

高感度 1 分子カウント技術 (SMC™) を用いた バイオマーカー測定

～ L S I メディエンスによる分析技術紹介～

*Biomarker measurement by high-sensitivity immunoassay,
Single Molecule Counting (SMC™) Technology;
Introduction of analytical technology by LSI Medience Corp.*

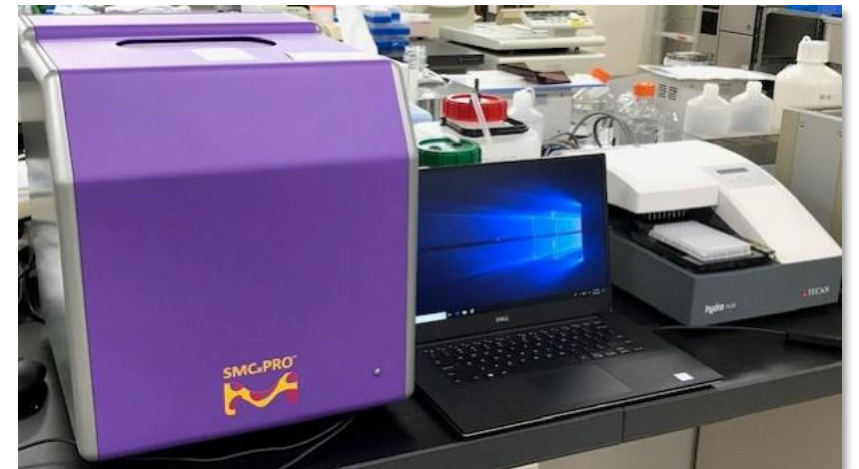
株式会社 L S I メディエンス
メディカルソリューション本部
高度技術分析センター 医薬品分析部
森 香奈絵

内 容

LSIメディエンスのご紹介

Verified High Sensitivity アッセイキットを使用した測定

SMCTM アッセイ構築用キットを使用した測定法の開発



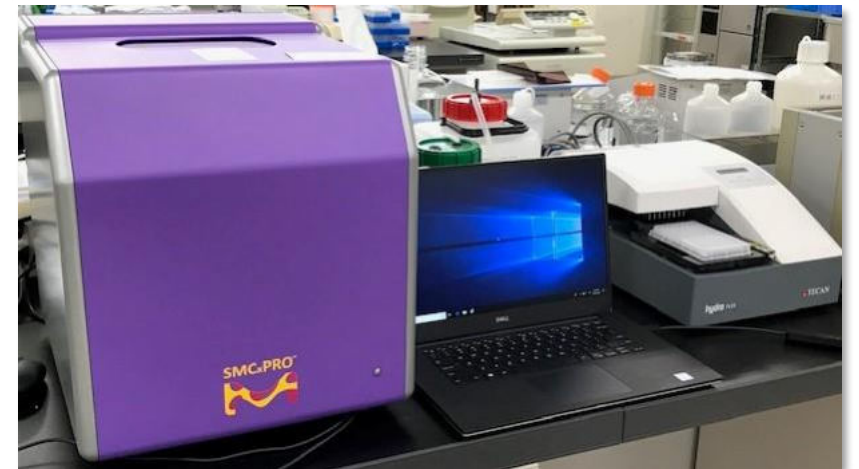
SMCxPROTM

内 容

LSIメディエンスのご紹介

Verified High Sensitivity アッセイキットを使用した測定

SMCTM アッセイ構築用キットを使用した測定法の開発



SMCxPROTM

サービス範囲



安全性試験・
薬物動態試験

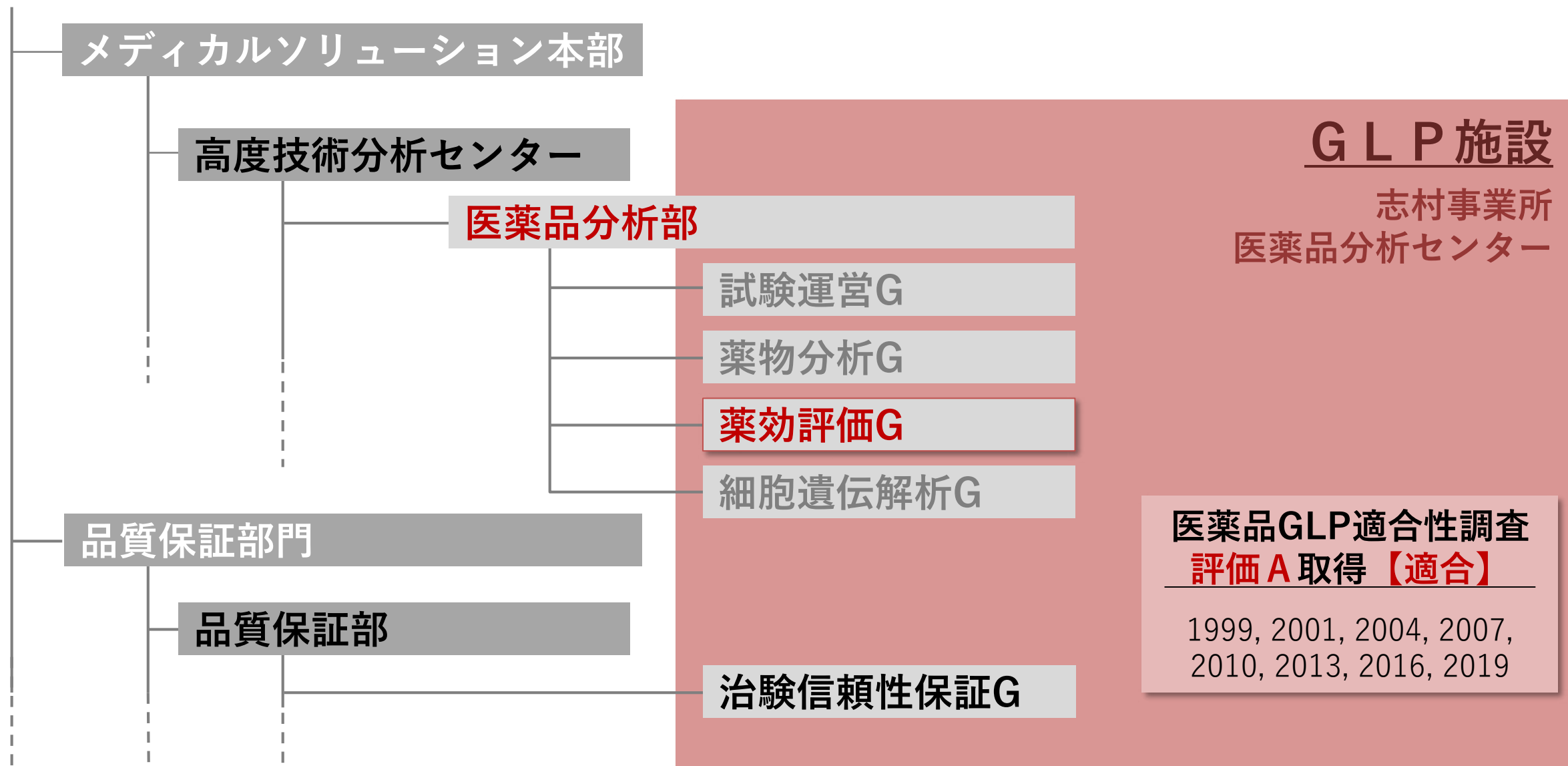
第Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ相
臨床試験

市販後
臨床試験

医薬品分析部

	—	動物サンプル	ヒトサンプル	ヒトサンプル
分析タイプ	バイオマーカー	<ul style="list-style-type: none"> TK・PK 抗薬物抗体 	<ul style="list-style-type: none"> PK 抗薬物抗体 バイオマーカー バイオ・バンキング 	<ul style="list-style-type: none"> PK 抗薬物抗体 バイオマーカー
試験タイプ	予備検討	<ol style="list-style-type: none"> バリデーション (測定法の検証) 実検体測定 		

医薬品分析部の組織

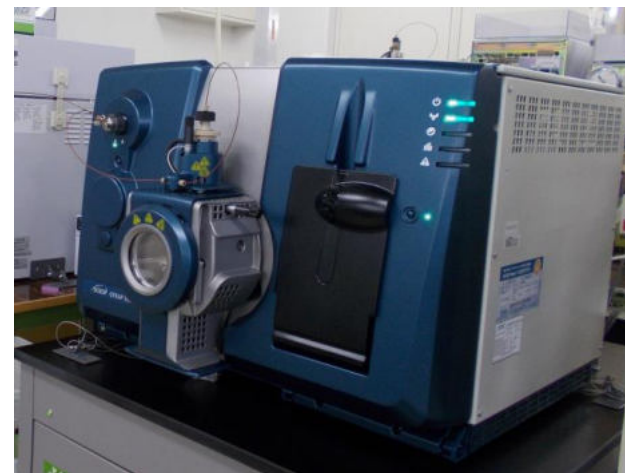


医薬品分析部の組織

- **イムノアッセイ**を用いた生体試料中バイオマーカー測定法開発及び分析
- 医薬品開発における**LC-MS/MS**を用いたバイオマーカー測定法開発及び分析
- 新技術、研究的な社内外の連携

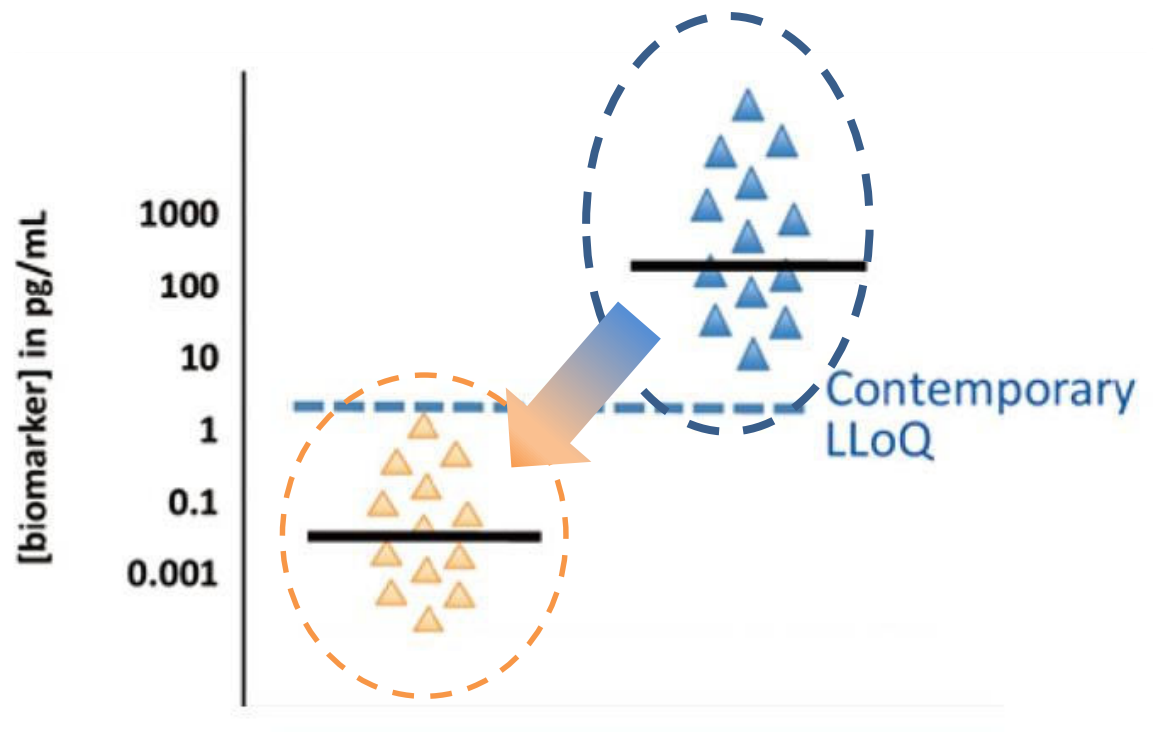


電気化学発光 (ECL)
全自動ELISAシステム
(Gyrolab xP Workstation)



QTRAP 6500
QTRAP 5500

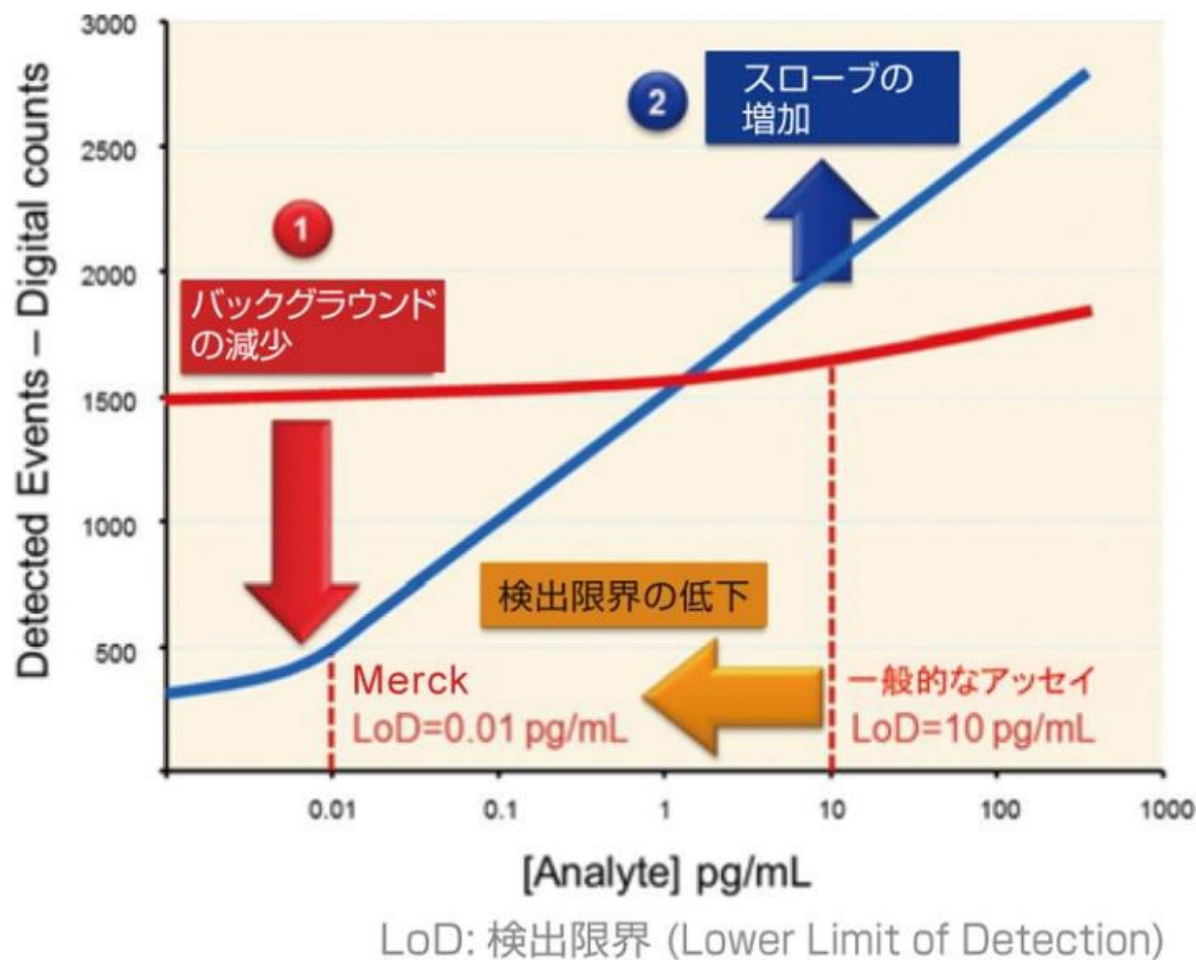
近年の傾向 (バイオマーカー測定, LBA法)



- 正常検体中のバイオマーカーの定量
- 微量マトリックスでの定量
- 組織 (ホモジネート希釈液) 中
バイオマーカーの定量

定量下限 : 1~数十 pg/mL ▶ 0.01~1 pg/mL

SMCxPRO™の導入



- 専用のアッセイキットと SMC™ 技術の組み合わせによる高感度化

バックグラウンドの減少やスロープの増加により、高感度化を実現

- 検証済みアッセイキットの種類が豊富

50項目のアッセイキット

- アッセイ構築用キットを用いた検討により、測定法のアレンジが可能

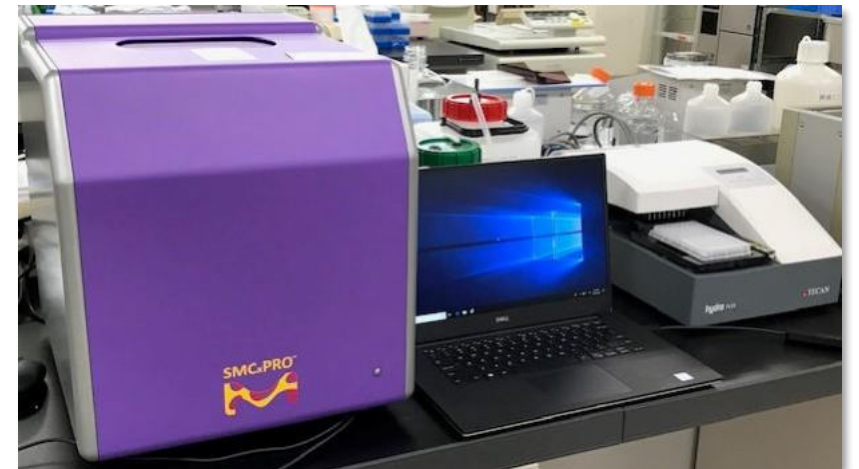
磁気ビーズ法やプレート法の検討も可能

内 容

LSIメディエンスのご紹介

Verified High Sensitivity アッセイキットを使用した測定

SMCTM アッセイ構築用キットを使用した測定法の開発



SMCxPROTM

アッセイキットを使用した測定 (IL-5)

• 従来のELISAキット (ヒト血清用)

	LLoQ
A社	3.9 pg/mL
B社	7.8 pg/mL

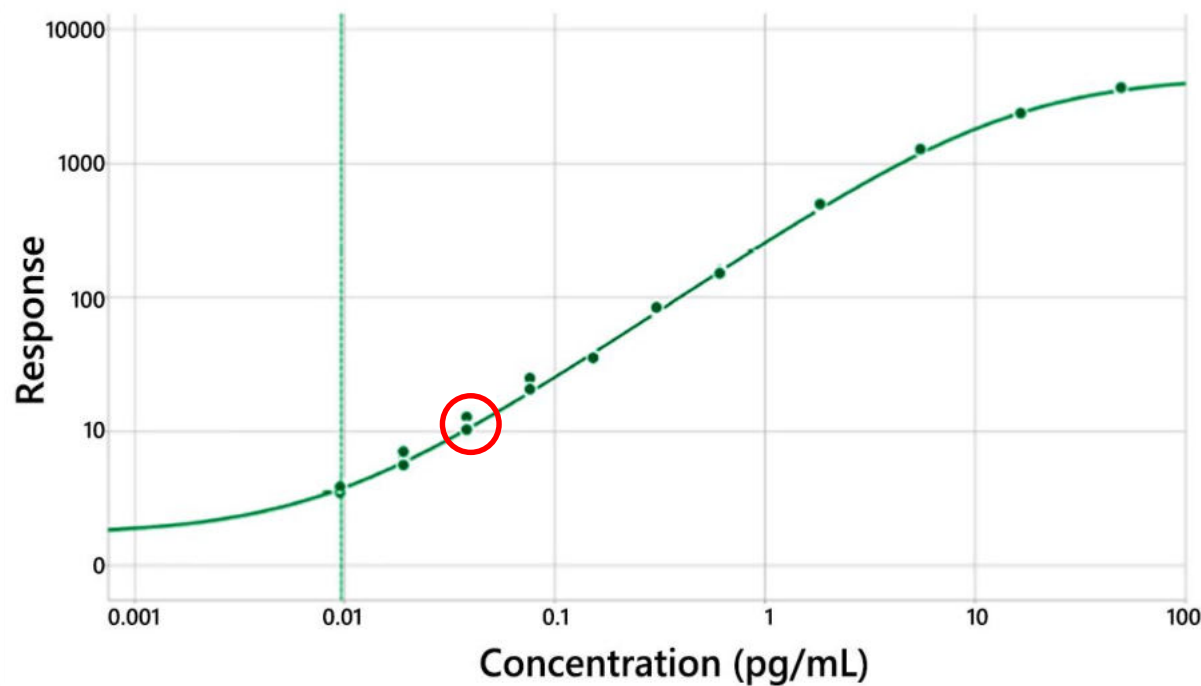
被験者によっては、LLoQ未満で定量値が得られないことがある。

• SMCTM用アッセイキット導入の検討 (ヒト血清)

	LLoQ
SMCxPRO TM 用アッセイキット	0.039 pg/mL

従来のELISAキットではLLOQ未満となっていた被験者でも、定量値が得られる可能性が増えた。

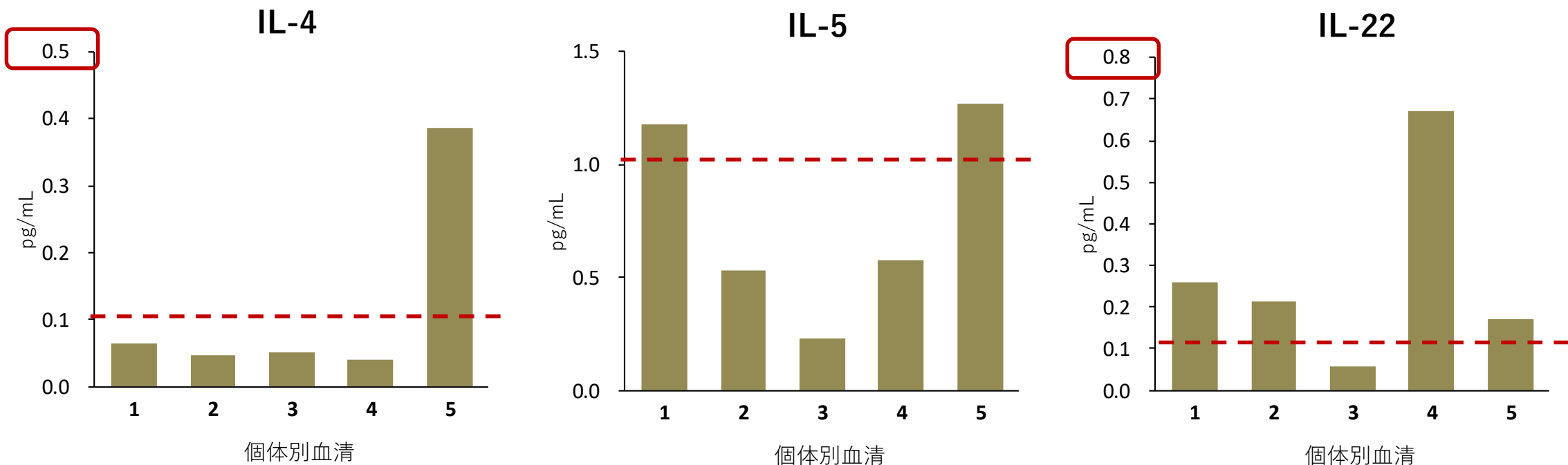
実施事例 [IL-5] : 検量線



理論濃度 (pg/mL)	逆回帰濃度 (pg/mL)	試料数	CV (%)	Recovery (%)
0.010	0.010	3	13.2	99.2
0.019	0.021	3	14.9	107.4
0.039	0.041	3	13.5	106.0
0.077	0.084	3	12.6	108.9
0.154	0.136	3	2.8	88.3
0.308	0.318	3	2.4	102.9
0.617	0.600	3	3.2	97.3
1.85	1.91	3	2.8	103.3
5.56	6.12	3	3.3	110.1
16.7	15.0	3	3.5	89.9
50.0	48.9	3	3.3	97.8

- 0.039～50.0 pg/mLの範囲で、良好な定量性を確認した。
- triplicate測定におけるCV%, RecoveryがLBAガイドラインの基準内
(duplicate測定においても、同等の結果であることを確認済み)
- 定量限界・日内再現性確認済み
- 他のサイトカインについても、従来キットよりも高感度測定が可能であることを確認

実施事例 [IL-4, IL-5, IL-22] : 個体別測定値



購入血清（健常人）5個体の定量結果を得られた。
 いずれの項目においても、1 pg/mL未満のサンプルについて、
 定量が可能となった。

実施事例 [IL-5] : 解析結果

アッセイ情報

xPRO Final Report

File Name: 2020-10-22_4.xpr **Printed By:** 8105236
Experiment Created By: 0282250 **Printed On:** Fri Dec 11 2020 17:59:56 Tokyo Standard Time
Created On: Thu Oct 22 2020 18:23:6 **Last Modified On:** Fri Dec 11 2020 17:59:28 Tokyo Standard Time
Last Modified By: 8105236 **Executed By:** 0282250
Experiment Name: Quadrant 1 **Instrument:** SMCL19
Executed On: Thu Oct 22 2020 21:55:5 **Instrument SW:** 1.1.405
Analysis SW: 1.1.405 **Printed By SW:** 1.1.405

Standard Curves

Group	Fit	LLOQ (pg/mL)	R Squared	Slope	LoD (pg/mL)	Curve Parameters
IL-5 Standard	4PL	0.010	0.998	247.988	0.003	Bottom: 1.699, Hill Slope: 1.052, EC50: 14.433, Top: 4454.725

Standards

IL-5 Standard (Plate: Plate 1)
vs. IL-5 Standard (4PL)

Sample ID	Wells	Expected (pg/mL)	# Replicates	mean Interp. (pg/mL)	SD	CV%	mean Response	Recovery
A1 C1 E1		50.000	3	48.918	1.633	3.3%	3567.434	97.8%
A3 C3 E3		16.667	3	14.982	0.524	3.5%	2271.383	89.9%
A5 C5 E5		5.556	3	6.117	0.204	3.3%	1286.156	110.1%
A7 C7 E7		1.852	3	1.913	0.054	2.8%	476.696	103.3%
A9 C9 E9		0.617	3	0.600	0.019	3.2%	153.533	97.3%
A11 C11 E11		0.308	3	0.318	0.008	2.4%	80.738	102.9%
A13 C13 E13		0.154	3	0.136	0.004	2.8%	34.482	88.3%

検量線

検量線
ポイントの結果

Sample ID	Wells	Expected (pg/mL)	# Replicates	mean Interp. (pg/mL)	SD	CV%	mean Response	Recovery
A15 C15 E15		0.077	3	0.084	0.011	12.6%	21.489	108.9%
A17 C17 E17		0.039	3	0.041	0.006	13.5%	10.997	106.0%
A19 C19 E19		0.019	3	0.021	0.003	14.9%	6.253	107.4%
A21 C21 E21		0.010	3	0.010	0.001	13.2%	3.720	99.2%
A23 C23 E23		0.000	3	-	-	-	1.749	-

Controls

No Control Groups

Unknowns

IL-5 Sample (Plate: Plate 1)
vs. IL-5 Standard (4PL)

Sample ID	Wells	# Replicates	mean Interp. (pg/mL)	SD	CV%	mean Response	Dilution Factor
G1 G3 G5		3	1.181	0.028	2.4%	300.481	1.000
G7 G9 G11		3	1.174	0.037	3.2%	298.650	1.000
I1 I3 I5		3	0.528	0.010	1.9%	134.815	1.000
I7 I9 I11		3	0.558	0.034	6.1%	142.551	1.000
K1 K3 K5		3	0.229	0.021	9.3%	58.026	1.000
K7 K9 K11		3	0.243	0.006	2.5%	61.708	1.000
M1 M3 M5		3	0.579	0.061	10.5%	148.062	1.000
M7 M9 M11		3	0.623	0.036	5.8%	159.289	1.000
O1 O3 O5		3	1.266	0.080	6.3%	321.507	1.000
O7 O9 O11		3	1.096	0.631	57.6%	277.123	1.000

Outliers

No Excluded Wells

Signatures

Time	Reason


サンプルの結果

実施事例 [IL-5] : 解析結果 | アッセイ情報

測定リストの
作成日時、
作成者ID

測定開始日時、
実施者ID

xPRO Final Report



File Name:	2020-10-22_4.xpr	Printed By:	8105236
Experiment Created By:	0282250	Printed On:	Fri Dec 11 2020 17:59:56 Tokyo Standard Time
Created On:	Thu Oct 22 2020 18:23:6 Tokyo Standard Time	Last Modified On:	Fri Dec 11 2020 17:59:28 Tokyo Standard Time
Last Modified By:	8105236	Executed By:	0282250
Experiment Name:	Quadrant 1	Instrument:	SMC119
Executed On:	Thu Oct 22 2020 21:55:5 Tokyo Standard Time	Instrument SW:	1.1.405
Analysis SW:	1.1.405	Printed By SW:	1.1.405

印刷日時、
担当者ID

解析日時、
解析者ID

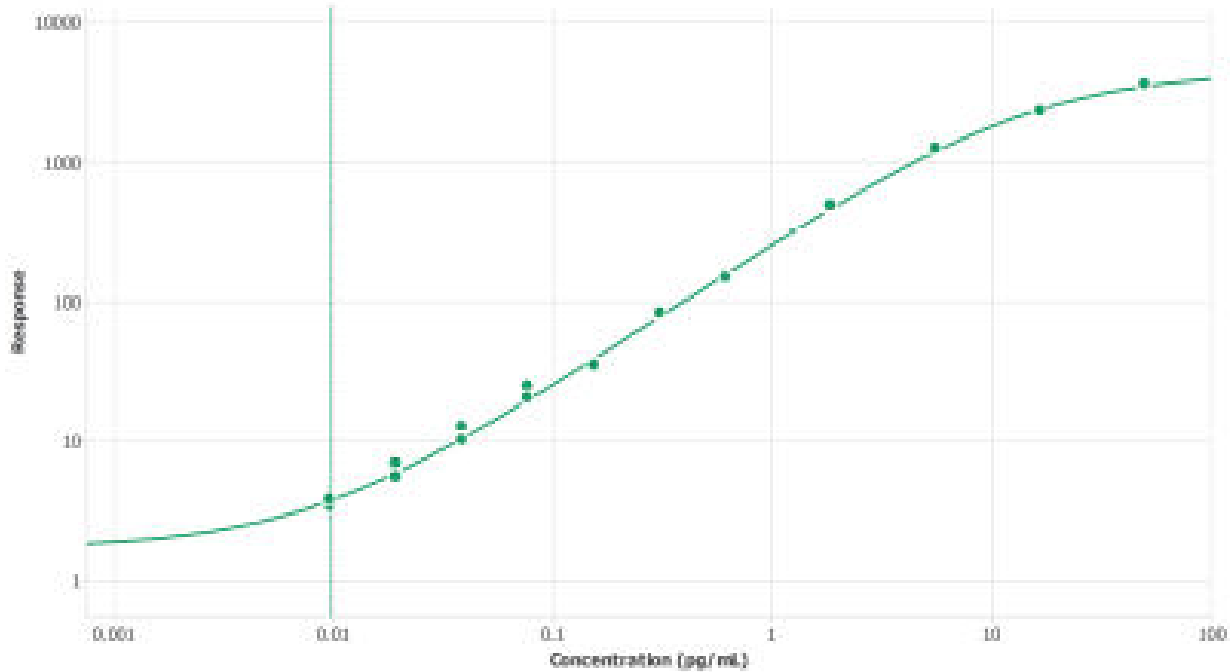
ファイル作成からデータ解析までの、日時や実施者を表示

実施事例 [IL-5] : 解析結果 | 検量線

Standard Curves

Group	Fit	LLOQ (pg/mL)	R Squared	Slope	LoD (pg/mL)	Curve Parameters
IL-5 Standard	4PL	0.010	0.998	247.988	0.003	Bottom: 1.699, Hill Slope: 1.052, EC50: 14.433, Top: 4454.725

検量線
パラメータ



除外ポイントは、「×」で表記

実施事例 [IL-5] : 解析結果 | 検量線ポイント、Controlの結果

測定ウェル
(回帰に用いたウェル)

Standards

IL-5 Standard (Plate: Plate 1)

vs. IL-5 Standard (MPL)

Sample ID	Wells	Expected (pg/mL)	# Replicates	mean Interp. (pg/mL)	SD	CV%	mean Response	Recovery
A1	C1 E1	50.000	3	48.918	1.633	3.3%	3567.434	97.8%
A3	C3 E3	16.667	3	14.982	0.524	3.5%	2271.383	89.9%
A5	C5 E5	5.556	3	6.117	0.204	3.3%	1286.156	110.1%
A7	C7 E7	1.852	3	1.913	0.054	2.8%	476.696	103.3%
A9	C9 E9	0.617	3	0.600	0.019	3.2%	153.533	97.3%
A11	C11 E11	0.308	3	0.318	0.008	2.4%	80.738	102.9%
A13	C13 E13	0.154	3	0.136	0.004	2.8%	34.482	88.3%

バックカリキュレーション値

シグナル値

Recovery

理論濃度

Sample ID	Wells	Expected (pg/mL)	# Replicates	mean Interp. (pg/mL)	SD	CV%	mean Response	Recovery
A15	C15 E15	0.077	3	0.084	0.011	12.6%	21.489	108.9%
A17	C17 E17	0.039	3	0.041	0.006	13.5%	10.997	106.0%
A19	C19 E19	0.019	3	0.021	0.003	14.9%	6.253	107.4%
A21	C21 E21	0.010	3	0.010	0.001	13.2%	3.720	99.2%
A23	C23 E23	0.000	3	-	-	-	1.749	-

Controls

Outliers

No Excluded Wells

除外ポイント

試料数
(回帰に用いたデータ数)

CV%



実施事例 [IL-5] : 解析結果 | Unknown (サンプル) の結果

測定ウェル
(解析に用いたウェル)

試料数
(解析に用いたデータ数)

CV%

シグナル値

Unknowns
IL-5 Sample (Plate: Plate 1)
vs. IL-5 Standard (4PL)

Sample ID	Wells	# Replicates	mean Interp. (pg/mL)	SD	CV%	mean Response	Dilution Factor
	G1 G3 G5	3	1.181	0.028	2.4%	300.481	1.000
	G7 G9 G11	3	1.174	0.037	3.2%	298.650	1.000
	I1 I3 I5	3	0.528	0.010	1.9%	134.815	1.000
	I7 I9 I11	3	0.558	0.034	6.1%	142.551	1.000
	K1 K3 K5	3	0.229	0.021	9.3%	58.026	1.000
	K7 K9 K11	3	0.243	0.008	2.5%	61.708	1.000
	M1 M3 M5	3	0.579	0.061	10.5%	148.062	1.000
	M7 M9 M11	3	0.623	0.038	5.8%	159.289	1.000
	O1 O3 O5	3	1.266	0.080	6.3%	321.507	1.000
	O7 O9 O11	3	1.096	0.631	57.6%	277.123	1.000

Outliers
No Excluded Wells

除外ポイント

定量値
(希釈を反映した値)

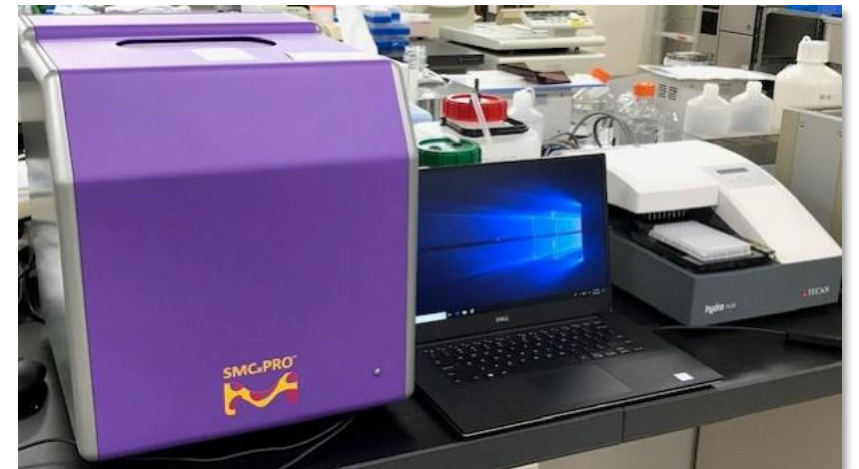
希釈倍率

内 容

LSIメディエンスのご紹介

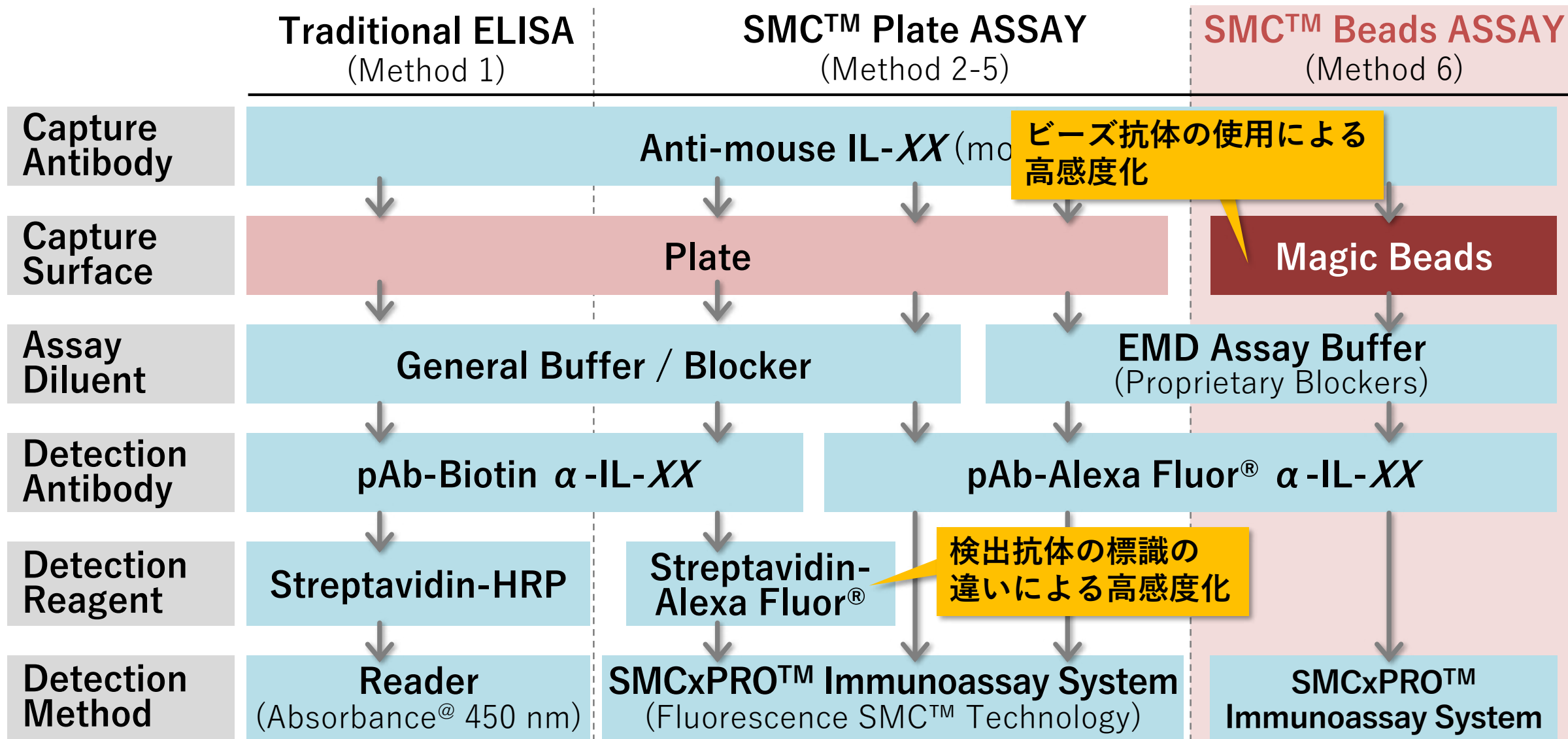
Verified High Sensitivity アッセイキットを使用した測定

SMCTM アッセイ構築用キットを使用した測定法の開発



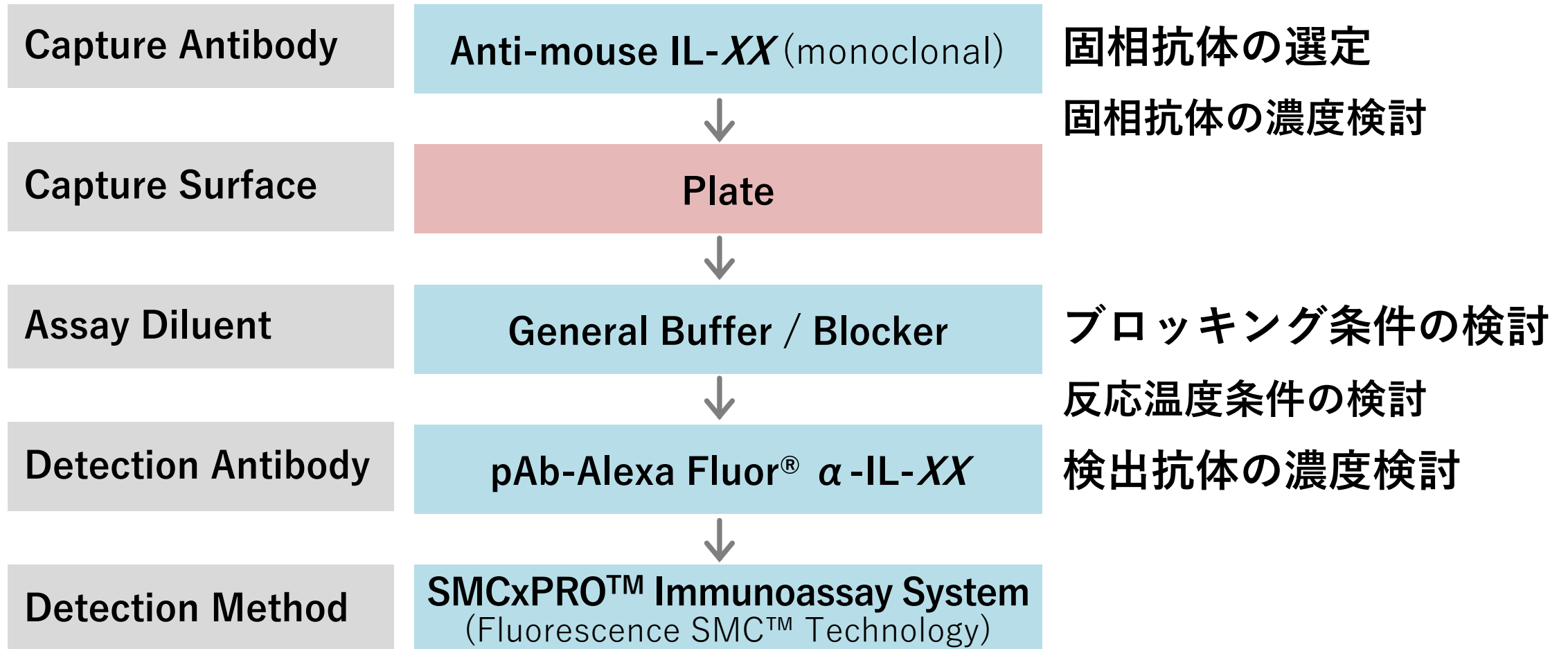
SMCxPROTM

アッセイ構築用キットを使用した検討 | フロー



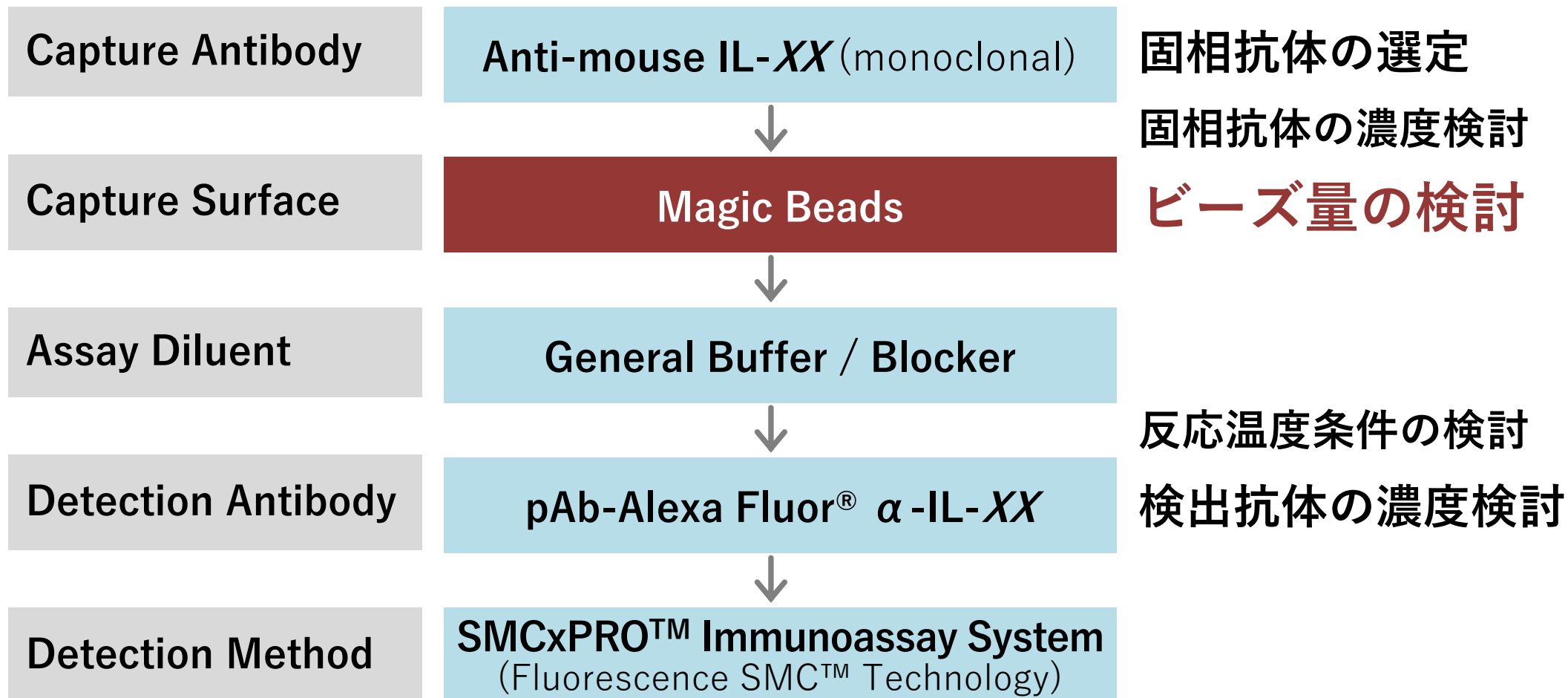
アッセイ構築用キットを使用した検討 | 実施例

サイトカイン [プレート法]



アッセイ構築用キットを使用した検討 | 実施例

サイトカイン [ビーズ法]



アッセイ構築用キットを使用した検討

高感度化

Traditional
ELISA

SMC™
Plate ASSAY

SMC™
Beads ASSAY

× 20

× 5

× 100

アッセイ構築用キットを使用した検討 | 実施例

神経疾患マーカー

- ビーズ法を採用
- 全ての試薬について、メーカー比較も含めて検討

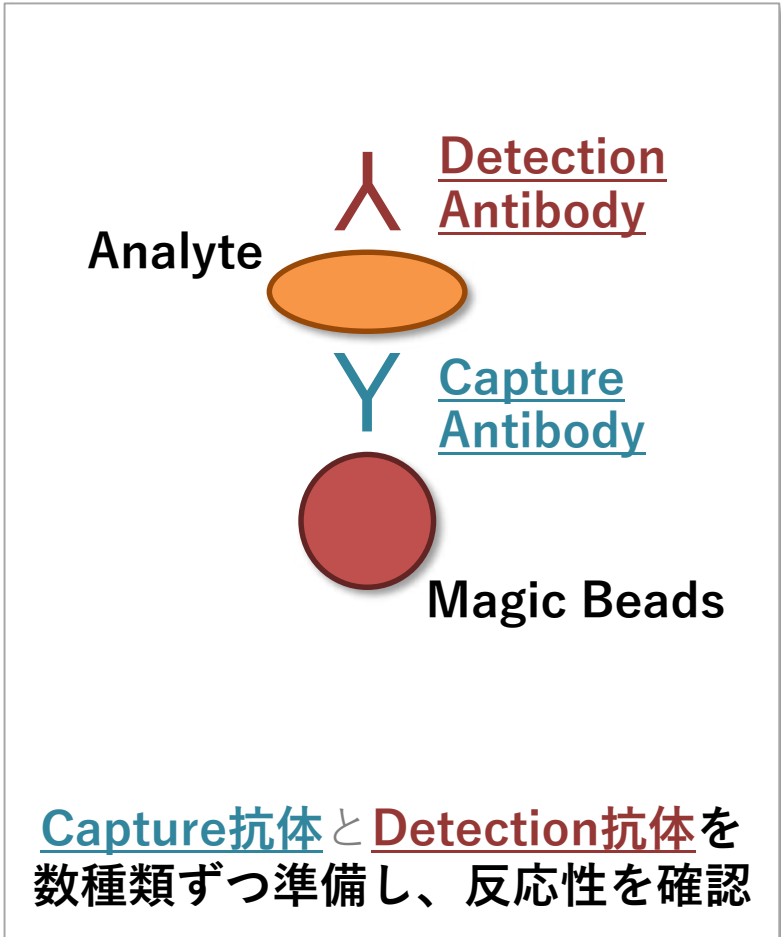
	LLoQ
従来のELISA法	0.3 pg/mL (S/N比 低い)
SMCxPRO™	0.077 pg/mL (S/N比 良好)

約4倍の高感度化

アッセイ構築用キットを使用した検討 | 実施例

神経疾患マーカー

<u>Capture Antibody</u>	Capture Antibody (monoclonal)
Capture Surface	Plate / Magic Beads
Assay Diluent	Buffer / Blocker
<u>Detection Antibody</u>	pAb-Alexa Fluor [®] XXX
Detection Method	SMCxPRO [™] Immunoassay System (Fluorescence SMC [™] Technology)



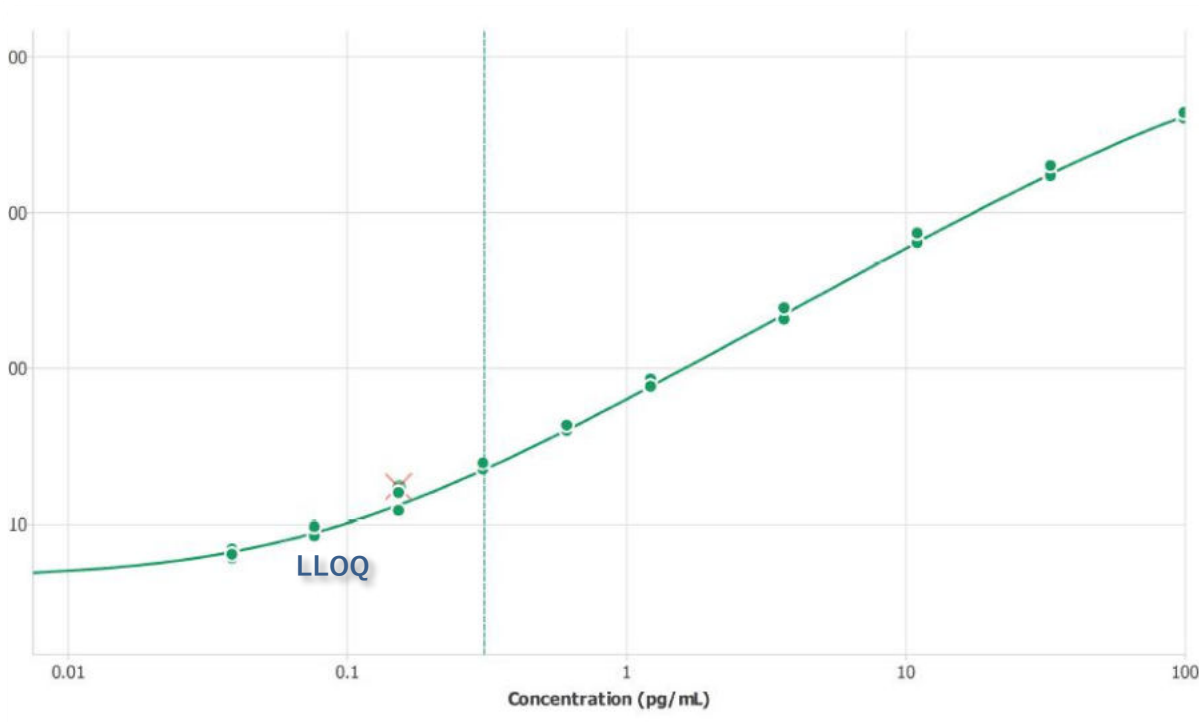
神経疾患マーカー測定法の検討 | 検量線

Batch No.	1		2		3		4	
Analyte (pg/mL)	Resp.	Recovery (%)	Resp.	Recovery (%)	Resp.	Recovery (%)	Resp.	Recovery (%)
0	9.296	-	4.63	-	3.883	-	3.466	-
0.039	15.171	-	6.36	86.1%	4.717	-	5.585	114.0%
0.077	16.591	107.9%	9.07	104.7%	6.838	118.7%	7.044	95.0%
0.154	20.726	85.8%	13.84	105.6%	9.732	115.7%	11.275	100.3%
0.309	34.589	96.1%	23.21	104.2%	13.928	98.9%	22.037	114.2%
0.617	70.997	119.1%	41.50	102.3%	23.968	99.7%	37.121	100.9%
1.23	109.808	98.2%	77.19	100.1%	44.224	101.7%	69.936	97.0%
3.70	297.803	96.3%	215.36	96.0%	120.385	100.1%	212.257	97.3%
11.1	878.898	103.5%	693.57	107.0%	347.232	101.8%	666.678	102.1%
33.3	2248.739	104.3%	1765.63	99.2%	959.897	99.4%	1873.975	104.6%
100	4543.544	98.2%	4207.81	99.2%	2626.7	100.1%	4018.039	98.4%

定量限界として0.077 pg/mL程度の系であることを確認
(感度としては0.039 pg/mL, S/N比良好)

神経疾患マーカー測定法の検討 | 定量限界

Analyte (pg/mL)	Measured Values Individual			Measured Values Mean	CV (%)	Recovery (%)
0.077	0.072	0.069	0.075	0.072	4.2	93.5
0.154	0.211	0.137	0.157	0.168	22.7	109.4



検量線定量限界として
0.077 pg/mLの再現性が
確認された。

ま と め

■ より高感度なバイオマーカー測定が可能となった。

- 多種多様なSMC x PRO™用アッセイキット
- GLP試験の試験資料に対応した解析結果

■ 既存メソッドの高感度化検討の幅が広がった。

- アッセイ構築キットによる簡便な検討
- 使用抗体や試薬から検討することで、独自の方法も構築可能

**ご清聴
ありがとうございました**

