

Gyrolab (LBA 自動測定装置) の評価

Evaluation of Gyrolab (automated immunoassay system)

Name	Company
泉 知博 Tomohiro Izumi	株式会社新日本科学 Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.
新藤 晃子 Akiko Shindo	第一三共RDノバーレ株式会社 Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd.
平山 龍 Ryu Hirayama	シミックファーマサイエンス株式会社 CMIC Pharma Science Co.,Ltd.
渡辺 光 Hikaru Watanabe	株式会社住化分析センター Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.

※オブザーバー

清水 浩之 (Hiroyuki Shimizu) 田辺三菱製薬株式会社 (Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation)

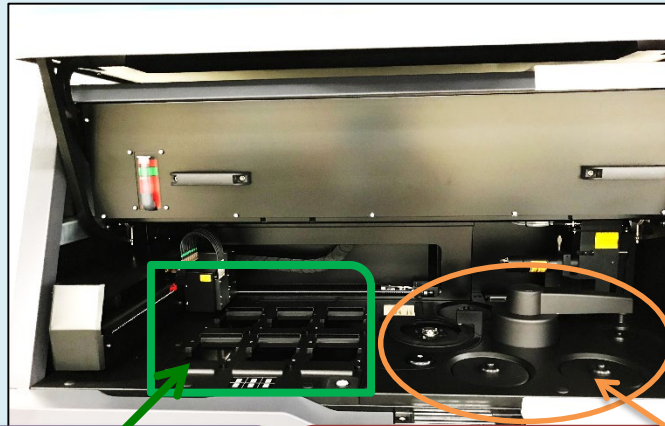
活動の内容 (Contents of Our Activity)

2021 7	8	9	10	11	12	2022 1	2	3
TC ★ 7/12	TC ★ 8/31	TC ★ 9/28	TC ★ 10/22	TC ★ 11/24	TC ★ 12/15	TC ★ 1/20	TC ★ 2/8	JBFシンポ ★ 2/28-3/2
						ポスター作成		

- ・合計8回のTeamsを用いた電話会議
- ・活動期間中はeメールでのコミュニケーションをベースとした

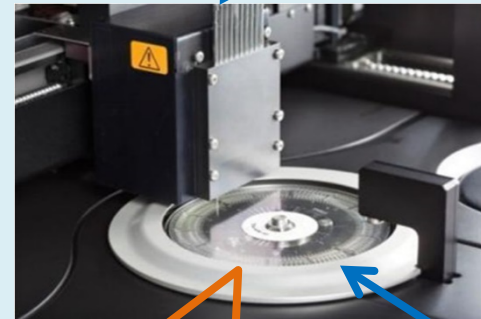
GyrolabはLigand binding assay (LBA)の自動測定装置であり、日本では2013年から販売されている。今回、GyrolabユーザーによるDG (Discussion group)を設け、これまでに蓄積された知識や経験をもとに、LBAでの血中薬物濃度測定を行っている立場から、今回、Gyrolabでの定量における有用性や使用方法について評価した。

本DGでは、活用法、バリデーション、トラブル事例等の項目に分けてユーザーとしての評価を共有し、Gyrolabのアッセイパフォーマンス向上のための方法を議論した。本発表では、DGの議論内容を紹介し、DGからの報告・提案を行う。



準備の場:
サンプル・試薬を
セット(96well plate)

LBAの場:
最大5枚のCDで約280サンプル
(duplicate)を5hrで測定

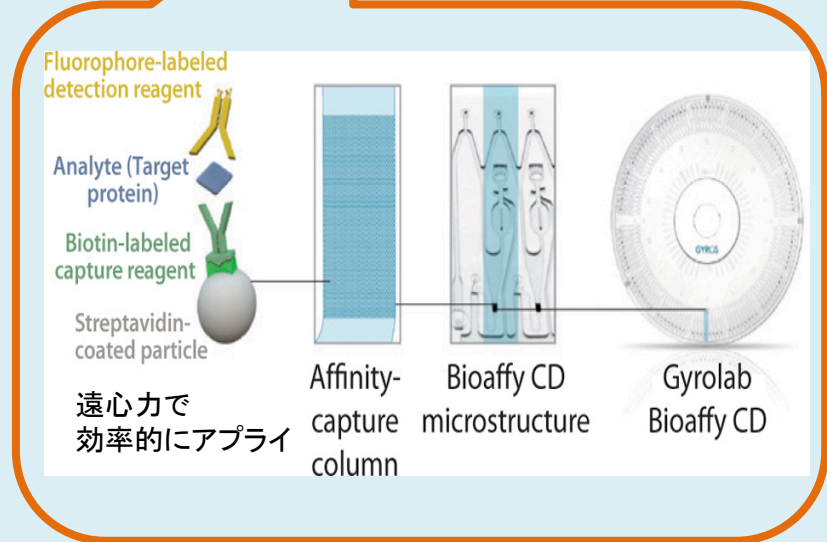


10連オートインジェクター
(2連: 試薬用, 8連: サンプル用)

Bioaffy CD



蛍光レーザーで測定
112アッセイ1.5分で測定



Gyros社資料一部改変

どのような測定で使用するか？

- 探索段階の試験、非臨床試験、臨床試験、GLP試験など様々な目的で使用している。
- 感度面で問題が無ければ、測定条件の確立や多検体測定で活用している。
- サイエンス面や測定依頼側の要望等で常に第一選択の機器となる訳ではない。

他のLBA機器との違いは？

- 半自動装置であるのでLBAの経験が浅くても扱いやすい。
- 測定のトレースがしやすい。
- プレートアッセイに比べると、測定条件の確立が早くできる。
- プレートアッセイでは時間経過によりシグナル値が低下してしまい、測定が難しかった測定対象物をGyrolabで測定できたケースがある。

他のLBA機器との使い分けは？

- 必要な感度によって使い分けている。
- 感度や測定範囲を優先したい場合はECLを選択するケースが多い。
- 濃度測定とADA測定を同時に実施する場合は、他機器を選択することがある。

抗体・タンパク(医薬品)以外の測定経験は？

- バイオマーカー
 - ✓ DGメンバーはGyrolabによるバイオマーカーの測定経験なし。
 - ✓ Gyrolab用キットがあると良さそう。
 - ✓ 測定ターゲットによって向き不向きがある。
 - ✓ 感度面で懸念がある。
 - ✓ マルチプレックスがあると活用シーンが広がり、網羅的解析の可能性がある。

抗体・タンパク(医薬品)以外の測定経験は？

- ニューモダリティ
 - ✓ ADC (Antibody-drug conjugate)、核酸薬の測定に使用している。
 - ✓ 核酸測定 (Hybridization assay) は Biotin と Alexa Fluor が付いたプローブを使用するので、1 step で測定ができる。
 - ✓ 核酸測定はニードルへの影響を考慮する必要がある。

抗体・タンパク(医薬品)以外の測定経験は？

- 遺伝子治療関連

- ✓ Gyros社よりGyrolab AAVX Titer Kitの販売が開始されたが、DGメンバーは使用経験なし。
- ✓ 抗体価の測定ニーズはあり、多検体の測定となれば、Gyrolabが向いている。しかし、試薬のBiotin標識が手間になると思われる。

今後の遺伝子治療創薬の動向がポイントとなる。



抗体・タンパク(医薬品)以外の測定経験は？

- 血漿以外の生体試料
 - ✓ 組織ライセート溶液やホモジネート溶液の核酸薬測定を行っている。
 - ✓ 組織ホモジネート溶液の抗体薬測定を検討したことがあるが、ニードルに影響が生じてしまい、断念した経験がある。
 - ✓ 組織ライセート溶液やホモジネート溶液を試料とした場合、ニードル等にタンパクが凝固吸着してしまうので高倍率の希釈が必要である。

高感度化の対応は？

- CDの種類の変更によって感度向上は見込める。しかし、サンプル量、測定時間やマトリックスの影響の観点からGyrolabの利点が減ってしまうので、ECLを選択することがある。
- REXXIP試薬を検討する。
- REXXIP maxを試したことがあるが、好感触の印象はない。
- スピンメソッドはGyros社で検証を重ねた結果を反映しているのでユーザーで変更しない方が良いと思われる。
- プレートアッセイに比べて、Gyrolabは高感度化の検討項目が限定されてしまう。(反応時間や希釈溶液の検証に制限がある。)
- 反応試薬の組み合わせは、プレートアッセイとGyrolabで相関しないことがあるので、それぞれで検討が必要となる。

ADA測定は？

- Gyrolabの場合、酸処理工程を装置プログラムで実施できるが、他の工程はGyrolabにセットする前に実施しなければならない懸念があり、他機器とあまり変わらないのではないのか。
- ADAはブランクシグナルの安定性が重要であり、Gyrolabではレスポンス値が低くなるように設計されているためブランクのレスポンス値や異常波形が大きく影響してしまい、解析に苦労した経験がある。

* ADAに関する注意点については、DG2021-51のポスターもご参照ください。



Validation

初めに...

Gyrolabにおける主要なValidation項目は他のLBAのプラットフォームと同様です。

GyrolabでValidationを実施する際、機器に特有の留意点はあるのか？

- 試料の注入にニードルを使用するため、キャリーオーバーの確認は必要となる。

タンパク質の等電点が高い場合は、キャリーオーバーが起こる懸念がある。対策として、pH11洗浄液による洗浄が効果的である。



- MRD希釈後の試料中安定性の確認は必要となる。また、検出抗体が不安定な場合は測定時間内の安定性(重要試薬安定性)も考慮する。

測定は何重測定で実施するのか？

- ほとんどは二重測定。三重測定だと二重測定に比べてサンプル量が1.5倍に増え、Gyrolabの利点が無くなる。TK/PK測定でなく、測定値がばらつくような中和抗体測定などでは三重測定も考慮する。

多重測定で実施する際の判定基準は？

- 試験のレベルやばらつき度合いによるが、CV 20-30%の間で設定する。

Validation-*replicate*

CV算出の際、レスポンスか定量濃度のどちらを使用するか？

- レスポンスが生データなので、レスポンスのCVで判断する。海外では定量濃度のCVで評価するところもある。
- ガイドラインで算出方法に決まりはない。検量線の直線以外の範囲ではレスポンスのわずかなずれが定量濃度に影響する。

Validation-*replicate*

GyrolabのSinglet測定の論文やウェビナー等の紹介があるが、実際に実施している？

- DGメンバーは経験なし。ばらつきによるCV外れが起こっている現状、二重測定が安心。
- ガイドライン上、二重は必須だが、ICH M10がそのまま最終化されればSingletも視野に入る。
- Gyrolabの装置としての再現性は良いイメージなのでSingletでもできそうだが、その場合View imageの確認は必要であろう。

View image確認による採用基準があれば良いが、現実的に設定するのは難しいと思われる。



アンカーポイントの設定方法は？

- GyrolabではLLOQやULOQを設定するためには、アンカーポイントの設定が必須である。
- 濃度がLLOQの-25~-30%以下、ULOQが+25~+30%以上になるようにアンカーポイントを設定する。
- ULOQ側のアンカーポイントを設定すると検量線が上に引っ張られ、反るので低濃度の真度がプラスになることもあるため、注意する。

Validation-*anchor point*

アンカーポイントが検量線に影響を与えた場合の対応は？

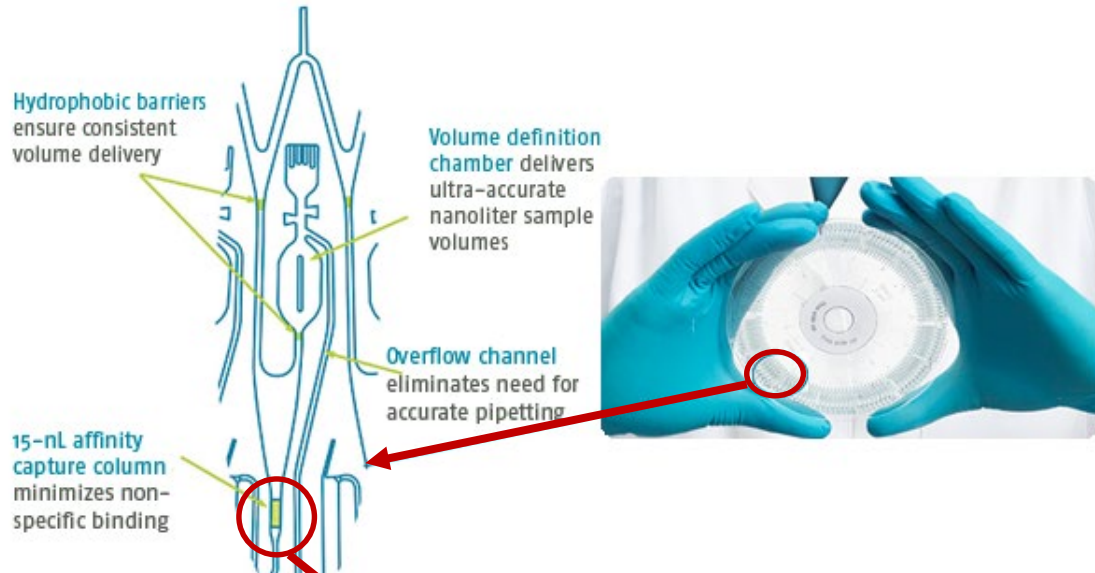
- アンカーポイントが原因であれば解析から外すことは他のプラットフォームと同様。しかしアンカーポイントのCV基準は無し。
- Validationの場合、duplicateのうち1点のみを除外することが可能(ケースバイケース)と規定する。実試料分析の場合、2点とも除外し、検量線範囲を狭める対応もできるが、サンプルの貴重度により再分析・再注入を考える。

解析及び定量するソフトウェアは何を使用するか？

- 主にGyrolab標準ソフトのEvaluatorまたはLIMSで解析する。
- LIMS やSoftMaxProは、アンカーポイント設定不要な解析ができるので検討や重要なデータの解析に使用することもある。

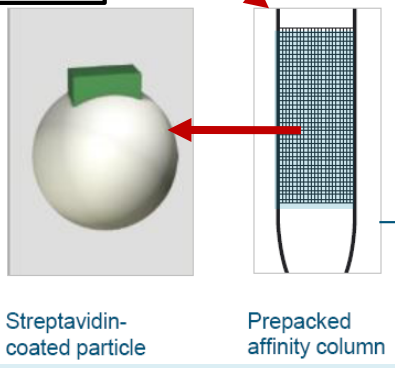


View image

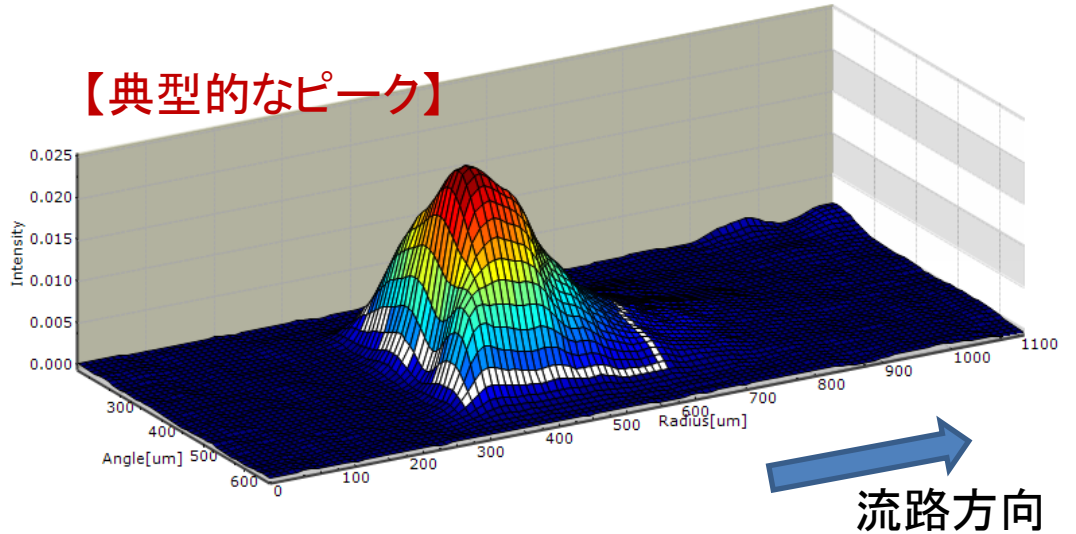


Particleごとの蛍光測定結果を、強度で色分けし、イメージ化。中央付近に流線型のピークを形成する。

Gyros社資料一部改変



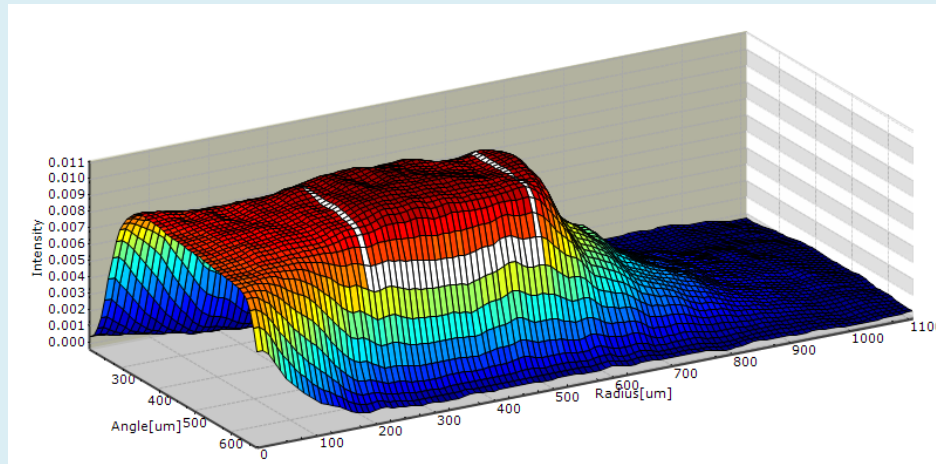
【典型的なピーク】



<http://bioanalysisforum.jp/>

Trouble cases-Abnormal waveform

ニードル及びBioaffy CD内カラムの詰まり

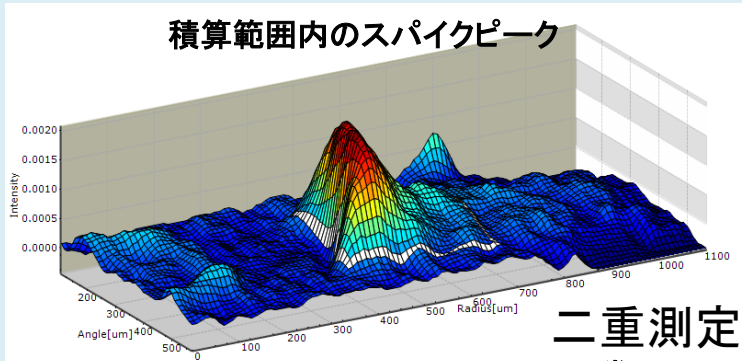


対策

- 測定試料の遠心、フィルターろ過
- 測定直前に試料の遠心(条件は多様)
 - 3,000g, 3-10分
 - 10,000g, 4分
- 洗浄液等のフィルターろ過

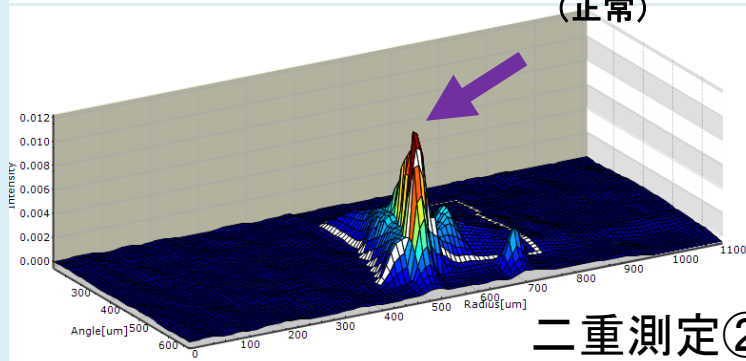
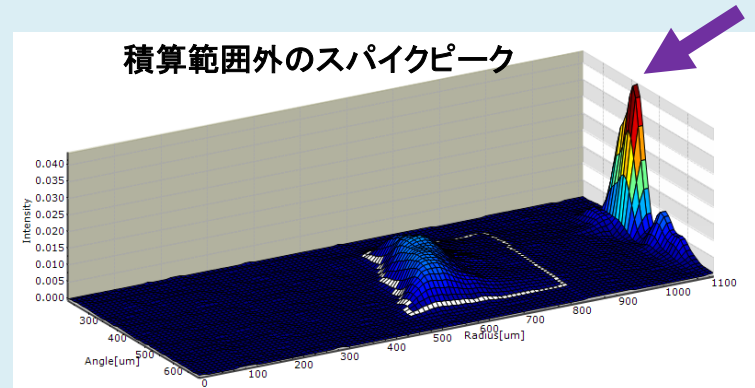
スパイクピーク

積算範囲内のスパイクピーク

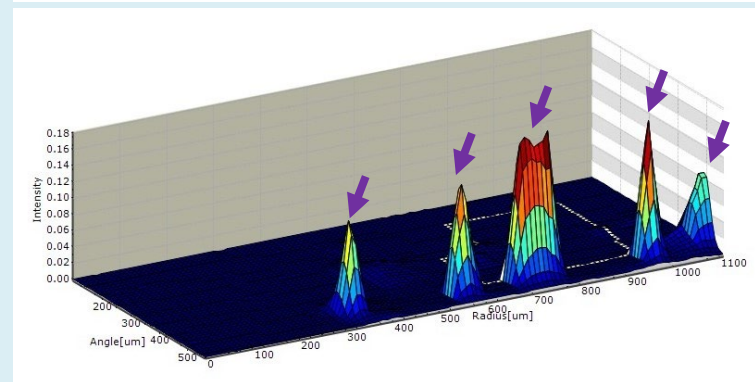


二重測定①
(正常)

積算範囲外のスパイクピーク



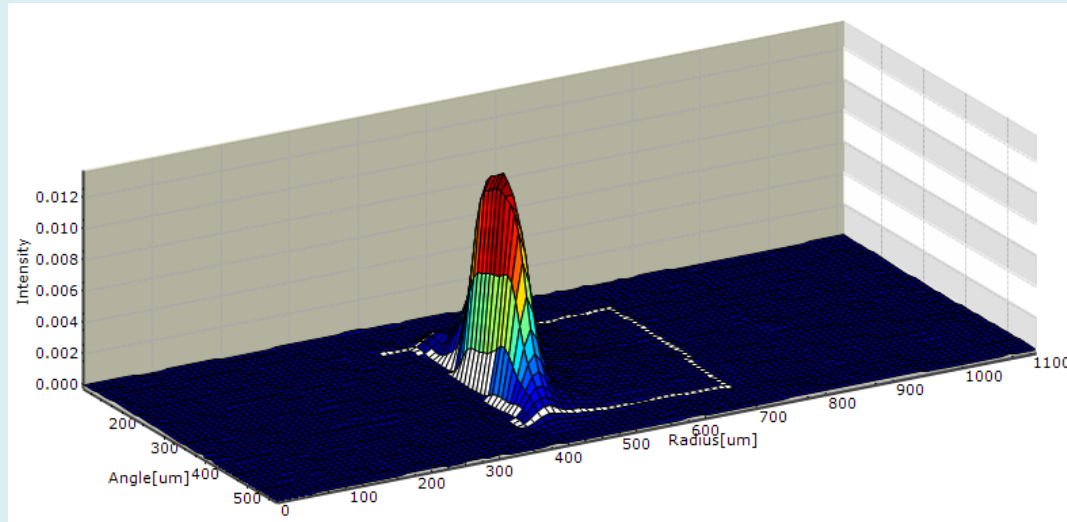
二重測定②



対策

- 原因としてサンプルや試薬、洗浄液のコンタミが考えられるので、詰まりと同様に遠心分離やろ過を行う。

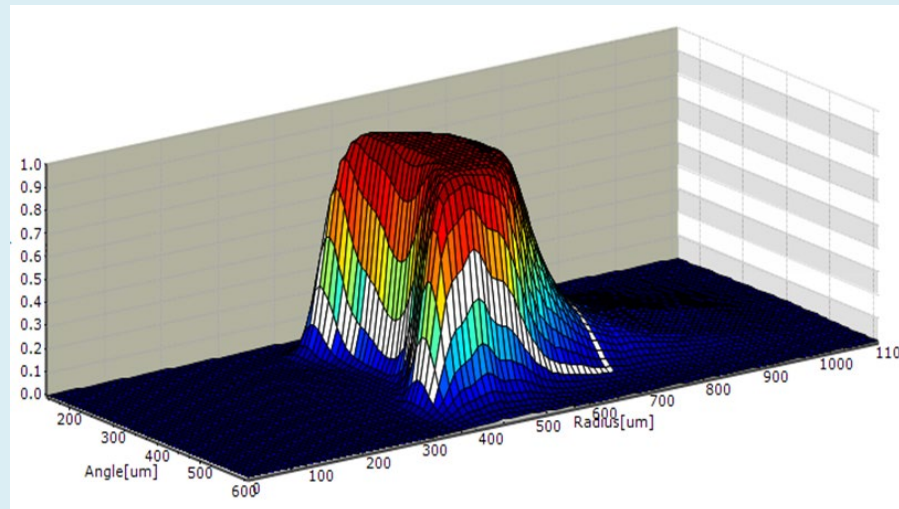
ピーク不良



対策

- ニードルの洗浄で頻度低減は可能であるものの、完全に防ぐことはできない。

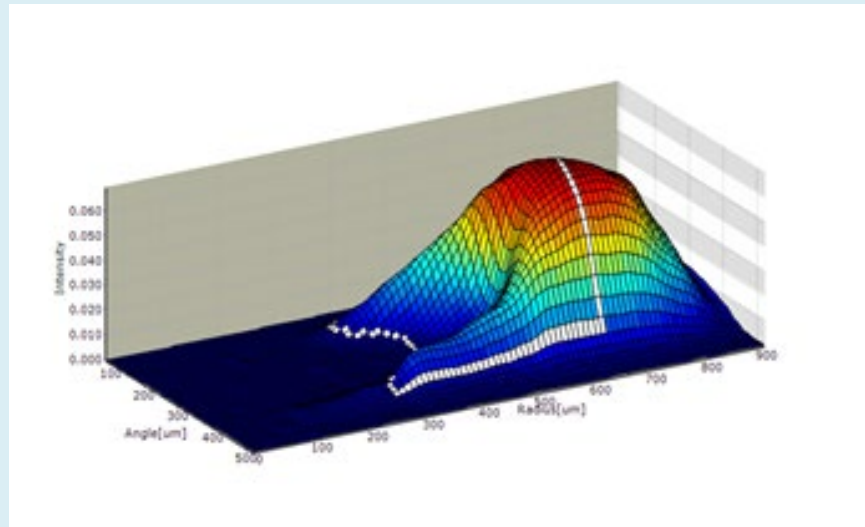
シグナルの飽和



対策

- 検量線範囲・MRD・検出用試薬濃度の最適化。

積算不良



対策

- 積算は、ソフトウェアの自動判断のため、コントロール不可。

Trouble cases-Reinjection

再注入 (Reinjection)とは、初回分析時にMRD希釈した分析試料を用いて、再度分析を実施することである。一方で、**再分析 (Reanalysis)**とは、検量線、QC試料を含め分析する試料を一から調製しなおして分析することである。

再注入は、主に二重測定のCVの判定基準を満たさなかった場合に実施する。

Trouble cases-Reinjection

再注入の発生頻度は、特に低いレスポンス（低濃度）の試料で高くなる。

バリデーションで取得されるMRD希釈後の試料安定性内であれば、回数に制限なく再注入実施可能とするところが多い。再注入にてデータ取得が困難な場合、再分析を実施する。

留意点

- 測定用試薬は、再注入実施時に改めて調製する。
- もしくは、測定用試薬の安定性を取得する場合もあり。
- 特に、Alexa標識検出用試薬について、安定性に難あり。

基本的には取扱説明書に従う。

- Functionality Check (1～3カ月毎)
- 装置流路のプライム
- **ニードルの洗浄、サニタイズ**
- **Wash stationの洗浄**
- CD回転部の洗浄
- 装置内の清掃
- 年一回のベンダーメンテナンス



CVの改善に有効

Maintenance-Needle desorb

留意点

- 核酸薬は金属吸着しやすく、注意が必要。
- 組織ライセート溶液やホモジネート溶液の分析時には固着に注意を払う必要有。

•核酸除去の一例

下記を組み合わせて、連続で実施する。

Wash station solution 1: PBS, 0.02% NaN_3 , 0.01% Tween20

Wash station solution 2: 1.5 mol/L NaCl in 20% EtOH

Needle desorb solution 1-4: 1.5 mol/L NaCl in 20% EtOH

Wash station solution 1: PBS, 0.02% NaN_3 , 0.01% Tween20

Wash station solution 2: 0.5% SDS in 20% EtOH

Needle desorb solution 1, 2: 0.5% SDS

Needle desorb solution 3, 4: Gyrolab wash solution, pH11

Gyrolabを使用するメリットは？

- 検体数
 - ✓ CD1枚あたり48～56検体の測定が可能。
 - ✓ 機械間の差が少ないため施設をまたいだ大量測定ができる。
- 試料量・試薬使用量
 - ✓ 試料量が僅かで済み、マウスのマイクロサンプリングにも対応可能。
 - ✓ 捕捉試薬、検出試薬の測定1回当たりの使用量も少なくて済む。

Gyrolabを使用するメリットは？

- 時間
 - ✓ 測定が約1～2時間で終了するためスループット性が高い。
 - ✓ 前処理から測定までの時間が短いため条件検討が容易。
 - ✓ 夜間の自動測定も可能。
 - ✓ 拘束時間が減るため測定者のQOLが向上。

Gyrolabを使用するメリットは？

- 測定系の構築
 - ✓ 従来のLBA測定とは異なり反応はCD内のアフィニティーカラム (Streptavidin coated beads) を通過する一瞬 (数秒) であり非特異的反応が低減される。
 - ✓ 非特異的な抗体のみでも測定系が構築できる。

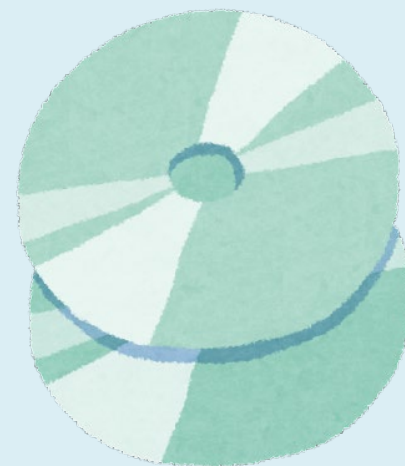
感度やサンプル量はどのくらいですか？

	Sample Volume	Data Point*	Sensitivity	
			MRD 10	MRD 100
Gyrolab Bioaffy 200	4 μ L	56	10-50 ng/mL	100-500 ng/mL
Gyrolab Bioaffy 1000	8 μ L	48	2-10 ng/mL	20-100 ng/mL
Gyrolab Bioaffy 4000	12 μ L	48	0.5-2.5 ng/mL	5-25 ng/mL

*Number of data to be measured in duplicate

DGメンバーの意見

- 測定レンジは100倍から1,000倍程度で、吸光度測定よりは良いが、ECL未満。



Gyrolab使用時の留意点は？

- コスト
 - ✓ 希釈試薬やCDなどの消耗品が高価であり、コストアップの要因となる。
- 装置
 - ✓ 二重測定のCVオーバーが他のLBA装置と比較して多い。
 - ✓ ニードル洗浄 (Desorb、Sanitize) に時間を要する。
 - ✓ システムが複雑なので故障時の原因追究が難しい。

ニードルを使用するのが他のLBA機器とは異なる特徴である。



DGメンバーが期待することはありますか？

- 核酸薬に関してはニードル洗浄を実施することが多いため、ニードル洗浄までプログラムに組み込めると便利。
- 自社でのニードル交換は不可であり不便。
- ベンダーメンテナンス、しばらくは二重測定のCVオーバーが減る傾向がある。ベンダーメンテナンスでのクリーンアップ方法を自社で出来ないか。
- Evaluatorではアンカーポイント上下2点が必要になるので、外挿値が算出できるようにしてほしい。