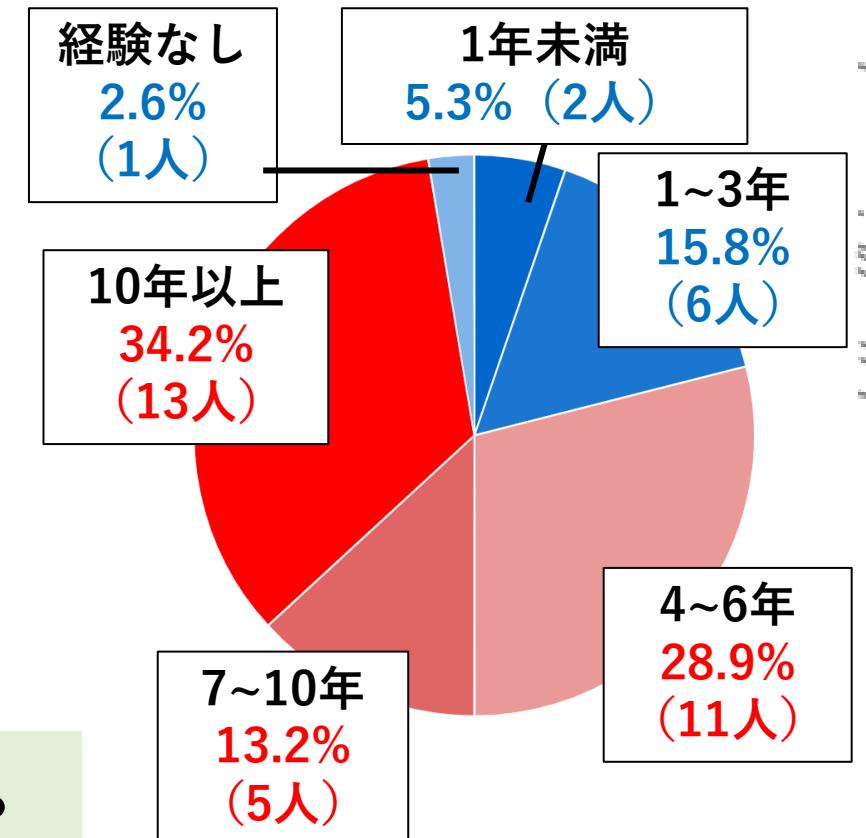
Q. ご所属について



Q. ご担当業務について



Q. LBA経験年数



回答にご協力いただき、ありがとうございました。

測定法の選択

測定法の選択

■ DGメンバーの疑問

ELISA, RIA, ECL, GyrolabなどLBAを利用した様々な測定系があるが、**第一選択**としてどの測定系が多いか？また、それを選択する理由は？

■ DGメンバー内の議論

- ・ **ELISA**と**ECL**が第一選択として多かった。**Gyrolab**についても意見あり。

ELISA

- ・ MSD単独のリスクを考慮。
- ・ **低コスト、導入のしやすさ。**

ECL

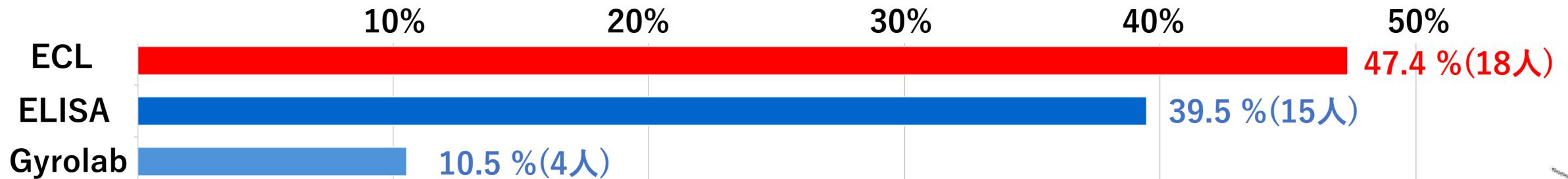
- ・ **感度の高さ。**
- ・ **レンジの広さ。**

Gyrolab

- ・ CD200とCD4000での実績が多数。CD4000の方が高感度だが価格が高い。
- ・ **実験者間差が少なく、施設移管が楽。**
- ・ 流路のつまりや、CDの品質の問題による**飛び値が問題**となることもある。

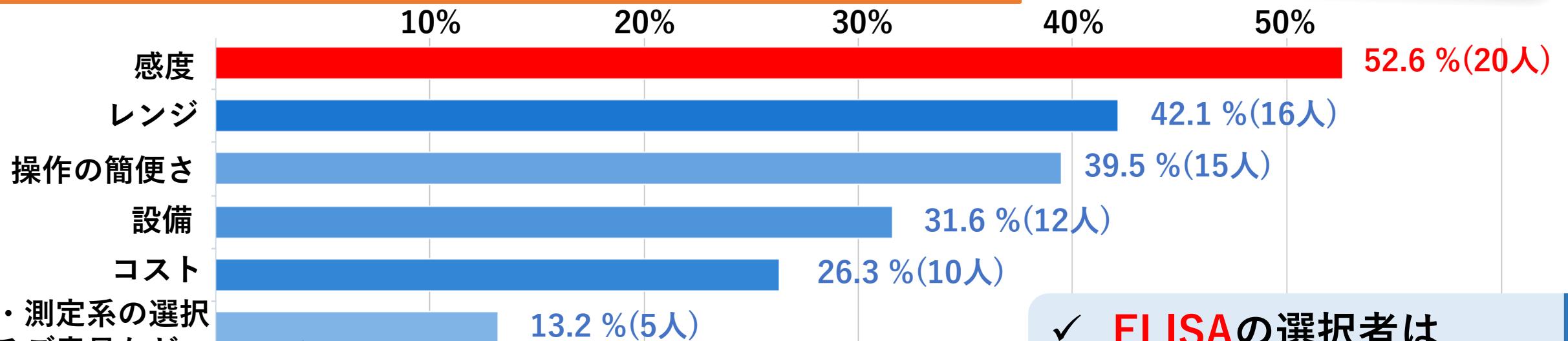
測定法の選択（アンケート結果）

Q. 薬物濃度測定業務全般で、一番採用率の高いLBA測定系を教えてください。



Q. それを選択した理由について教えてください。

✓ **ECL**の選択者全員が**感度**を選択。



✓ **ELISA**の選択者は**コスト**と**設備**を重視。

- ・時間の短縮（Gyrolabは試料をセットすれば自動で測定できるため）。
- ・再現性の高さ、施設間での差が小さいこと。
- ・スループット。
- ・真度、精度、日間差、オペレーター間差などの項目でブレが少ない。
- ・データの再現性が高い。



重要試薬

<http://bioanalysisforum.jp/>

■ DGメンバーの疑問

- 固相化試薬、検出抗体の選定方法は？
- モノクローナル抗体, ポリクローナル抗体, 抗原どれを使っている？
- 市販抗体を購入する場合、どうやって選べばいい？
- 同じ認識部位のメーカー違いの抗体も検討するべき？
- 標識体の調製はどのようにやっているか？
- 試薬のロット差は気にしている？
- 試薬の保存方法はどのようにしている？

■ DGメンバー内の議論

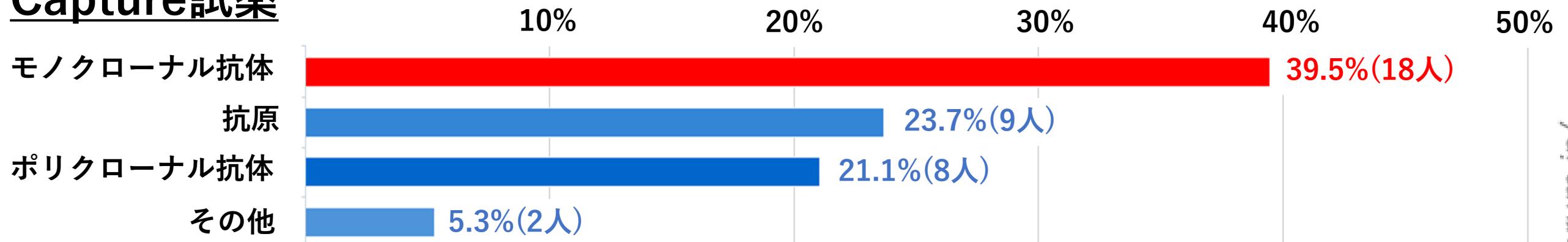
重要試薬の選定は、**社内の経験**に基づいている人が多かった。

また、市販試薬の取扱いについては、**メーカーの指示**に従うという意見が多かった。

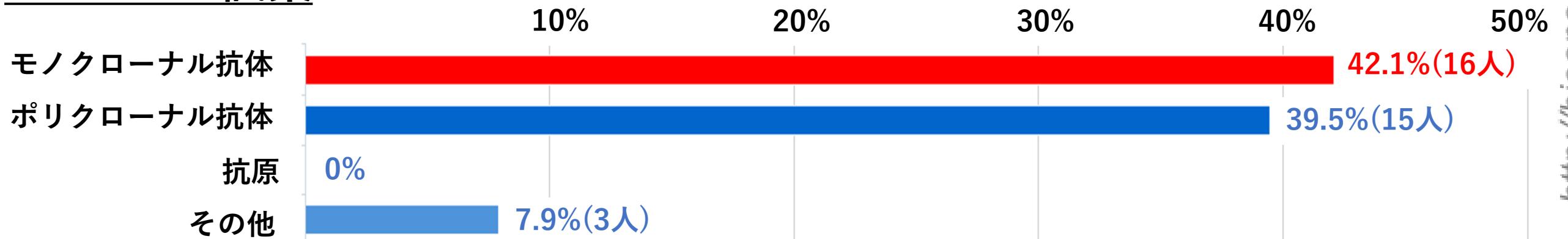
重要試薬（アンケート結果）

Q. 薬物濃度測定業務全般で、一番採用率が高い重要試薬を教えてください。

Capture試薬



Detection試薬



- ✓ **モノクローナル抗体**の使用が多い。
- ✓ Captureには**抗原**を用いることも多いが、Detectionとしては選択されにくい。

重要試薬（アンケート結果）

Q. 上記重要試薬の選択理由について、それぞれ教えてください。(1/4) (一部抜粋)

Capture試薬の選択理由(1/2)

ポリクローナル抗体

- ・キットに依存。
- ・非臨床用を想定。ポリクローナル抗体の方が結合する可能性が高いため。
- ・最も感度が取れる印象。
- ・特異性が高いから。

- ✓ 結合しやすく感度が取れる。
- ✓ ロット間差が出やすい。

モノクローナル抗体

- ・非特異的シグナルの除去。
- ・高感度検出のため、適切なエピトープデザインができる高親和性抗体としてモノクロを作製することが望ましいから。
- ・手順として定められているため。
- ・特異性が高いから。
- ・分析法によるが、やはりポリクロよりは安定性の部分で長期的に使用することを視野にいれるとその方が無難。
- ・選択性の高いものを選択する。

- ✓ 特異性が高く。
- ✓ 長期的に使用できる。
- ✓ ロット間差を減らせる。



重要試薬（アンケート結果）

Q. 上記重要試薬の選択理由について、それぞれ教えてください。(2/4) (一部抜粋)

Capture試薬の選択理由(2/2)

抗原

- ・測定対象物によるが**入手しやすい**。
- ・通常、抗体医薬を想定した場合、その抗原を固相化する場合が多いため。
- ・抗原をたくさん有していた。
- ・選択性が高いため。
- ・様々なケースがあるが、抗原があるなら抗原を固相試薬として使用することが第一選択。
- ・特異性が高く、**入手しやすい**。
- ・委託者から指定される場合が多いです。
- ・高い特異性が得られる。
- ・使用可能なら抗原・抗体結合を反映させるのが最もよいと考えるため。

- ✓ **特異性の高さ。**
- ✓ **入手のしやすさ。**

その他

- ・非臨床試験は抗原、臨床試験は抗原とモノクロが多い。
- ・ケースによりポリクロか抗原か決定する。

DGメンバーの意見

Captureに抗原を用いた際に乾燥させすぎるとCVがばらつくことがあった。

重要試薬（アンケート結果）

Q. 上記重要試薬の選択理由について、それぞれ教えてください。（3/4）（一部抜粋）

Detection試薬の選択理由(1/2)

ポリクローナル抗体

- ・キットに依存。
- ・非臨床用を想定。ポリクローナル抗体の方が結合する可能性が高いため。
- ・通常、反応した抗体医薬を2次抗体で検出する機会が多いため。
- ・市販品があった。
- ・検出感度をあげるため。
- ・様々なケースがあるが、調達が比較的簡便であるという理由でポリクローナル抗体を使用することが多い。
- ・汎用性、シグナル良好、入手しやすい。
- ・特異性が高いから。
- ・委託者から指定される機会が多いです。
- ・高い測定感度が得られる。
- ・反応が強いものを選択する。

- ✓ **感度**が高い。
- ✓ **入手**のしやすさ。

重要試薬（アンケート結果）

Q. 上記重要試薬の選択理由について、それぞれ教えてください。（4/4）（一部抜粋）

Detection試薬の選択理由(2/2)

モノクローナル抗体

- ・ 非特異的シグナルの除去。
- ・ 測定対象物によるが入手しやすい。
- ・ 手順として定められているため。
- ・ 特異性が高いから。
- ・ 分析法によるが、やはりポリクロよりは安定性の部分で長期的に使用することを視野にいれるとその方が無難。
- ・ 最も感度が取れる印象。
- ・ 特異性が高い。
- ・ **ロット間差なく使用し続けることができる**ため。

- ✓ **特異性が高い。**
- ✓ **ロット間差が少ない。**

その他

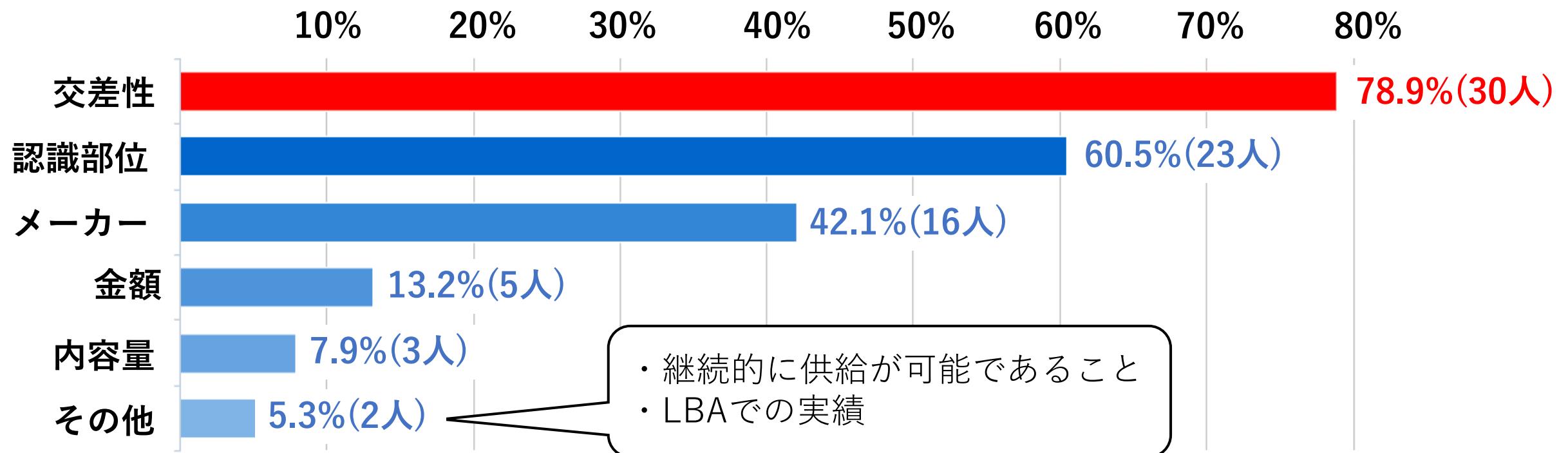
- ・ 非臨床試験：モノクロ調製に時間がかかるためポリクロで対応することが多い。
臨床試験：継続的な調製が可能なモノクローナル抗体が多い。
- ・ メーカーごとに検出感度やバックグラウンドに違いがあるから。

DGメンバーの意見

CaptureとDetectionで選ぶ基準は大きく変わらないように感じた。入れ替えて検討することも多いイメージ。

重要試薬（アンケート結果）

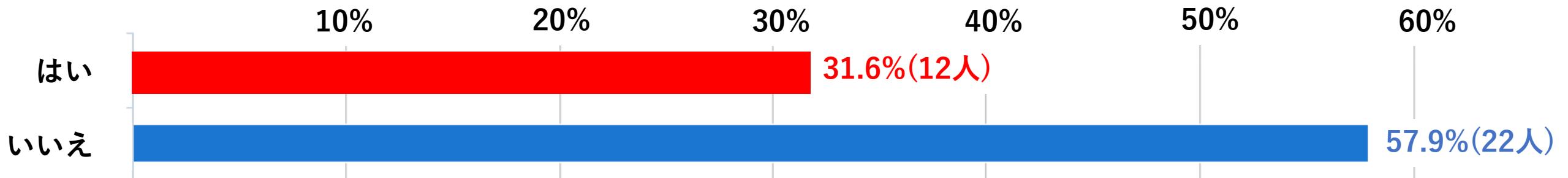
Q. 市販抗体について、購入、選定する際に重視していることを教えてください。



- ✓ 抗体の**交差性**や**認識部位**を重視するケースが多い。
- ✓ **安定供給されるメーカー**を選定することも重要。

重要試薬（アンケート結果）

Q. 同じ認識部位だが、メーカーが異なる抗体を使用し、重要試薬の検討を実施した経験はありますか。



Q. その経験について詳しく教えてください。（一部抜粋）

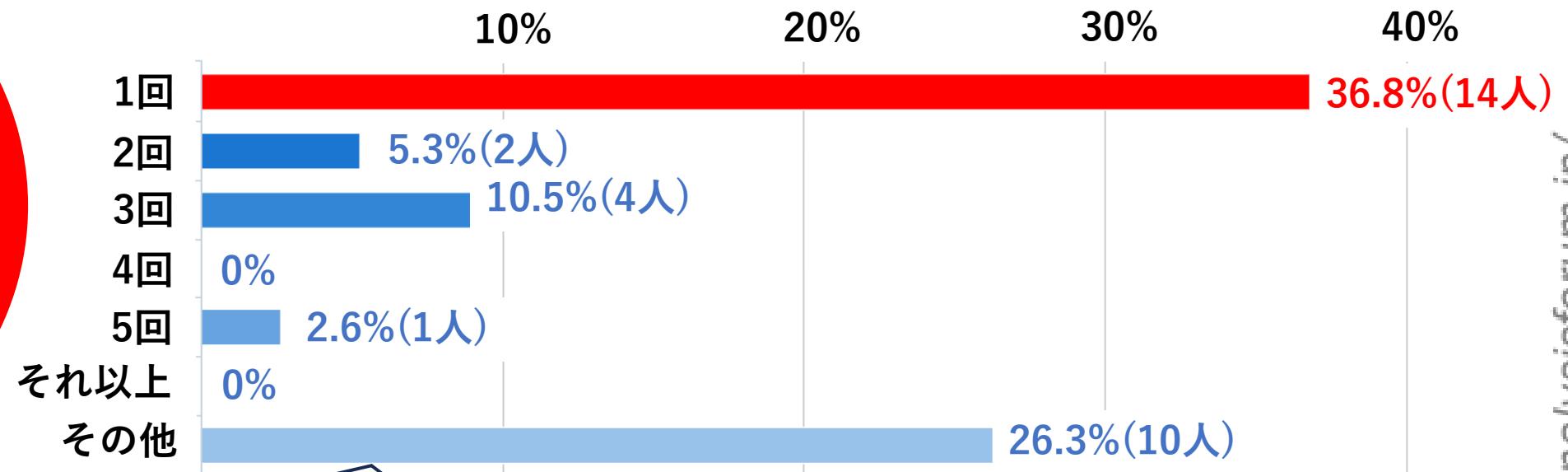
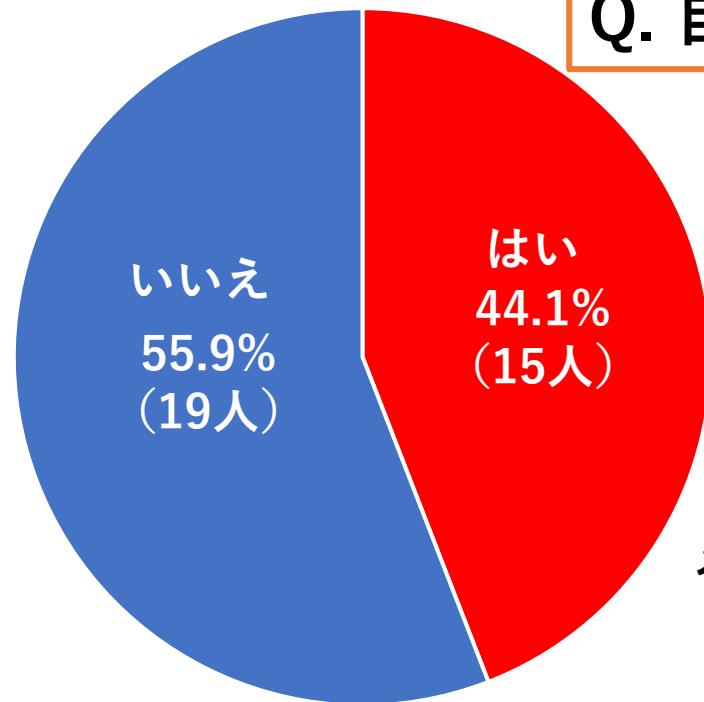
- **動物種が異なる** (Goat と Rabbit、Mouse と Rabbitなど) ことで、**バックグラウンドを下げられた**。
- ヒト化抗体の測定法構築時に、抗ヒトIgG抗体をDetection抗体に使用したときに、サルの血清で交差してしまい、サル抗体の吸収処理がされた抗ヒトIgG抗体を使用したら構築できた。
- **エピトープは同じでも、抗体の親和性は異なる** ので、高親和性抗体のメーカーを選択する。
- 組み合わせを決める段階で、選択肢を多くするために実施。
- メジャーなメーカーのものが入手できなかったため、マイナーメーカーを比較した。
- 2種の抗体の併用投与の場合；ヒトFc抗体によっては、**併用薬の影響**を受ける場合があった。
- **メーカーにより、反応性が大きく異なる** ケースあり。

- ✓ **メーカーやロットにより反応性が異なる。**
- ✓ **複数のメーカーで比較を行うこともある。**

重要試薬（アンケート結果）

Q. 自社で調製した標識体の標識率の確認を行っていますか。

Q. 自社で調製した標識体の凍結融解の回数について教えてください。



- ・ 未0回（4°C保管）経験。
- ・ 場合により条件が異なる。
- ・ 決めていない。反応性が落ちない限り使用可能。
- ・ 自社調製の経験なし。
- ・ 少量で標識化し凍結せず冷蔵保存して使用する（凍結融解0回）。
- ・ 使用用途による。
- ・ 検討項目。
- ・ 標識後、小分けして冷凍、使用後は再度凍結保存せず、廃棄しています。
- ・ 標識体によって、1回分ずつ分注して使い切りとしたり、数回使用したりします。

重要試薬（アンケート結果）

Q. 自社で標識体調製を行う際、気を付けていることがあれば教えてください。（一部抜粋）

- ・ 標識物が**分解しない方法**を採用。
- ・ **ロット毎の反応性**（使用濃度，希釈倍率）の差の確認。
- ・ **コンタミ**に気を付ける。
- ・ 標識効率の**再現性**、スケールアップ時の**反応差**。
- ・ 標識間差をなくすため可能な限り、**大量標識**する。
- ・ 化合物によって、**添加ビオチンの比率**を変更する。
- ・ **析出**が見られないことを目視で確認する。
- ・ **標識効率**は気になる。
- ・ **アミコン（限外濾過）のサイズ**を間違えない。
- ・ 調製ロットによる差が小さくなるように、調製量が多くなった場合は本数を増やして。
- ・ **調製スケールは同じ**にしている。
- ・ **反応比率**を一定にする。
- ・ **反応条件**が変わらないように気を付けています。

DGメンバーの意見

- ・ ビオチンのキットは溶解後、**すぐに使用する**。
- ・ カラムの**充填剤が偏らない**ようにする。
- ・ **アジ化ナトリウム**を持ちこまないようにする。
- ・ **溶媒**によっては、試薬の活性に影響するものもあるので、**しっかり置換**する。
- ・ メーカーの**キットに忠実**に従う。



検量線

<http://bioanalysisforum.jp/>

■ DGメンバーの疑問

- **LLOQやULOQの設定基準**はあるか。
- **LLOQのS/N比**はどれくらいが妥当なのか。
- **アンカーポイント**は設定するべきなのか，濃度設定はどうしたらいいのか。
- 検量線は公比で作成しているか。

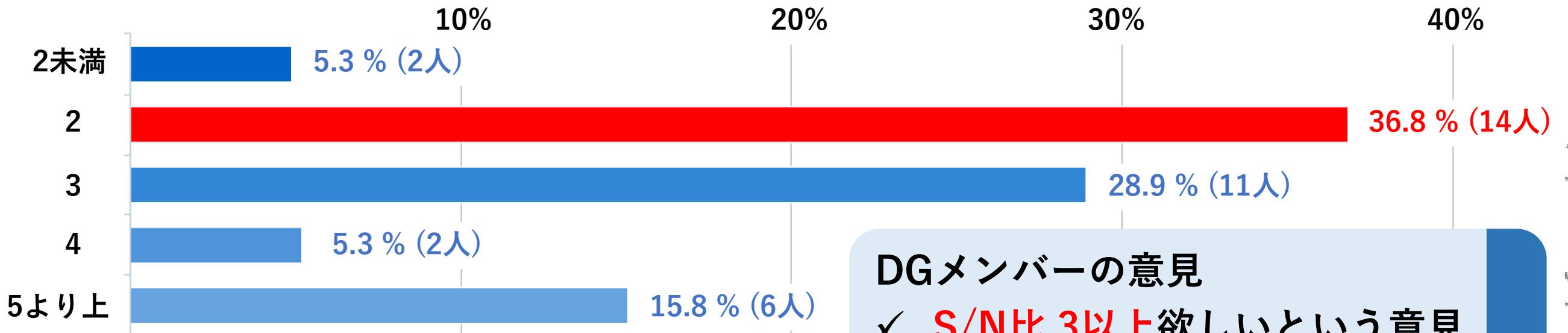
✓ アンカーポイントに関する議論が多かった。

■ DGメンバー内の議論

- **S/Nは3くらい**欲しい。
- **S/Nについてガイドラインに明記がない**ため，意見がわかれそう。
- アンカーポイントの濃度は**LLOQの1/2, ULOQの2倍が多い**。複数置いたこともあった。
- 検量線を**プレート1列分（ブランクを入れて8ポイント）**になるように設定している。
- ULOQの真度が高いようであればアンカーポイントを置く。
- アンカーポイントを置きすぎてフィッティングが悪くなるケースもある。

検量線（アンケート結果）

Q. LLOQのS/N比は最低どの程度が妥当か。



DGメンバーの意見

- ✓ S/N比 3以上欲しいという意見が多かった。

Q. 上記の設問で妥当だと考える理由は何か。(1/2) (一部抜粋)

選択肢	回答
2未満	<ul style="list-style-type: none"> LLOQの再現性があれば、S/Nはあまり気にしない。 ELISAの場合、シグナルが低くてもblank差分が正であれば問題ないと考えている。
2	<ul style="list-style-type: none"> 個体別ブランク血漿シグナルのばらつきによるが、2倍程度あれば、なんとかバリデーションを取得できるイメージ。 感覚的なものだが2倍あればLLOQを確保できる。

検量線（アンケート結果）

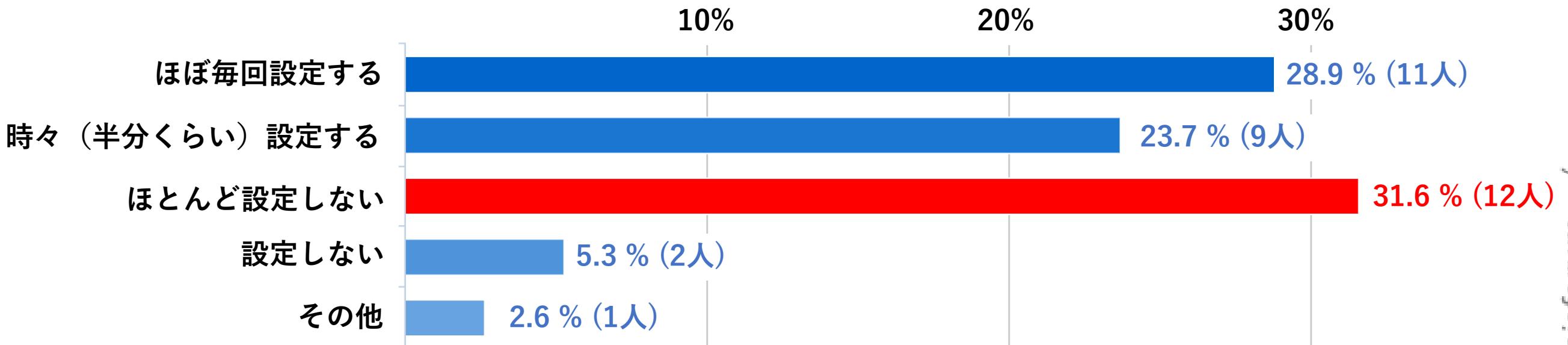
Q. 上記の設問で妥当だと考える理由は何か。(2/2) (一部抜粋)

選択肢	回答
3	<ul style="list-style-type: none"> SNを2で測定することもあるが、再現性に乏しいと感じるため。 最低限必要な比と思う。ノイズのばらつき具合によってはもっと高い方がいい。 測定系のよるので一概には言えないが、概ねぶれても影響が出ない範囲かと考える。 経験的に。3はリスクではあるのでpivotalでは5以上を目指す。 明確な基準は持っていない。2倍あれば良しとすることもあれば、ブランクの値が安定しない測定系では5倍以上必要と思ったりもする。
4	<ul style="list-style-type: none"> レスポンスとして、2倍以上の差（比）が望ましいと思われるため。
5より上	<ul style="list-style-type: none"> 多少の個体差も見込めるため。 研究ステージと測定目的による。申請パッケージだと5を目安にするが、それ以外の目的で3程度を採用することもある。 5を基本と考えるが、日内再現性がクリアしていれば3以上でも問題ない。 ロバストな測定系にするためにはある程度のS/N比が必要であるから。

- ✓ **再現性が得られれば問題ない**と考えている方が多かった。
- ✓ **測定目的やばらつき具合**で判断しているという意見も多かった。

検量線（アンケート結果）

Q. アンカーポイントを設定する頻度について教えてください。



DGメンバーの意見

✓ ほとんど設定しない人とよく設定する人がいた。

< 設定する人の意見 >

✓ 保険のために上下各 1 点置くケースが多い。

✓ アンカーポイントを 3 つ設定したことがある。

< 設定しない人の意見 >

✓ 検量線を 1 列に収めたいので、アンカーポイントを置かない。

検量線（アンケート結果）

Q. アンカーポイントを設定する基準や気を付けていることについて教えてください。
（一部抜粋）

◆ 設定するケースについて

- LLOQやULOQの値が安定しないとき。
- LLOQ, ULOQの真度が大きい場合。
- アンカーポイントを設定した方がカーブフィッティングが良い場合。
- **Gyrolab**ではアンカーポイントがないとLLOQ, ULOQの定量値が算出されないため、設定する。
- 定量下限がギリギリのとき。
- 測定レンジを無理やり広げるとき。

✓ **Gyrolab**の場合、アンカーポイントが必要。（解析の都合上）

◆ 濃度設定について

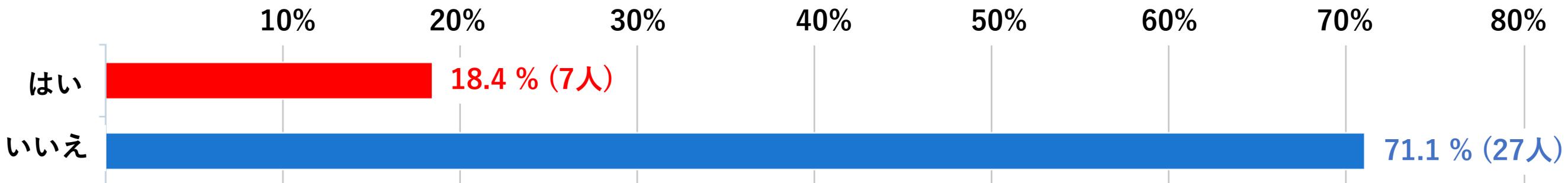
- **LLOQの1/2, ULOQの2倍**
- LLOQの1/3, ULOQの3倍
- LLOQ, ULOQの1.3～2倍位
- ULOQの1.5～2倍程度

DGメンバーの意見

- ✓ アンカーポイントを置くと**検量線が寝すぎない**ため、ULOQの真度が高い場合有効。
- ✓ アンカーポイントを置くが、解析時には外すケースもある。
- ✓ 設定濃度は、**LLOQの1/2, ULOQの2倍**が最も多かった。

検量線（アンケート結果）

Q. ULOQの設定基準について、「検量線のカーブが寝ない場所に設定する」以外に基準はありますか。



Q. 具体的な基準を教えてください。
(一部抜粋)

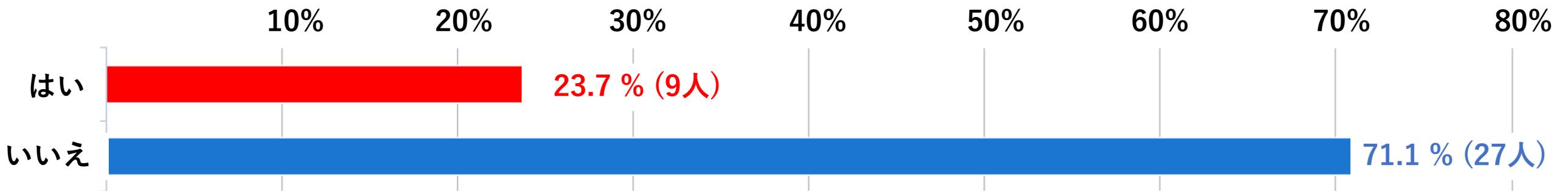
- 再現性が安定して入る。
- データのばらつき。
- 要求される測定上限。
- **ECLの検出力からsignalが100万を超える濃度**は採否を検討する。
- **試料の予測濃度から妥当な範囲**。再現性などバリデーション基準をクリアできる濃度に設定。

DGメンバーの意見

- ✓ 予測される検体の最大濃度を考慮する。
- ✓ ECLのシグナルは**最大60万くらい**がよいと考える。あまり高いとクロストークも気になる。

検量線（アンケート結果）

Q. 分析法開発時にLLOQ未満のduplicateのばらつきが多い場合に測定系の見直しを行いますか。



Q. どのような場合に実施しますか。具体的なエピソードを教えてください。

（一部抜粋）

- 測定系の見直しというよりは、**どれくらいのばらつきか**を確認して、測定目的を達成できるかを確認し、どうしてもダメなときは装置、キットの選定から考え直す。
- バリデーション前なら**極力安定した系にしたい**。改善されない場合はLLOQの設定も見直す必要があるかも。
- LLOQを上げる**。
- 頻度や程度**から何かしらの原因が疑われる場合。

DGメンバーの意見

- ✓ LLOQ未満のばらつきは気にしないケースが多い。
（バッチ採用基準に含めない）
- ✓ バラツキが大きい場合は再測定を検討する。



選択性

■ DGメンバーの疑問

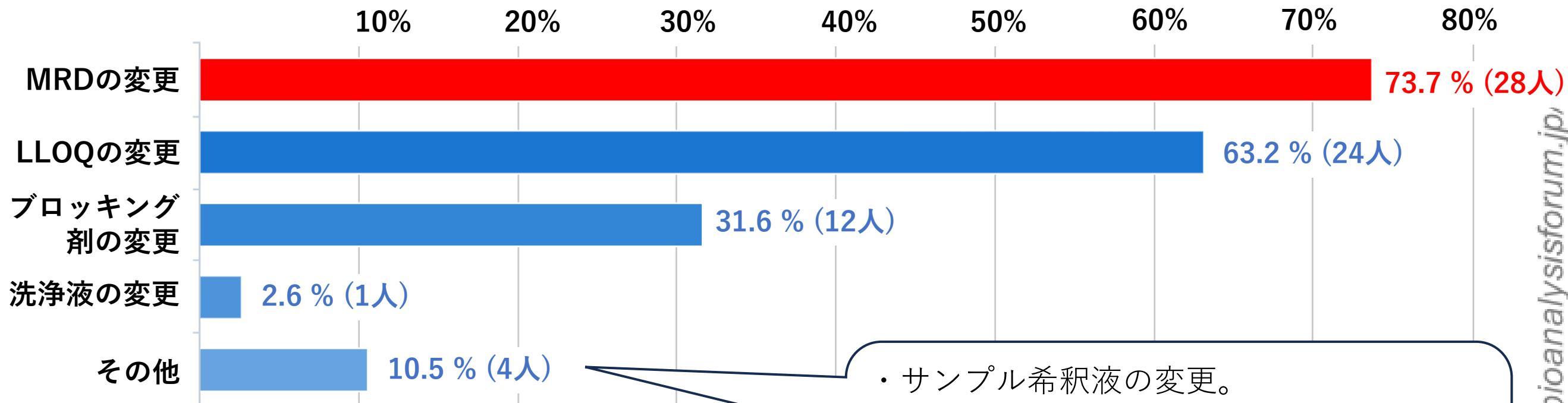
- 個体別ブランク試料のシグナルが高い場合、どのように解決すべきか。
- バリデーション試験で使用する個体別ブランク試料はどのように選択すべきか。

■ DGメンバー内の議論

- 個体別ブランク試料のシグナルが高い場合の対応。
 - MRDやブロッキング剤を検討する。
 - 感度に余裕があればLLOQを上げる。
- 個体別シグナルの選択について、**恣意的にならないように注意する。**
(特に事前にシグナルを確認した場合)
- 選択性は**分析法開発の初期に確認するとよい。**
 - 再現性が取れても選択性が基準範囲外だった場合、分析法開発を一からやり直すことになることも。

選択性（アンケート結果）

Q. 選択性において個体別ブランク試料のシグナルが高い場合、検討する項目を教えてください（複数回答可）。



- ✓ **MRDの変更とLLOQの変更**両方を選択されている方が多かった。
- ✓ DGメンバーでは、**ブロッキング剤の検討**を行っている人が多かった。

- ・ サンプル希釈液の変更。
- ・ 希釈バッファの検討。
- ・ 重要試薬の条件やプレート上でのブランク試料の配置も検討するかもしれません。

選択性（アンケート結果）

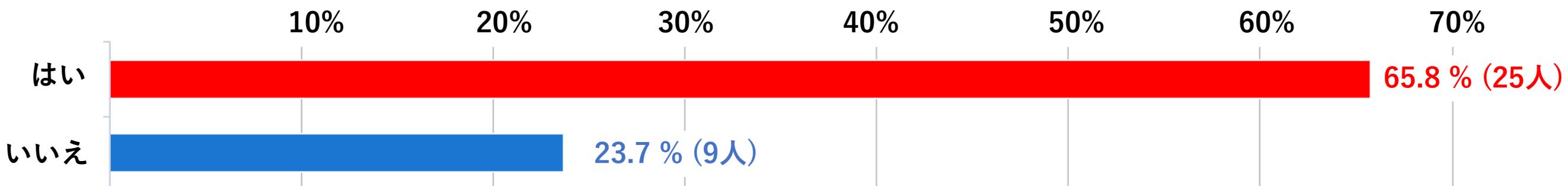
Q. 上記の問題を解決するうえで、有効で合った方法などの経験談があれば教えてください。（一部抜粋）

- **MRD**以外は大きな改善は期待出来ない場合が多い。
- MRDと**LLOQ**を上げる。
- MRDに使用する**試薬を変更**することで改善した経験がある。
- 分析法開発の最初に**選択性**を行う。
- 非特異反応を抑える**添加剤**。

DGメンバーの意見

- ✓ HAMA(Human Anti Mouse Antibody)阻害剤など。

Q. バリデーション前の検討試験で個体別のブランクのシグナルを確認していますか。





分析法開発

<http://bioanalysisforum.jp/>

■ DGメンバーの疑問

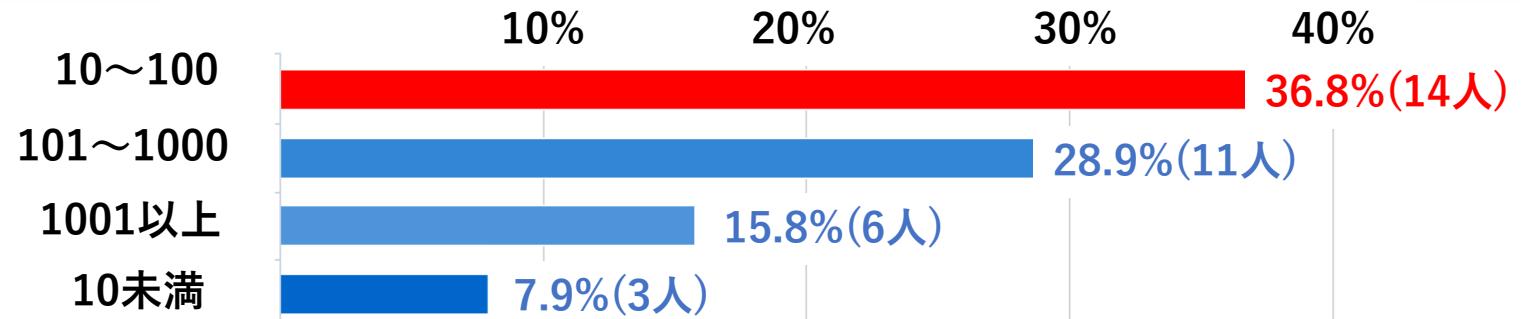
- バックグラウンドが高い際に、よく使う対処法は何か。
- 分析法構築の際、バリデーション項目以外で、安定した測定を実現するために気をつけていることはあるか？
- 分析法開発の第1ステップは何をする？流れが決まっているのか？具体例があれば知りたい。（条件数、検量線の範囲など）

■ DGメンバー内の議論

- **ブロッキング剤（種類、濃度）** や **MRD** の検討を優先する。
- 反応が **平衡になるような反応時間** に設定し、 **ピペット操作のしやすい** 調製量にする。
- 初めに実施する内容は、 **重要試薬の至適濃度決定(数ng/mL~10μg/mL)** が多い。

分析法開発（アンケート結果）

Q. これまでの経験で最大のMRDはいくつですか。



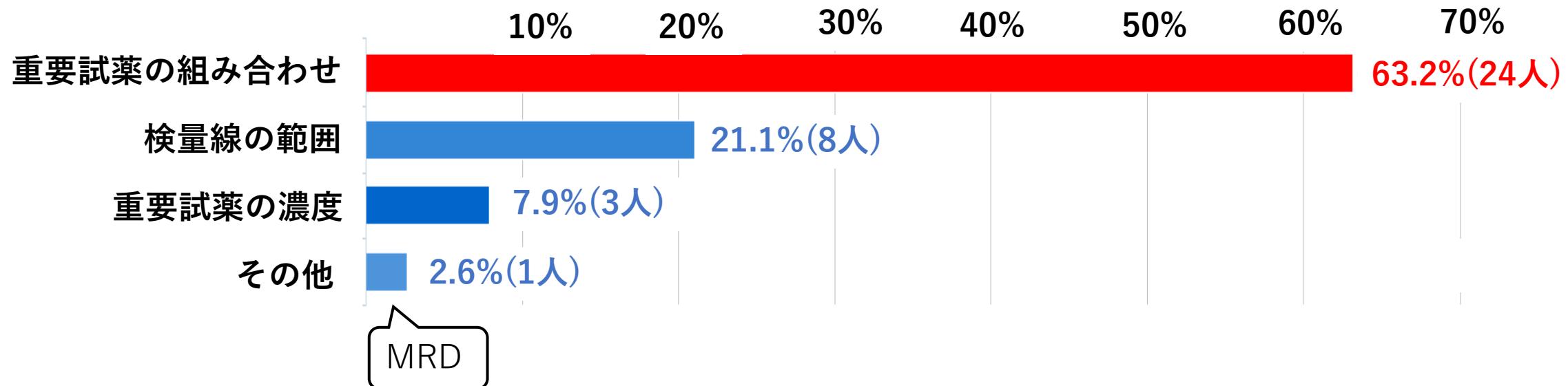
Q. S/N比以外の観点で、MRDの設定で気を付けていることがあれば教えてください。（一部抜粋）

- **感度**と**S/N**のバランス。
- 生体試料中存在する内因性の測定対象や重要試薬（抗原等）の存在。
- 個体別のマトリックスで**ばらつきがない**こと。
- そのMRDでスタンダードの添加回収率が問題ない（ $100 \pm 20\%$ 以内）ことを確認する。
- 小さくしたいが、各種基準を満たすうえでは大きくなっても仕方ない（最高で20000）。
- マトリックスの影響、Duplicateの**ばらつき**、測定対象が複数ある場合はなるべく揃える。
- キットの場合は**並行性**を確認している。
- 検量線の形、duplicateの**バラツキ**も評価している。
- **操作ができるだけ煩雑にならないよう**にしています。

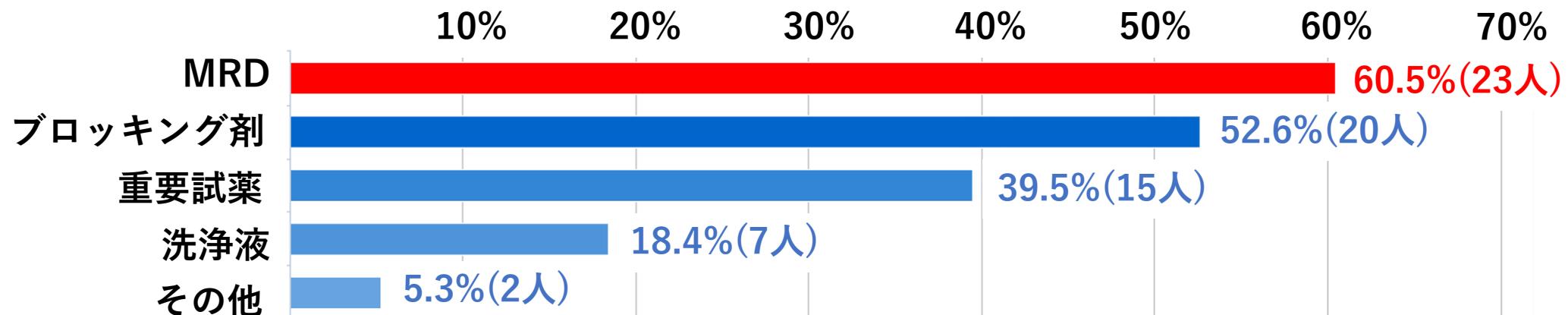
- ✓ **感度**
- ✓ **バラつき**
- ✓ **操作の煩雑性**
などを考慮して設定。

分析法開発（アンケート結果）

Q. 分析法開発時、最初に検討する項目を教えてください。



Q. バックグラウンドのシグナルが高い場合、最初に検討する項目を教えてください。



- ・ Plate assay はブロッキング剤とMRD、GyrolabはMRDと重要試薬。
- ・ どのステップが原因になっているかの確認。

分析法開発（アンケート結果）

Q. それを選択した理由について教えてください。（1/2）（一部抜粋）

MRD	選択肢				理由
	ブロッキング剤	重要試薬	洗浄液	その他	
○	○	—	—	—	ブロッキング剤は複数持っていて、 すぐに検討できる ため。
					もっとも効果的だから。
					バックグラウンドシグナルが高い 原因として、まず考える要素 。これだけに限らないですが。 非特異吸着 がバックグラウンド上昇の原因となる可能性が高いため。
○	—	—	—	—	キットの構成はあまり変えたくないため。
					一番クリティカルであり、感度が許す限り、検討する価値がある。
					感度に満足できるのであれば、MRDの倍率を変えるのが 簡単 だと考えています。洗浄液などはできるだけ他の測定系と共通のものを使用したいです。
—	○	○	—	—	系のバックグラウンドに直接影響するため。
					原因が 特異的なのか非特異的なのか を判別するため、重要試薬を変更して調べる。

分析法開発（アンケート結果）

Q. それを選択した理由について教えてください。（2/2）（一部抜粋）

MRD	ブロッキング剤	重要試薬	洗浄液	その他	理由
—	—	○	—	—	固相化試薬（抗体）の濃度がまずは大事かと考えます。
—	—	○	—	—	検出感度の善し悪しは、検出用抗体の性能（品質）が重要であるため。
—	○	—	—	—	非特異的シグナル の除去。
○	—	—	○	—	希釈しても必要感度が得られるならば、それでよい。
○	—	○	○	—	経験測。
○	—	○	—	—	非特異的シグナル回避の近道だから。
○	○	○	—	○	分析プラットフォームの特徴をふまえて検討するため。
—	○	○	○	—	非特異的結合 を疑うため。
○	○	○	○	—	どれも大きく起因するため。
○	○	○	○	—	第一選択は重要試薬変更だが、難しい場合は他の条件も検討する。
—	—	—	—	○	原因ステップが明確にならないと検討結果が正しく解釈できないため

分析法開発（アンケート結果）

Q. 再現性の高い測定系を構築するために気を付けていることがあれば、教えてください。
(1/2)（一部抜粋）

【重要試薬について】

- 抗体の選択、組み合わせ。
- 抗体セットの組みあわせですべてが決まるのであらゆる組み合わせを妥協せずにはじめに検討する。
- 抗原や抗体などの試薬の濃度設定。
- 重要試薬濃度を調節する。

5種類程度が目安。

【調製方法について】

- **調製しやすいボリュームで試料を調製する。（6件）**
- 調製（希釈）の方法を同じにする。
- 希釈倍率が高い場合、数回に分けて希釈する（なお、1回の希釈倍率は100倍以下とする）。
- 調製時のボリュームを減らしすぎない。
- 微量な採取は避けるようにしています。
- サンプルや重要試薬の採取量は少なくなりすぎないようにする。
- 最小分取量を、例えば10 μ Lで固定して調製する。

分析法開発（アンケート結果）

Q. 再現性の高い測定系を構築するために気を付けていることがあれば、教えてください。
(2/2)（一部抜粋）

【反応温度・反応時間】

- **反応がプラトーになるような反応時間**に設定する。（5件）
- 反応温度，反応時間などのアッセイ条件。（2件）
- なるべく扱いやすい反応温度にする。（37°Cでなく25°C）

【その他】

- **プレートレイアウト**を工夫する。（5件）
（例：プレートの外周を使用しない、項目ごとに位置を固定する）
- 分析プラットフォームの特徴をふまえて条件を決定する。
- 探索研究においては分析フローをできるだけ統一する。
- エッジ・ドリフト効果の有無（程度）。
- 試薬ロット差の影響。
- 検量線上限下限のシグナル（発色具合）の変動。
- できるだけMRDを上げる。
- ABTSではなくTMBにして，コントロールしやすいように反応の停止をかけられるようにする。
- 可能であれば2人以上で測定してみます。

分析法開発（アンケート結果）

Q. 分析法開発において、最も印象に残っているエピソードについて教えてください。
(1/2)（一部抜粋）

- PK分析用に取得した抗体は、ADA (Domain specificityやNab assay) の**ポジコンとして適切であるとは限らない**。

PK用のポジコンがADAの試験に利用できないケースもしばしばあるので、**ADA用のポジコン**を作製することも想定しておく。

- 市販ELISAキットを用いて、血漿中の低分子の測定を確立したが、実試料では**その代謝物との反応性**が強く認められて、その測定方法は不採用になり、LC/MS/MS法が採用された。

低分子をLBAで測る際、**代謝物の影響**が出る場合がある。

- 二重特異性抗体**の分析法の場合に、**どこを認識する重要試薬**を選択するべきか悩んだ。
(認識部位が異なる複数のメソッドを作って、濃度プロファイルを検討するべきなのかどうか)
- ノウハウの蓄積により、ELISA検出でもfg/mLのオーダーで高感度化に成功することが多くなり、適切な抗体セットがあれば測れない分子はほぼなくなった。
- ピペッティング操作**による検量線カーブの違いを経験した。
- 検出に用いていた抗イディオタイプ抗体が枯渇し**抗ヒトIgGに変更したときにLLOQが高くなって苦労した**。

分析法開発（アンケート結果）

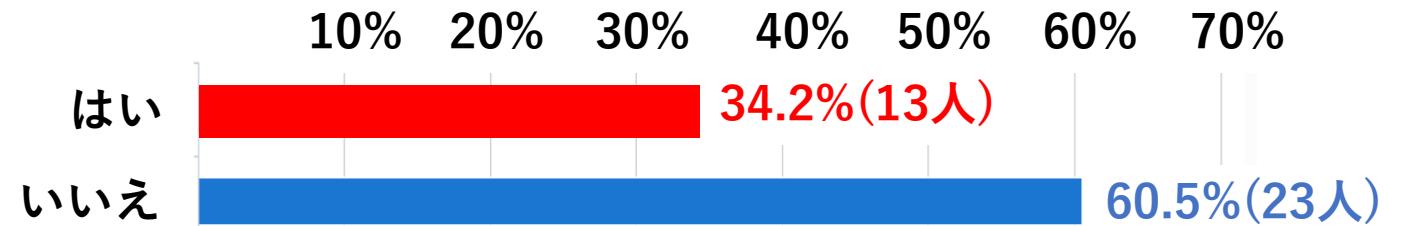
Q. 分析法開発において、最も印象に残っているエピソードについて教えてください。
(2/2)（一部抜粋）

- **フック効果**を読み切る難しさを感じます。標品で高濃度サンプルを調製するのが難しいときもあるのですが、生体試料中ではもっと高濃度になるかもという不安があり、解消できる方法（これをやっておけば大丈夫）という指針があるとよいです。
- ざっくりですが、**理論と経験のバランス**は難しい。あまり先入観あっても困るし、かと言ってなんでもかんでも検討するのも時間、コストの浪費になることもある。
- プレート内での**シグナルのバラツキ**、**ドリフト**など。
- 選択性（添加回収）と同時再現性に問題があり、キャプチャー抗原を変更して解決した。
- MSDのプレートアッセイで、秋口に条件を検討した際には問題がなかったのに、**冬にバリデーションを行ったらプレート左右でのドリフト**が見られたことがありました。**乾燥の影響**を疑い種々検討しましたが改善せず、結局この測定ではプレートの両端の列を使用しないことにして、検量線サンプルを中央に乗せることで解決しました。

季節またはエアコンの影響で、結果に影響が出る場合は**実験台の位置**を変えると改善できる場合がある。

分析法開発（アンケート結果）

Q. 臓器中の薬物濃度測定の実験
はありますか。



Q. 臓器中薬物濃度測定の実法開発で気を付けていることがあれば教えてください。
(一部抜粋)

- **ホモジネートの手法**や**安定性**。
- 他の分析手法（LC-MS/MS、RIやイメージング）と比較しながら**確からしさを検証**する。
- ホモジナイズの処理中の**安定性**。
- **検量線への影響**を事前に確認する。
- ホモジネート試料は、特に試料中の不純物が多くサンプリング等に影響を及ぼしがちのため、**遠心条件**を上げたり普段以上に気を使って扱う。
- 常に**臓器中濃度**を意識して分析法開発する。
(気づくと**LLOQが高すぎて**意味がない分析法にならないように)
- マトリクス中の**夾雑物の影響**。
- 採取が正確にできているかや臓器の破碎は十分にできているか。

- ✓ **分析法の正確性。**
- ✓ **試料中の安定性。**
- ✓ **不純物による影響。**

ブロッキング・洗浄

ブロッキング・洗浄

■ DGメンバーの疑問

- ブロッキング剤と洗浄液では、それぞれ第一選択肢として何を使用するか。
- その理由。

■ DGメンバー内の議論

• ブロッキング剤

BSA

安価かつ使用**経験が多い**。

スキムミルク

実績はあるがオーバーブロックやビオチン結合を含む系での**バックグラウンド上昇**など懸念点あり。

ブロックエース

ECLでの使用実績が多い。

• 洗浄液

PBS-T

✓ ブロッキング剤は**特徴を把握する**必要あり。

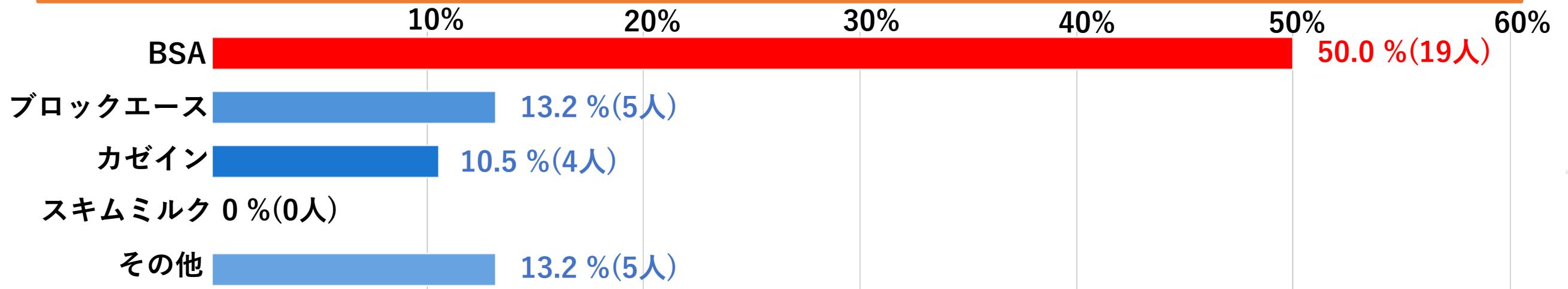
✓ 洗浄液は**PBS-T**が主。

• その他

委託者からの提供試薬をそのまま用いることが多い。

ブロッキング剤（アンケート結果）

Q. 最も使用頻度の高いブロッキング剤を教えてください。



Q. そのブロッキング剤を選択した理由と具体的な濃度について教えてください。

BSA（濃度：1~4%）

（一部抜粋）

- ・ **手軽、入手しやすさ**。
- ・ **一般的**だから。
- ・ いろんな測定法で広く使われているから、過去に種々検討して結局BSAがよかったから。
- ・ **実績が多い**ため。
- ・ 特に理由がない限り第一選択としているから。
- ・ キットに依存。

ブロックエース（濃度：**取扱説明書に従う**）※原液を1~4倍に希釈して使用。

- ・ **汎用性**・特に問題なく、**ブロッキング性能が高い**ため。
- ・ 過去の経験から。

カゼイン（濃度：**1%**）

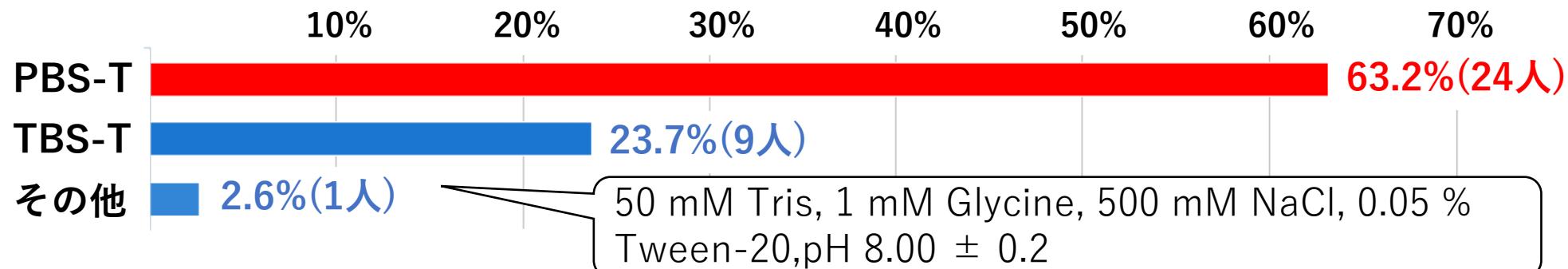
- ・ 手順で定められたもの。
- ・ 市販品でいいものがあるため。

その他

- ・ ノウハウとなるため開示できない→バックグラウンドをかなり低く抑えられる。
- ・ 特に高いものはありません。→分析系によって異なるブロッキング剤を使用することが多いです。
- ・ ミックスしたものを使用。

洗浄液（アンケート結果）

Q. 最も使用頻度の高い洗浄液を教えてください



Q. その洗浄液を選択した理由について教えてください。（一部抜粋）

PBS-T

- ・キットに依存。
- ・一般的だから。
- ・調製しやすいため。
- ・特に問題なく、非特異的な吸着物の洗浄性能が高いため。
- ・TBSTは洗浄力が高すぎる印象。
- ・希釈液がPBS-Tであるので合わせるためリン酸化にかかわるものが測定対象でない限り第一選択であるため。
- ・手軽、入手しやすさ。

TBS-T

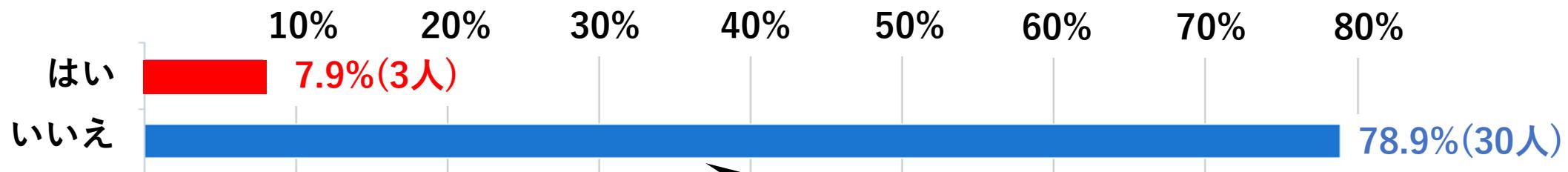
- ・第一選択。
- ・手順として定められているため。
- ・PBS-Tはカビが生えるから。
- ・一般的だから。
- ・委託者から指定される場合が多いです。
- ・特別な理由はない。

- ・リン酸化の影響防止。
- ・社内手順や委託者からの指定。

最も一般的な洗浄液として利用されている。

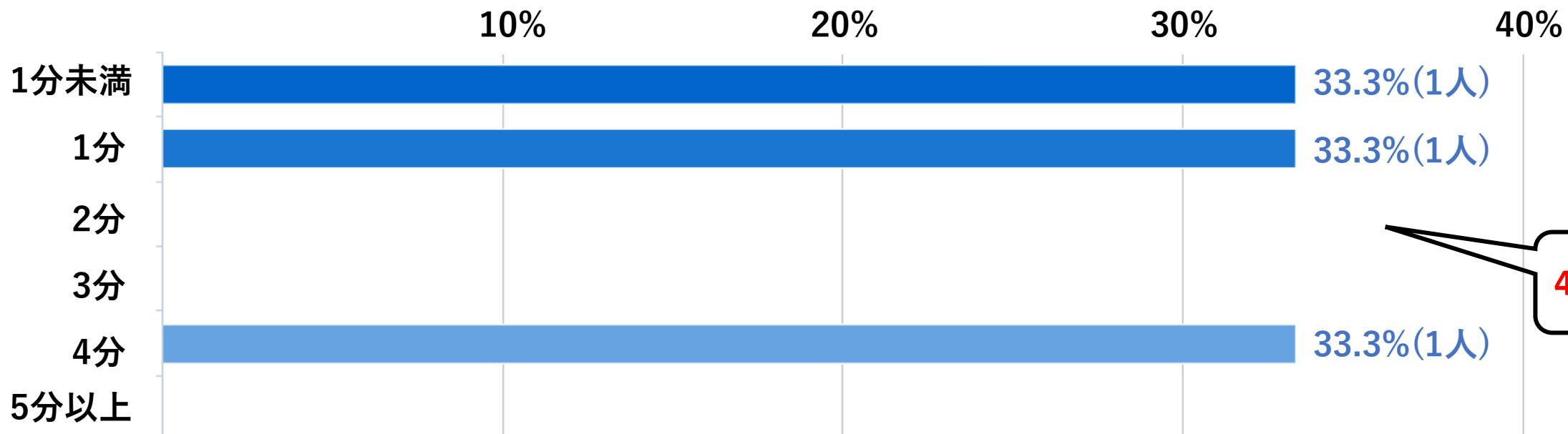
洗浄（アンケート結果）

Q. プレート洗浄後から次の試薬を添加し終わるのにかかる時間の目安を定めていますか。



ほとんどの人が特に時間は定めていない。

Q. それは何分程度ですか。

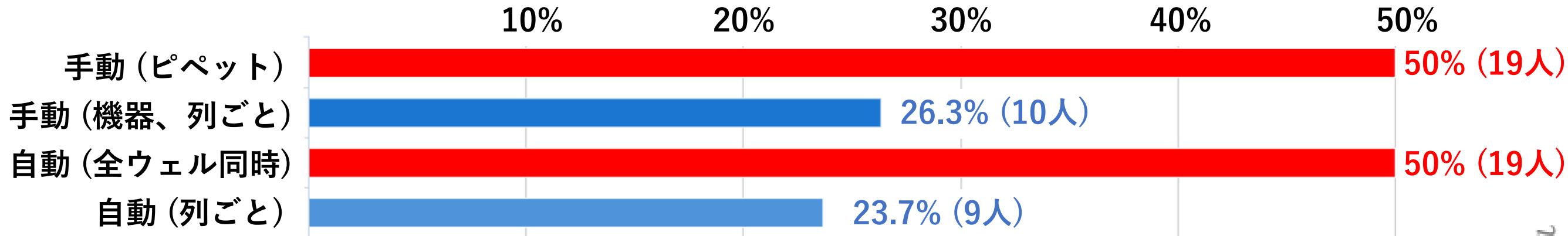


4分以内が目安。



洗浄（アンケート結果）

Q. 洗浄はどのような方法で実施していますか。

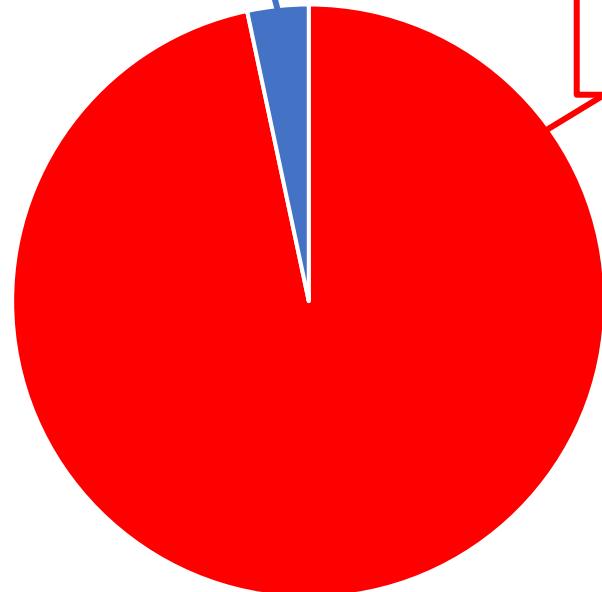


Q. 洗浄後の残存液はどのように除去していますか。

✓ **手技者間差低減**のためにも、自動で行うケースが多い。

遠心もしくは吸引
3.3% (1人)

キムワイプの上でプレートをはたく
96.7% (29人)



✓ **はたき方による個人差**もある。
(例：強さ・回数・向き)

<http://bioanalysisfor>

洗浄（アンケート結果）

Q. 洗浄時にトラブルが生じた経験はありますか。
Q. その内容について教えてください。（一部抜粋）

① 洗浄機のトラブル：11人

- プレートウォッシャーの**作動不良**。
- 例えば、ニードルから液が出なかった・吸えなかったなど。
- 針が詰まって特定のウェルのみ洗浄されていなかった。
- 吸引ノズルに**キムタオルの繊維がひっかかり**、吸引できなかった。
- プレートウォッシャーを使ったら測定値に異変が起きた。
- ラインが摩耗して液漏れを起こした。

✓ **日々の使用時点検が重要。**

✓ **繊維が出にくい材質への変更。**

② 日間差・人間差が生じた：2人

- **残液除去の程度が甘い**ときのシグナルのバラつき。

③ プレートが割れた：2人

✓ **液切り手技の統一。**

④ 固相化抗体が剥がれた形跡があった：2人

いいえ
44.7%
(17人)

はい
47.4%
(18人)

洗浄（アンケート結果）

Q. 洗浄時に気を付けていることがあれば教えてください。（一部抜粋）

①液の残量：6人

- 洗浄後の**残存液**を確実に除去する。
- **液残り**を限りなく少なくする。

- ✓ **残存液の完全な除去**が重要。
- ✓ ウェルの乾燥を防ぐために、**添加時間の目安**を定めることも。

②ウェルの乾燥：4人

- すばやく次の液を入れる。（**乾燥させない**）

③コンタミ：4人

- はたかるときに残液が**ウェル間でコンタミ**しないよう気を付けている。

④一定の操作を心掛ける：4人

- **同じ流速、同じ量**の洗浄液で洗浄すること。

⑤機器の動作確認：2人

⑥プレート底面を傷つけない：2人

ウェル間差が出ないような一定の手技
→ **自動化**により影響を小さくできる？



トラブルシューティング

<http://bioanalysisforum.jp/>

トラブルシューティング

■DGメンバーの疑問

- ① 過去のトラブルの共有方法が知りたい。
- ② 手技者間差の解決方法が知りたい。
→ピペット操作の使い分けをどうしているか。
- ③ 使用する資材の材質で気を付けている点。
- ④ コンタミを起こさないために気を付けている点。

LBAは経験則に基づくところも大きいので、担当者間でどのようにノウハウを共有しているかが気になる。

■DGメンバー内の議論

- ① **会議**や**ファイル**での共有が多い。
- ② 手技者間差は**生じやすい**印象。
特にピペット操作や添加の方法、洗浄後の液切りの仕方など**細かな操作をすり合わせる**ことが重要。
- ③ 吸着がある場合は低吸着のPPチューブを使う。また、古い試薬やプレートの使用でシグナルがばらつくことがあった。
操作のしやすい資材選定も重要。
- ④ 必要でないものはしまう、プレートやチップの上を横切るような操作をしない、低濃度から順番に添加する、手袋をこまめに交換する、など。

担当者が多い際の全体共有が困難。また、トラブル共有自体はされているが、**それらを振り返る仕組み**が不十分であることも。蓄積されたトラブルやその対応を**検索できるシステム・習慣**も重要。

蓋が硬いと飛び散る心配はないが、開けづらい。

トラブルシューティング（アンケート結果）

Q. 過去のトラブルについて、社内での共有方法や伝承方法を教えてください。（一部抜粋）

①会議での共有

- 会議での情報共有。
- **こまめなF2Fミーティング**で状況を共有し、共有した内容やアクションプランをまとめた資料を作成しておく。

週に1回LBA担当者で会議を実施。
トラブルだけでなく、背景と対策も議論する。（DGメンバー）

②チャット・エクセル等データでの保存

- 社内サーバーに**過去の経験**や**Tips**をまとめた資料を格納している。後々は**AIなどで検索して必要な情報を探させる**ことができるかもと期待。
- New comer向けのガイドを作成し、維持管理している。方法だけでなく、**Tipsもできる限り記載する**ようにしている。
- Teamsでの共有の場はあるが、**すべてのトラブルが共有されているわけではない。**また、**共有できる場が担当者に浸透していない**のが課題。

LBA担当者が数名であれば、OJTなどの人伝でも共有可能。データよりわかりやすい。

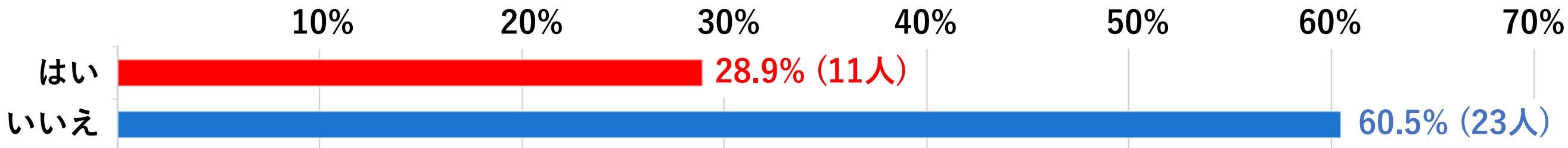
③人伝

- OJTで共有することが多い。
- 教育などで、経験を人伝に伝える。

- ✓ LBAは経験も重要なので、**Tipsやメモ書き**も残しておくほうがベター。
- ✓ 担当者が多い際の全体共有や、過去事例の検索方法など、**課題は残る。**

トラブルシューティング（アンケート結果）

Q. 実験データを確認する際、計画書等で規定している基準以外にチェックしていることはありますか。



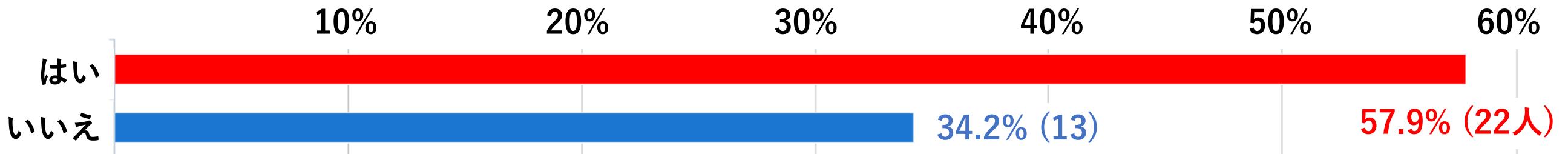
Q. その内容について教えてください。（一部抜粋）

- **シグナル値が普段通り**か、これまでと変化はないか。
- 日々の**シグナル値の変動**。
- 分析法構築時はGyrolabは**3Dビューアー**、ECLは**写真**を確認する。

- ✓ ルーチン的な測定の際は、**シグナルの日間差**をチェックする。
- ✓ Gyrolabの場合は3Dビューアーの確認も効果的。

トラブルシューティング（アンケート結果）

Q. 実験者間で差が生じた経験はありますか。



Q. その内容と解決方法について教えてください。（一部抜粋）

- （内容）**シグナルのブレ**、またそれに伴う**検量線やQCの差**。
- （解決方法）見学・コツを共有・**手技や手順をトレース**する。
- それでも解決できない場合は、**基準を満たす担当者のみで試験を実施**する。

- ✓ LBAは**実験者間差**が生じやすい印象。
- ✓ **細かな点も含め手技を統一**することが望ましい。
(ピペット操作・添加時のスピード・角度・時間など)

トラブルシューティング（アンケート結果）

Q. 使用するチューブやプレートなど、材質に関して気を付けていることがあれば教えてください。
(一部抜粋)

- 主には**PP製**、必要に応じて**Low Binding素材**。
- 低吸着チューブを選ぶ。**PP製は必須**。
- 吸着が気になる場合は**Protein Lobind**など、低吸着の材質使用する。
PP製は常時使用。

- ✓ 基本的には**PP製**を使用。
- ✓ 物質によっては**低吸着の材質**を検討。

- Protein Lobindチューブで安定性をとったときに臨床試験のサンプルを単なるセラムチューブに入れて良いか疑問である。

DGメンバーの意見

- ✓ 吸着性がある場合、臨床サンプルも**低吸着のチューブ**に入れることが望ましい。
- ✓ 可能な限り、**一般的な容器**での検討が無難。

トラブルシューティング（アンケート結果）

Q. ピペット操作について、リバーズ法とフォワード法の使い分けをしていますか。
 Q. 使い分けの基準、又は使い分けしない理由を教えてください。（一部抜粋）

- 一定の操作で再現性を守るため。

使い分けていない
7.9% (3人)

- 違いがよくわかっていない。

フォワード法で統一
7.9% (3人)

リバーズ法で統一
13.2% (5人)

- 試料の粘度による。
- マトリックスや溶媒による。
- 添加量、分注量による。
- 操作の種類による。
- 感覚で誤差が少なそうな方法を選択。

- フォワード法でピペッティングを繰り返すと泡立つため避けている。
- LBAの溶液は水性で粘性がある場合が多く、チップ内の残存が気になるため、リバーズ法を使用したほうが正確であると考えます。

使い分けている
63.2% (24人)

- ✓ 試料や操作による使い分けが多数。
- ✓ 手技統一のため使い分けないケースも。

トラブルシューティング（アンケート結果）

Q. コンタミ防止のために実施していることがあれば教えてください。（一部抜粋）

① 資材関連

- 出来る限り **ディスク** を使用する。
- 手袋をこまめに交換する。

- ✓ 特に高濃度サンプルの取り扱い時には注意する。
- ✓ **低濃度** → **高濃度** の順で添加する。

② 作業関連

- **プレートの上をモノが通過しない** ようにする。
- プレートシールを剥がす際の液飛びに注意する。
- 使用しない資材には **蓋をする**。
- 洗浄や抗体添加時にはなるべく **チップを付けない**。
- 実験台よりも低い位置でチューブの蓋を開ける。

溶液量の誤差を低減するために、重要試薬添加時はチップを付ける意見が多かった。（DGメンバー）

③ 配置関連

- 調製前後でチューブを離し遠ざける。
- 極端に濃度の異なるサンプルを隣のwellに入れないようにする。
- 高濃度の標準品を取り扱う場合、アッセイする場所と異なる場所（機器）で実施している。

コンタミや入れ間違いを防ぐ
プレートマップにする。

■ DGメンバーの疑問

- LBAを始めたばかりの時に苦労したこと。
- 初心者が今困っていること。
- 初心者を指導していて困った経験， それに対してどのように乗り越えてきたか。

■ DGメンバー内の議論

- 実験操作に慎重になりすぎて、手際が悪いところが多かった。
- QCが基準外（1つ目と2つ目で乖離が大きいなど）。
- Duplicateのばらつき。
 - ①**計画書に記載されない**細かな操作でつまづくことも多いので**前任者などにあらかじめ確認**する。
 - ②**実験のイメージが出来ていると実験がスムーズ**に進められる。
- プレートへの添加位置を間違えることが度々あった。
 - ①少ない量を先に入れることで、入れ間違いを防ぐ。
 - ②**余計な試薬を置かない**。チューブの並べ方とかの自分ルールを作る。
 - ③添加ウェルに目印をつけていく。
- 最初に、初心者の操作を一通り観察して問題点を洗い出してからアドバイスを行う。

乾燥に注意

LBA技術習得（アンケート結果）

【回答者】 LBA経験年数：0~3年

Q. 最近、困っていることやDGメンバーに聞いてみたいことはありますか。（一部抜粋）

DGメンバーに聞いてみたい内容		DGメンバーからの回答
1	分析法開発時、固相化・検出に用いる抗体の選び方、どれくらいの候補からどんな評価をして選ぶのか。	<ul style="list-style-type: none"> モノクローナル抗体（5候補程度）から選択。 検量線や入手のしやすさ、供給の安定性、ロットの代わりづらさなどで評価。
2	試薬の反応性、反応の際の基本の条件や、最適化の方法。	<ul style="list-style-type: none"> 一日のワークフローも考慮して反応時間を考慮しておく。 固相化の反応時間に幅を持たせる。
3	分析法開発の注意点やコツ、重要試薬の選び方。	<ul style="list-style-type: none"> プール調製前に個体別のシグナルを確認する。 実測を見据えて条件等を設定する。 重要試薬は、マイナーなメーカーは避け供給の面で安定している大手のメーカーから入手する。
4	分析法開発をする際、できる限り無駄なく進めるために工夫していること。	<ul style="list-style-type: none"> 濃度などを評価する際は、最初は条件を広くとり徐々に絞り込んでいく。 いくつもの条件を評価する際は、すべての条件を変えず一部条件を固定して評価する。



LBA技術習得（アンケート結果）

【回答者】 LBA経験年数：0~3年

Q. 過去に苦勞したことで、解決できた事例はありますか。(1/2) (一部抜粋)
(例：LBA測定全般，分析法開発について)

過去に苦勞したこと		解決法
1	固相試薬の選択。	<ul style="list-style-type: none"> 色々周囲に相談して、候補試薬を選択して検討。
2	ベテランの方とのオペレーター間差をなくすこと。	<ul style="list-style-type: none"> ピペッティングの回数などの細かい部分を含めた手技の完全なトレース。
3	シグナル値のベースの改善。	<ul style="list-style-type: none"> プレートの水切り方法の調整。



LBA技術習得（アンケート結果）

【回答者】 DGメンバー

Q. 過去に苦勞したことで、解決できた事例はありますか。(2/2) (一部抜粋)
(例：LBA測定全般，分析法開発について)

過去に苦勞したこと		解決法
DGメンバー の意見	計画書の読み取り。	<ul style="list-style-type: none"> SDとの打合せを実施する。
	kitや重要試薬のメーカーについてどれを選べばよいか。	<ul style="list-style-type: none"> 色々試して経験則から選択。
	専門用語がわからない。	<ul style="list-style-type: none"> 学ぶ側も、教える側も無駄に略語を使いすぎないようにする。
	測定プレートの底面の傷。	<ul style="list-style-type: none"> 内側、外側両方注意する。 内側はもちろん、外側も極力触らないようにする。 測定前にキムワイプで底面を拭く。



LBA技術習得（アンケート結果）

【回答者】LBA経験年数：4年以上

Q. 初心者を指導していて苦労した経験や、初心者に多い失敗例はありますか。（一部抜粋）

初心者を指導していて苦労したこと、失敗例	解決方法
<p>入れ間違い、ガイドラインや計画書の読み取り間違い。 （QC試料のN=5を独立に調製することを意図していたが、5倍量調製しアプライのみをN=5で実施してしまった、など）</p>	<ul style="list-style-type: none"> チェックや二回同じウェルに入れないような工夫（カバーで隠すなど）、計画書に詳細に明記する、操作記録の確認。
<p>手技的なケアレスミス。添加ミス、希釈ミス。</p>	—

DGメンバーの意見

プレートへの添加位置を間違えることが度々あった。

→①**少ない量を先に入れる**ことで、入れ間違いを防ぐ。

②**余計な試薬を置かない**。チューブの並べ方とかの自分ルールを作る。

③添加ウェルに**目印**をつけていく。

④マルチチャンネルピペットで列ごとに入れる場合は**入れる列以外をシール台紙で覆って**実施。

乾燥に注意。

LBA技術習得（アンケート結果）

【回答者】LBA経験年数：4年以上

Q. 初心者を指導していて苦労した経験や、初心者に多い失敗例はありますか。（一部抜粋）

初心者を指導していて苦労したこと、失敗例	解決方法
日によって 反応がばらつく 。懸念箇所を問いかけると、だんだん増えていく（自信がなくなっていく）。	<ul style="list-style-type: none"> ワークシート記録の徹底 測定フォーマットの最適化。
測定操作が不安定 であった。	<ul style="list-style-type: none"> 測定操作（スピード、リズム）をなるべく、一定になる様に心掛けてもらった。
データの バラツキ 。	<ul style="list-style-type: none"> 失敗後の調整でクリアになった。
試料添加の バラつき 。	<ul style="list-style-type: none"> 完全な解決には至らなかったが、電動ピペットを使用した。
ピペット操作の一貫性がなく、 結果が安定しなかった 。	<ul style="list-style-type: none"> 使用する資材の特性を教育する。
分析時の 操作が統一できていない 。プレートの底面を汚したり、傷つけたりしてしまう。	<p>反応停止液の場合、添加が遅いと最初と最後でシグナルが変わってしまうことも。</p>

DGメンバーの意見（操作の再現性）

- プレートへの試料や溶液の**添加速度の統一**。反応にかかる時間を全ウェルで統一する。
- 添加は全ウェル**同じ角度かつ同テンポ**で実施。ウェル全体で**同じ操作を繰り返す**ことを意識。
- TMBや反応停止液は、列ごとに5秒など**間隔を決めて添加するケースも**。
- 引継ぎがある試験**の場合、**前の担当者に見学してアドバイス**をもらう。
- 一日の**ワークフロー（試験の流れ）**をイメージし**準備**することで操作が安定する。

操作途中で焦らなくなる。

LBA技術習得（アンケート結果）

【回答者】LBA経験年数：4年以上

Q. 初心者を指導していて苦労した経験や、初心者に多い失敗例はありますか。（一部抜粋）

初心者を指導していて苦労したこと、失敗例	解決方法
ピペット操作（リバース、フォワード）等の 手技合わせ に苦労した。	<ul style="list-style-type: none"> とにかく数をこなす。楽な道はない。
検量線やQCが外れる。	<ul style="list-style-type: none"> 丁寧なピペット操作を心がけるようアドバイスする。
ピペット操作の精度。	<ul style="list-style-type: none"> 練習。
ピペッティングの 個人差が大きい。	<ul style="list-style-type: none"> 一緒に操作する（実践あるのみ）。
マルチチャンネルピペットの操作に慣れていなくて、データがばらつく。	<ul style="list-style-type: none"> 自分の癖を確認し、直す。
ピペット操作。	<ul style="list-style-type: none"> 最初に確認する。
特にLC/MSを経験している方は、段階希釈の際にピペットマンを変えずに実施することがあり、持ち込みが発生して検量線がなだらかになることがあった。	<ul style="list-style-type: none"> Buffer組成やハンドリングの見直し。

<http://bioanalysisforum.jp/>

DGメンバーの意見（ピペット操作関係）

- ・ **使用前にピペット検定**をしている場合は**初心者の方を優先的にアサイン**する（**練習兼ねる**）。
- ・ 期限切れのkitや余っているkitなど**結果が分かっているものでトレーニング**する。
- ・ 添加する**姿勢**も大事。溶液を取るときは**ピペットを垂直**にする。
- ・ **検量線、QC調製**時のピペットでの分取は**最低容量をできれば10 μL以上**にする。

分取量が小さい程、
ブレが大きくなる。

LBA技術習得（アンケート結果）

【回答者】LBA経験年数：4年以上

Q. 初心者を指導していて苦労した経験や、初心者に多い失敗例はありますか。（一部抜粋）

初心者を指導していて苦労したこと、失敗例	解決方法
プレート洗浄後の 水切り不足 によるシグナル不安定。 キムタオルを当てて切る方法は教える際に 抽象的な表現にならざるを得ず ，ヒト間で 再現しづらい 。	<ul style="list-style-type: none"> ピペットの使い方や溶液切りの方法を確認する。
洗浄がうまくいかない。	<ul style="list-style-type: none"> 事前に操作シートを作成し操作手順をイメージしてもらう。 使用する資材を実験前にしっかり準備してもらい実験中の余裕を持ってもらう。

DGメンバーの意見（洗浄関係）

- 基本は**吸い切ってからはたく**。
- はたき方にも**個人差有**。机派、手持ち派、プレートの向きを変えてはたくなど。**試験毎に統一**する。
- ・**液切りしてから試薬調製したことで添加までに時間がかかった**。
- ・液切り時に**叩きすぎて乾燥してシグナルがばらつく**ことがあった。
- 液切りしてから30秒以内に添加**する。
- 特に**抗原固相**の場合、中の**液を空にしすぎると**、ばらつくことが多かった。
- ・**洗浄時の素材**。繊維質がウェルの中に入るとシグナルがおかしくなったりする。
- 乾燥を防ぐためにも**叩いた後に逆さ向きで置いておく**。

LBA技術習得（アンケート結果）

Q. LBA技術習得に際して、参考になったサイトや資料などがあれば教えてください。
(一部抜粋)

企業HP

- ELISAの原理と方法 MBLライフサイエンス <https://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/elisa.html>
- 富士フイルム和光純薬株式会社の「ELISA A to Z」
<http://labchem-wako.fujifilm.com/jp/pg2084a1/download/index.html>
- なるほど!! ELISA (シバヤギのサイト)
- 原理の理解のために各分析装置のメーカーサイト。MSDのassay developmentガイド。
- Cytivaのページはタンパクに関する実験等の情報が多い。
(タンパク質サンプルの調製や精製、核酸合成など)

次ページ参照。

その他

- 過去のJBF DG資料 (DG2018-39 LBAの失敗&トラブル事例と解決策など)
- DeSilva B., et al. "Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules." *Pharm Res.* 2003;20(11):1885-1900. (doi:10.1023/b:pham.0000003390.51761.3d)
- PMDAの分析法バリデーション項目
- 各種ガイダンス関連。個人的には<https://www.bioanalysis-zone.com/>は全国のトレンドを知れてよい。



LBA技術習得（過去のDG一覧）

DG番号	DGタイトル	カテゴリ	内容・要約（一部抜粋）
DG2023-65	【基礎DG】 LBA基礎講座 - 初心者のための分析法構築 - https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-65.pdf	基礎	<ul style="list-style-type: none"> ・ LBAとは？ ・ 分析法構築の流れ ・ ブロッキング剤 ・ 固相化抗体、検出抗体 ・ MRD ・ 検量線 ・ QC試料 ・ 選択性 ・ 再現性 ・ 希釈直線性 ・ フック効果 ・ 安定性 ・ トラブルシューティング
DG2018-39	LBAの失敗 & トラブル事例 と解決策 https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/10th_JBF_DG2018-39.pdf	LBA全般	トラブル事例 <ul style="list-style-type: none"> ・ 測定系の選択, 構築 ・ 測定準備 (試薬, 温度バリデーション, 分析法開発) ・ 測定中 ・ 測定結果 ・ 解析 ・ その他
DG2015-19	LBAによる定量 https://bioanalysisforum.jp/images/2016_7thJBF_S/05_DG2015-19_HP.pdf	LBA全般	<ul style="list-style-type: none"> ・ MSDにおける分析法構築 ・ Gyrolabにおける分析法構築 ・ ELISAにおける分析法構築 ・ バイオマーカー標品の選択 ・ LBAによる組織中濃度 ・ LBA担当者の育成

http://bioanalysisforum.jp/

- ✓ LBA初心者が参考にしやすい過去のDGをまとめた。
- ✓ 分析法開発やトラブルシューティング事例について。



LBA技術習得（過去のDG一覧）

DG番号	DGタイトル	カテゴリ	内容・要約（一部抜粋）
DG2021-51	抗薬物抗体 (ADA) 分析 —ニューモダリティ及び技術的課題に関する議論— https://bioanalysisforum.jp/images/2022_13thJBFS/DG2021-51.pdf	ADA	<ul style="list-style-type: none"> ・ニューモダリティ（核酸医薬品, ADC, AAV）に対するADA分析 ・中和抗体 (NAb: Neutralizing antibody) 分析 ・各種ADA分析手法の比較 ・ADA分析におけるトラブル事例
DG2019-43	ADA分析の道しるべ —分析法開発および非臨床・臨床試験実施における留意点— https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2019-43.pdf	ADA	<ul style="list-style-type: none"> ・ADAとは ・免疫原性評価とは ・アンケート結果（第1回及び第2回）の紹介 ・非臨床ADAのデザイン, ストラテジー ・臨床ADAのデザイン, ストラテジー ・分析法の構築 ・バリにおける留意点
DG2014-11	抗薬物抗体 (ADA) 分析 https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/6th_JBF_DG2014-11.pdf	ADA	<ul style="list-style-type: none"> ・重要試薬 — ブランクマトリクス, 標準抗体の設定等 ・最小希釈倍率 (MRD) — MRDの設定方法等 ・中和抗体測定 — 中和抗体測定の測定フォーマット, 実施時期等 ・バイオシミラー — バイオシミラーのADA測定等 ・カットオフ値 — 極めて小さいカットオフ値が算出された場合の対応等

http://bioanalysisforum.jp/

- ✓ ADA関連でLBA初心者が参考にしやすい過去のDG一覧をまとめた。
- ✓ ADA分析の方法や留意点がまとまっている資料。



LBA技術習得（基礎講座）

タイトル	カテゴリ	内容・要約（一部抜粋）
– LBAと質量分析装置をバイオ医薬品開発に活かすために – LBAを用いた測定法についてのQ&A https://www.youtube.com/watch?v=ruP-p0psiWc	LBA全般	事前のアンケートに基づいた回答 ・薬物濃度測定でのQ&A ・ADA測定でのQ&A ・バイオマーカー測定でのQ&A
LBAの技術的基礎講座-バラツキの原因と対策- https://www.youtube.com/watch?v=TFvDC1RsQh4	LBA全般	・ピペッティング ・プレートへの試料の撒き方 ・エッジ効果 ・重要試薬の選択/作製 ・ロット ・プレートリーダー ・その他
LBAの分析法開発基礎講座 https://www.youtube.com/watch?v=A1h6YgxNyrg	LBA全般	・薬物濃度分析の開発（ライフサイクルマネジメント, 4つのファクター） ・重要試薬, 装置の選択 ・検量線, QC試料, マトリックスの影響 ・希釈直線性, 安定性 ・技術的に押さえておきたい事項
LBAにおけるADA分析法開発基礎講座 https://www.youtube.com/watch?v=8-XzUWEyXAY	ADA	・ADA分析の目的 ・ADA分析法開発（段階的評価, ライフサイクルマネジメント, 5つの重要因子） ・装置とアッセイプラットフォーム ・感度とDrug Tolerance Limit ・重要試薬 ・MRD ・バリデーションに入るまでの検討項目

LBA技術習得（アンケート結果）

Q. LBA技術習得に際して、実践したことを教えてください。（1/3）（一部抜粋）

- バリデーションと同じ内容（安定性以外）を実施。
- OJT。
- **丁寧なピペット操作**を心がけた。
- 使用**期限切れキットの利用**。
- 分析法構築が技術取得に役立ったと思います。
- 薬理グループの方に**アッセイの流れ・手技を教えてもらった**。
- 高感度化のため**高親和性抗体を作製**する。
- 1つ1つのステップで、**何に気を付けるかを意識しながら操作**すること。
- 経験者に聞く。
- 特になし（操作自体に特殊なものはなかったため）。
- **マトリクスの影響を体験**してもらった。例えば、血漿含有率1%、2%、5%、10%で抗原抗体反応を実施して、吸光度の変化を体験してもらった。
- ひたすら数をこなして、手技に関する**失敗をしたら原因を追究し、同じ過ちを起こさない**ようにする。
- とにかく数をこなす 担当者間で**ピペティング法を揃える**。

LBA技術習得（アンケート結果）

Q. LBA技術習得に際して、実践したことを教えてください。（2/3）（一部抜粋）

- 最初は**キットを使用して測定の練習**をした。
- **めげずに実験**してデータを出していくこと。
- **様々な条件を試してみる**。基礎的な理論は重要ですが、それほど分析科学としても分かっていないことが多いので。
- サンプルング練習、ゼロからの分析法開発（トラブルシューティング）。
- 多くの**機器に実際に触れる**。
- 気になる、気づいたポイントは試してみる。
- ピペットのトレーニング。
- 先人の開発したメソッドのトレース。
- 熟練者からの教育、LBAに関係するサイト（試薬メーカーなど）から**情報収集**。
- ベテランの方の**手技のトレース、社内研修資料の見直し**。
- 繰り返し実施する。いろいろな条件で検討し、**影響の大きい因子を理解**する。
- 検量線やQCを並べて繰り返し測定し、**再現性を確認**した。
- とにかく検討と実践を繰り返す。

LBA技術習得（アンケート結果）

Q. LBA技術習得に際して、実践したことを教えてください。（3/3）（一部抜粋）

- ピペットの使用技術を徹底的に学び、**バラつきの少ない試料添加**を行う。
- 回数をこなす。
- 適当な測定対象を用いて検量線とQC試料を作成してELISAで測定した。数回**自主練習して再現性を確認**したり、**他の担当者と結果を比較**したりした。
- 分析はすべて外部委託のため、技術習得はしていない。
- 抗体濃度や反応時間、反応温度などの**条件をいろいろと試して結果を比較**するなどして、**結果の解釈ができる**ようにした。
- 事前に**操作シートを作成し操作手順をイメージ**する。使用する資材を実験前にしっかり準備し、**余裕をもって実験**を行う。
- プレートへの試薬の添加操作は繰り返し練習しました。
- 座学、先輩の作業見学、実技練習。
- **粘性のあるバッファの扱いに気を付けた**。ピペット操作を**ゆっくり**するなど。
- ウェルに**均一に入れる**ようにする。
- 前任者の試験条件を再現できるようトレーニングを実施した。
- ピペッティング 洗浄回数の検討 ブロッキング試薬の選択 反応温度の検討。

応援のお言葉

アンケートの最後にLBA初心者に対しての温かいお言葉をたくさんいただいたので、ご紹介させていただきます。

応援のお言葉

**Q. アンケート全体を通してご意見等あれば、ご記入ください。
もしなければLBA初心者に対して一つ応援の言葉をお願いします！**

- さまざまなモダリティがやってくるので、開発品ごとに分析対象を選択しながら系を作る楽しさが待っていますよ。
- あなたの工夫次第でターゲットは必ず検出できる！
- まだまだ初心者なので、ともに頑張っていきましょう
- 実験操作よりも、データの解釈（こういうデータが出た場合に次はここを検討するなど）が重要と思いますので、解釈のできるLBA担当者に成長されることを期待します！
- 記載させていただいたことが、LBA初心者の皆さまに多少でも参考にしていただければ嬉しいです。
- 努力は裏切らない
- 私自身も初心者なので一緒にスキルアップしていければと思います。
- めげずにデータをとって経験を積むのが大事だと思います。またJBFで失敗、トラブル経験や対策を共有して、日本の技術向上の貢献していきましょう
- もっとLBAの分析科学を研究する姿勢も大事だと思います。最終的なシグナルでしか、データは得られないので、科学的に解明されていないことが多い。
- LBAに限らず、トラブルに合った数だけ成長すると思っています。

今後増えていくと予想される高分子医薬品に対して、根拠を持って適切なLBAを選択できるようになりたいです。

日常業務でも、トライアンドエラーの大切さを痛感しています....

エラーにも再現性がある場合とない場合があり、判断が難しいことが多々あります....

応援のお言葉

**Q. アンケート全体を通してご意見等あれば、ご記入ください。
もしなければLBA初心者に対して一つ応援の言葉をお願いします！**

- 単純な操作に思われる一方で、かなり複雑な反応系でエラーに対する多くの考察があるため大変で、奥が深い技術です。過去にもDGなどで多くの方が議論してきたことですのでぜひ参考にさせていただき、どのような発表になるか楽しみにしております
- 皆さんがどのように考えて実験されているのか、このアンケートの内容が気になりました。当日のポスターを楽しみにしています。
- このアンケートで皆様の貴重な回答を楽しみにしています！
- LBAは個性が結果に現れる手法です。毎日一定の操作を続けられるよう意識して、何か違いに気づいたら周りに相談することを心掛けるといいかと思います。
- 頑張ってください！
- 経験が向上につながるとしますので頑張ってください。
- 気になる内容が盛りだくさんでした。集計結果を楽しみにしています。
- 学ぶ意欲はあるうちに頑張ってください。焦らなくとも時間が解決することもあります。
- 初めは思うような結果がなかなか出ないかもしれませんが、経験を積んでコツがつかめてくればきれいな結果が出て楽しく感じるようになると思います。最近はLC-MSMSができる人は多いですが、LBAができる人は少ないので、エキスパート目指して頑張ってください。

個人の日間差だけでなく、手技者間差も減らせるような統一されたプロトコル（又は自動化）が出来ることが望ましいです。

応援のお言葉

Q. アンケート全体を通してご意見等あれば、ご記入ください。
もしなければLBA初心者に対して一つ応援の言葉をお願いします！

- 細かな操作の違いによって変化が生じやすいのがLBAだと思います。そういった違いが起こりにくいように自動化を推進したいと考えています。
- LBAは実験回数を重ね、またLBA経験者・熟練者と口頭で議論する機会を多く持つことで些細な違いにも気づくことができ技術向上につながると思います。JBFでの交流の場も活用しながら積極的に話す機会を作るとよいですし、今回のDG活動も成長するためのとてもよい機会だと思います。これからの活躍を期待しています！

OJTの指導によっても細かい手技に差が生じるので、社内で当たり前だと思っていた手技も他社と比べると全然違う、といったこともあり、非常に興味深いDGでした。今後も交流の機会があれば、是非参加させていただきたいです。

たくさんの温かいお言葉をありがとうございました！