

自動化学発光アッセイにおける 磁気ビーズ再分散の影響

著者

Amaia Altuna, Tim Keates,
Aled Jones
Agilent Technologies, Inc.

概要

磁気ビーズの均一な再分散と固形分含有量は、本質的に関連する 2 つのパラメータですが、時間的な制約と高材料コストが原因で、自動化学発光免疫測定 (chemiluminescent immunoassay, CLIA) アプリケーションでは見落とされがちです。タンパク質結合中のビーズ損失、不均一なビーズ分散による不完全なリガンド結合、ビーズ固体の不正確な追加は、再現性がなく誤解を生じさせるデータにつながり、アッセイ結果の解釈に悪影響を及ぼす恐れがあります。このアプリケーションノートでは、磁気ビーズの再分散を考慮することでアッセイデータの一貫性がどのように向上するかを示し、磁気ビーズ固体計算が適切に行われない場合に、CLIA アプリケーションにどのような影響があるかに焦点をあてます。

はじめに

超常磁性微粒子（「磁気ビーズ」）は、血液・尿・食物・組織などの複雑で不均一な生物学的マトリックスを分析する際の分離支持体として一般的に使用されています。磁気ビーズは多くの場合、特定のターゲットに対して選択的になるように、生体分子で機能化されます。CLIA に磁気ビーズを固相として利用しようとする、アッセイ開発者にとって多くの課題が生じる可能性があります。アッセイの再現性を確保し、シグナルノイズ比を最大化し、偽陽性または偽陰性を回避するには、多くの場合、複数のパラメータの最適化が必要です。最適化されていないアッセイデータは、サンドイッチアッセイ用に選択された抗体ペア間の複雑なタンパク質相互作用の結果であることがあります。しかし、ビーズの取り扱い技術が不十分であると、CLIA の性能も大きく影響を受ける可能性があります。

このアプリケーションノートの目的は、Agilent LodeStars 磁気ビーズを適切に再分散させることで、その後の CLIA アッセイで測定されるサンプル濃度のばらつきが最小限に抑えられる（変動係数 [CV] < 3 %）ことを実際に示すことです。重量を測定して、固形分含有量にばらつきが 3 % 以上記録された場合の再分散効率を決定しました。これらのばらつきが自動 CLIA アッセイに持ち込まれると、偽陽性または偽陰性の可能性に影響を及ぼすという結果が観察されました。光学顕微鏡画像も使用して、均一なビーズ分散と不均一なビーズ分散の違いを示しました。

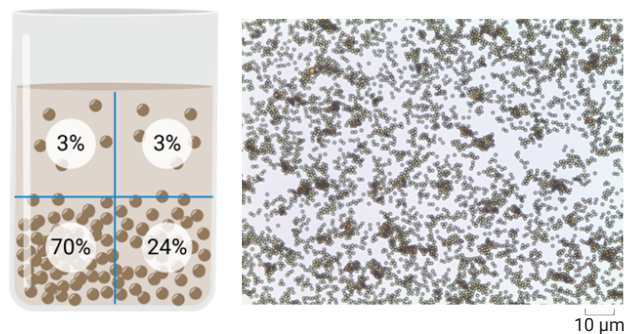
サンプル調製

固形分含有量が既知の LodeStars 2.7 ストレプトアビジンビーズを、ボトルローラーを用いて室温で 60 回転/分 (rpm)、16 時間以上、完全に再分散させました。この完全に再分散した物質を 100 mL ずつ複数回に分けて 125 mL のサンプル容器に分割し、2 ~ 8 °C で 3 か月間保存しました。この保管期間をかけて、ビーズを沈殿させました。沈殿したビーズを使用すると、分散が適切に処理されない場合の固体測定への影響をより適切に評価できます。プロセス変数のいくつかについて調査するため、この方法で準備したサンプル容器を次のセクションで説明するようにさらに処理を行いました。

結果と考察

LodeStars 2.7 ストレプトアビジンビーズの再分散は、さまざまなメソッド（例：ローリング、手動による振とう）を使用して実行できます。ただし、すべてのメソッドが均一な再分散を実現できるわけではありません。図 1 は、ビーズが完全に再分散されていない場合の分割プロセスの影響を示しています。分散が不十分だと、サンプル中でビーズ濃度が異なり、サンプルを採取した場所に応じて固形分含有量が異なる可能性があります。

A 不十分で均一でない分散



B 完全かつ均一な分散

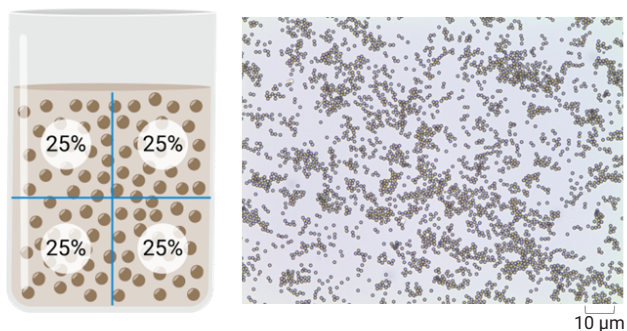


図 1. 光学顕微鏡画像。(A) 再分散が不十分なサンプルと (B) 再分散が完全なサンプル

分散メソッド

分散に関連するさまざまな一般変数について、それらを制御したり分散を軽減するための戦略を実施したりすることの重要性を示すために、調査を行いました。

- サンプルング場所と順序
- 再分散時間
- 懸濁時間
- 攪拌速度 (rpm)
- 容器の充填レベル
- ボトルの体積

サンプリング場所と順序：この検討では 3 つのサンプリング高さを選択しました（図 2）。

- 上部 (T)
- 中央部 (M)
- 底部 (B)



図 2. サンプリングの場所

濃度が既知のビーズを室温で 1 時間または一晩（16 時間以上）分散させ、3 か所からサンプルを採取しました（図 2）。サンプルの分割順序も、この要因の影響を評価するために逆にしました。測定は 2 回行い、変動許容範囲は ± 3 % に設定しました。

図 3 は、サンプリング順序がサンプリング場所に比べて影響が少ないことを示しています。容器の底部からサンプルを採取すると不正確な結果が得られたため、残りの実験は上部と中央の位置からのみ分割採取しました。

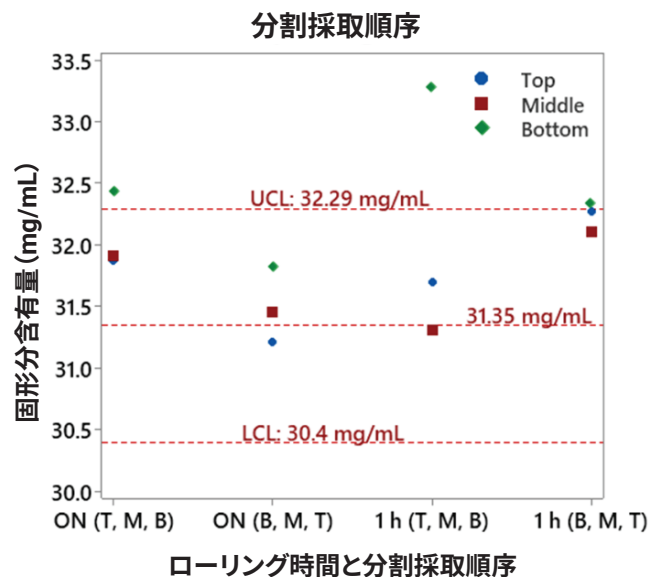


図 3. サンプリング場所と分割採取順序が固形分含有量に与える影響 (ON = 一晩、UCL = 上限管理限界、LCL = 下限管理限界)

再分散時間：濃度が既知の LodeStars 2.7 ストレプトアビジンビーズを室温でさまざまな分散時間と手法で処理し、これらの変数が固形分含有量に与える影響を評価しました（図 4）。ビーズを一晩ローリング攪拌すると、ばらつきの小さい結果が得られました。ビーズを 1 時間ローリングしたときにわずかな違いが観測されましたが、結果は目標の 3 % の変動範囲内でした。しかしビーズを手で攪拌した場合、不正確な濃度が記録されました。この結果は、固形分含有量の正確な値を得るためにはビーズを少なくとも 1 時間ローリングする必要があることを示しています。

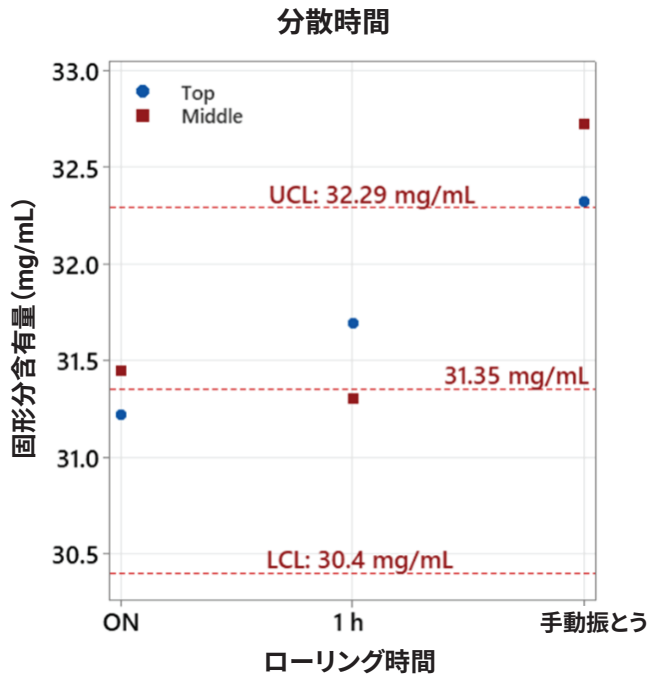


図 4. 分散時間がビーズの再分散に与える影響

懸濁時間：LodeStars 2.7 ストレプトアビジンビーズのボトル 2 本を室温で 1 時間ローリングしたもの、および一晩ローリングしたものを評価しました。ビーズをボトルローラーから取り出し、一定の時間間隔でサンプリングし、濃度を変えずにビーズの懸濁時間を推定しました。

図 5A は、一晩再分散するとビーズは長く懸濁状態に保たれ、濃度の変化が最小限に抑えられることを示しています。一晩ローリングするとビーズのコロイド安定性が向上し沈降速度が遅くなるため、ボトルを立てた状態にして 10 分後でも正確な固形分値が得られます。

時間が制約要因である場合、ビーズを 1 時間ローリングした後、すぐにサンプリングすれば正確な固形分濃度が測定できました (図 5B)。

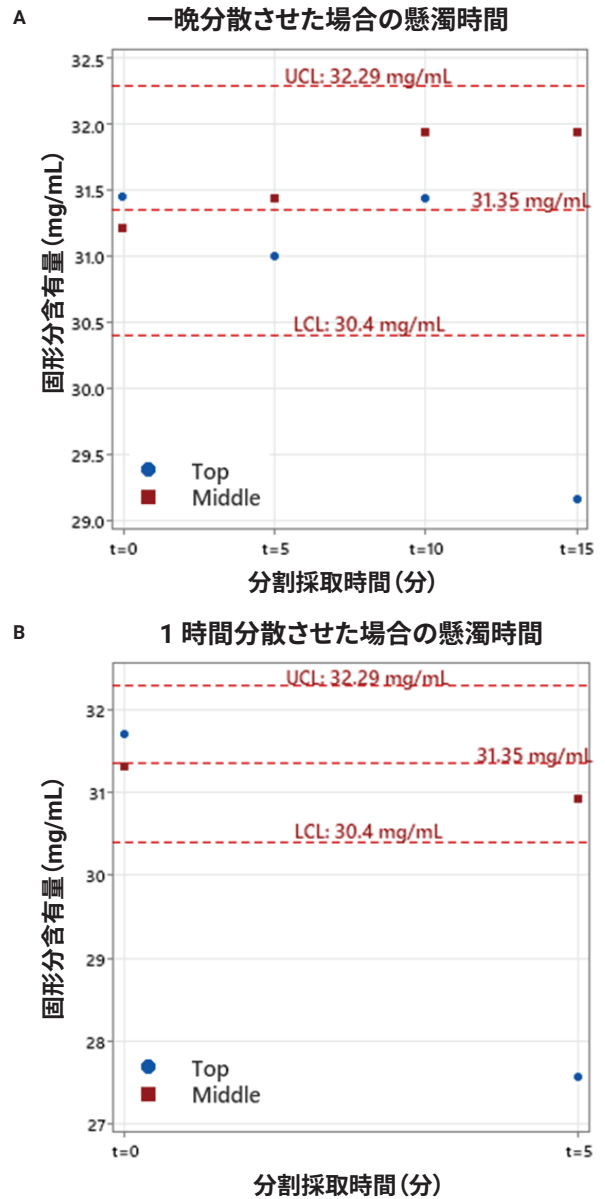


図 5. ビーズを (A) 一晩または (B) 1 時間再分散した後の懸濁時間が固形分含有量に与える影響

攪拌速度：ビーズの再分散を成功させるために、ボトルローラーの速度について調べました。濃度がわかっているさまざまなボトルを、3種類の速度と室温で1時間および一晩ローリングしました。

得られた結果は、ビーズを一晩ローリングした場合、ローラー速度はビーズの再分散にほとんど影響を与えないことを示しています (図 6A)。ただし、ビーズを1時間ローリングする場合、完全な再分散を行うには時間が足りないため、ローラー速度は30 rpmを超えないようにすることが推奨されます (図 6B)。

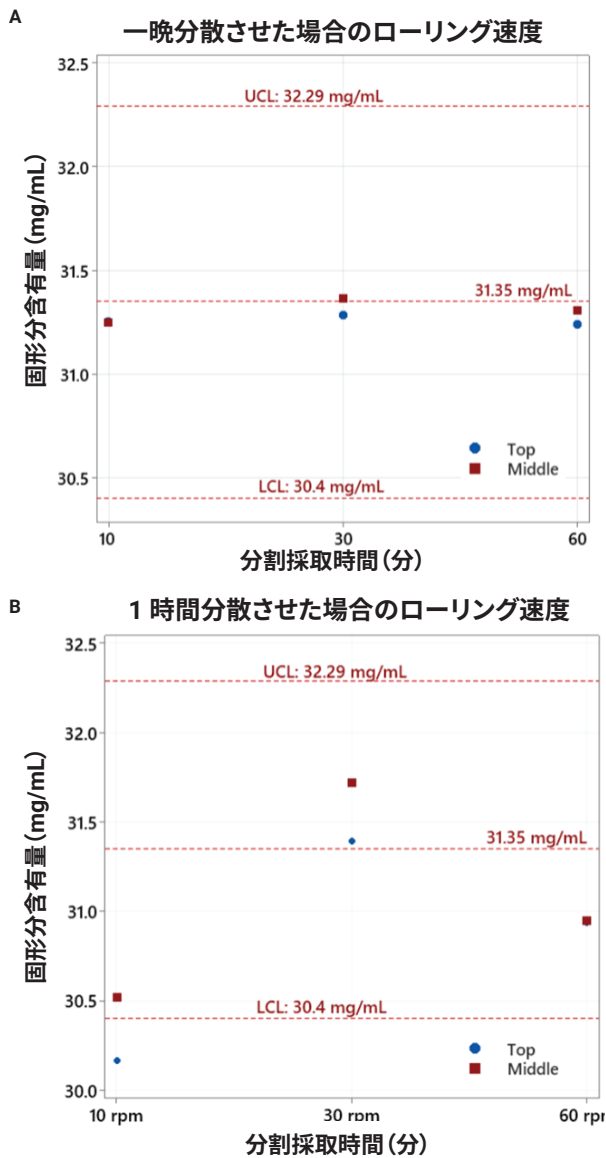


図 6. ビーズを (A) 一晩または (B) 1時間再分散した後のボトルローラー速度が固形分含有量に与える影響

容器の充填レベル：LodeStars 2.7 ストレプトアビジンビーズは、内容物が十分に移動できて最適な分散を実現できるように、スラリーとボトルの蓋の間に約 20 % の隙間を設けて供給されます。この隙間はヘッドスペースとも呼ばれます。

充填レベルの違いがビーズの再分散に及ぼす影響を評価するために、3つのヘッドスペースを2つの期間にわたり調査しました。

選んだヘッドスペースは次のとおりです。

- < 5 % : 過剰充填ボトル
- > 20 % : 市販製品の条件
- > 90 % : 最後の 1 ミリリットルのビーズ

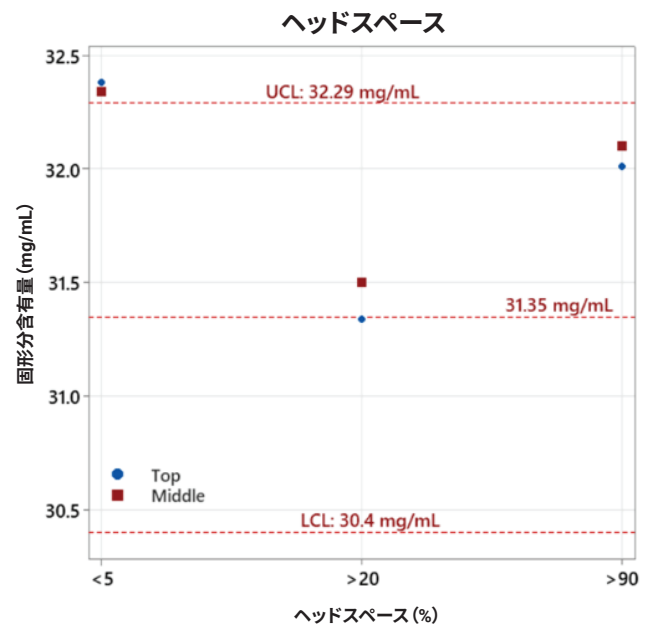


図 7. ヘッドスペースが固形分含有量に与える影響

図 7 は、1時間ローリングと一晩ローリングの両方で、高充填レベルで不正確な結果が得られたことを示しており、均一な分散を実現するにはヘッドスペースが重要であることがわかります。一方、少量であれば、両方のローリング時間で、大きな容器で十分に再分散させることができます。

ボトルの体積：ヘッドスペースが 20 % を超えるさまざまなサイズのボトルを、室温で一晩および 1 時間以上ローリングしました。図 8 は、すべてのケースで CV < 3 % の固形分含有量測定値が得られており、ボトルの体積がビーズ再分散に影響を与えないことを示しています。

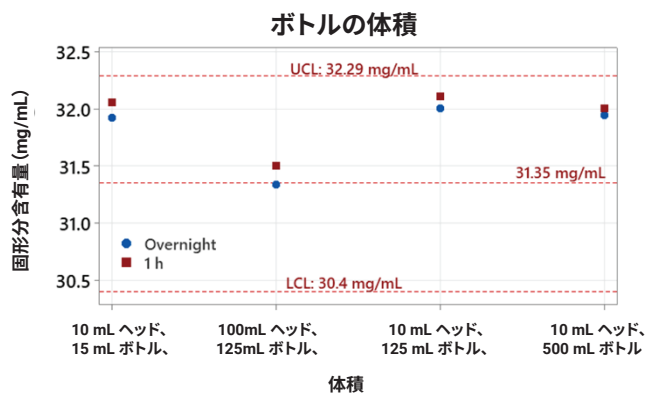


図 8. ボトルの体積が固形分含有量に与える影響

CLIA アッセイ

不正確なビーズ固形物添加の影響を実証するために、インタクト副甲状腺ホルモン (i-PTH) アッセイ (IDS Systems) を実行する自動 CLIA プラットフォームを使用しました。

室温で一晩 60 rpm でローリングしたビーズを基準値として選びました。さまざまな条件と再分散メソッドに対する結果を図 9 に示します。この検討で実証されたように、完全な再分散が達成されない場合、固形分含有量は元の濃度の ± 3.5 % まで変化することがあります。この固形分含有量ばらつきは大きくはありませんが、CLIA アプリケーションで存在する場合、アッセイ結果は実際の値から 10 % 以上異なる可能性があります。この差により、アッセイ結果が不正確になり、個々の結果に影響を及ぼす可能性があります。

再分散時間を 1 時間未満にしたり、ボトルローラー以外の再分散方法 (ボルテックスミキサー、手動による振とうなど) を使用すると、変動係数を 10 % 未満に抑えることができます。ただし、これらの変更により、偽陽性または偽陰性の結果が発生するリスクがあります。

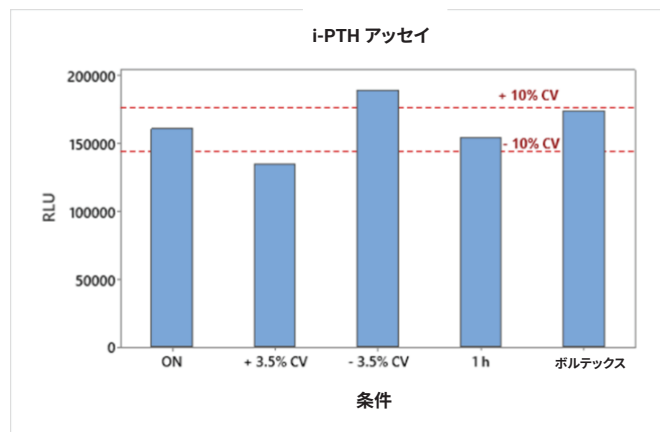


図 9. 不均一に再分散したビーズを使用した i-PTH アッセイの性能

結論

このアプリケーションノートでは、磁気ビーズ再分散技術と関連するビーズ固形分計算を最適化して、化学発光免疫測定（CLIA）アプリケーションでより高い再現性と信頼性を実現することの重要性について説明しました。

Agilent LodeStars ビーズを最適に使用するために、ビーズ濃度を下げ、最終的に CLIA アッセイの性能に影響を与える可能性のある分割採取時間やローリング速度などの要因を排除するために、一晚（> 16 時間）再分散することを推奨します。

このアプリケーションノートでは LodeStars 2.7 ストレプトアビジンビーズを選択しましたが、最適なアッセイ性能を得るには、これらのガイドラインを他のアジレントの磁気製品（LodeStars Original および LodeStars High Bind カルボキシルビーズ、ストレプトアビジンビーズ）に適用する必要があります。

製品情報

表 1. 製品情報

説明	LodeStars Original ビーズ (10 mg/mL)		LodeStars High Bind ビーズ (50 mg/mL)	
	ストレプト アビジンビーズ	2 mL	PL6727-1001	2 mL
10 mL		PL6727-1003	10 mL	PL6827-1003
100 mL		PL6727-1005	100 mL	PL6827-1005
-		-	400 mL	PL6827-1006
800 mL		PL6727-1007	-	-
説明	LodeStars ビーズ (30 mg/mL)		LodeStars High Bind ビーズ (50 mg/mL)	
	カルボキシル ビーズ	2 mL	PL6727-0001	2 mL
10 mL		PL6727-0003	10 mL	PL6827-0003
100 mL		PL6727-0005	100 mL	PL6827-0005
400 mL		PL6727-0006	400 mL	PL6827-0006
800 mL		PL6727-0007	-	-

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA45574.4408449074

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, October 21, 2024

5994-7888JAJP