

総合支援型研究検査ラボ『九州プロサーチLLP(KPSL)』  
高感度マルチ免疫アッセイ 技術のご紹介

高感度マルチ免疫アッセイ / ELISA

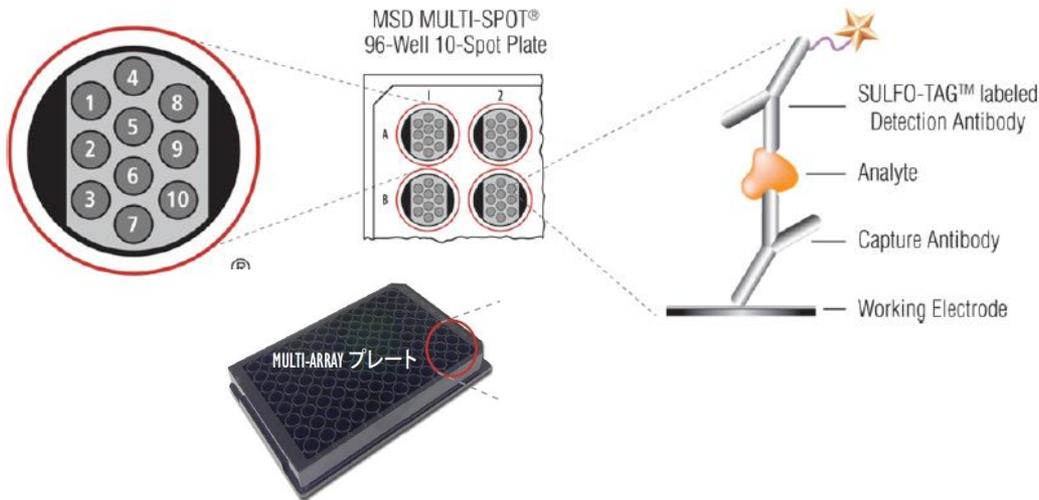
# 高感度マルチ免疫アッセイ

電気化学発光法（ECL）を利用した、多項目を同時に定量できる技術  
バイオマーカー測定や免疫原性アッセイなどに活用

- ① 最大10項目まで同時測定
- ② 必要な検体量がELISA法よりも少量
- ③ 夾雑物の影響が少なく非特異反応が低減
- ④ 広いダイナミックレンジで高感度に測定可能  
という特徴を持った測定法



1. IFN- $\gamma$
2. IL-1 $\beta$
3. IL-2
4. IL-4
5. IL-6
6. IL-8
7. IL-10
8. IL-12p70
9. IL-13
10. TNF- $\alpha$



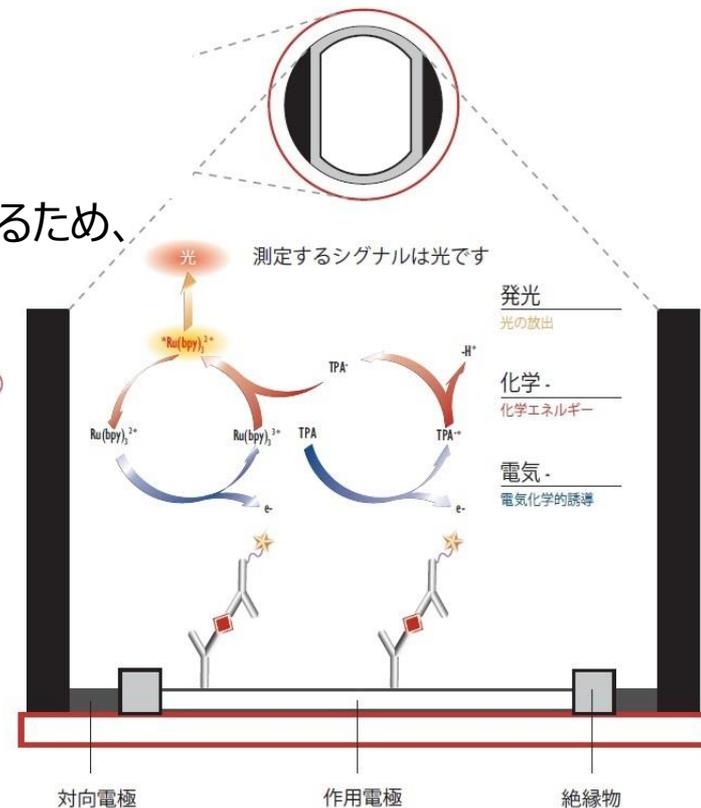
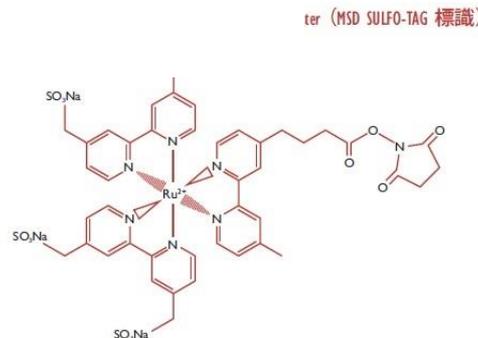
メソスケール社  
MESO QuickPlex SQ 120

1つのウェル内には最大10のスポットがあり、各スポットに異なる抗体が固相化  
→複数のバイオマーカーを同時に測定可能

# 高感度マルチタイムノアッセイ

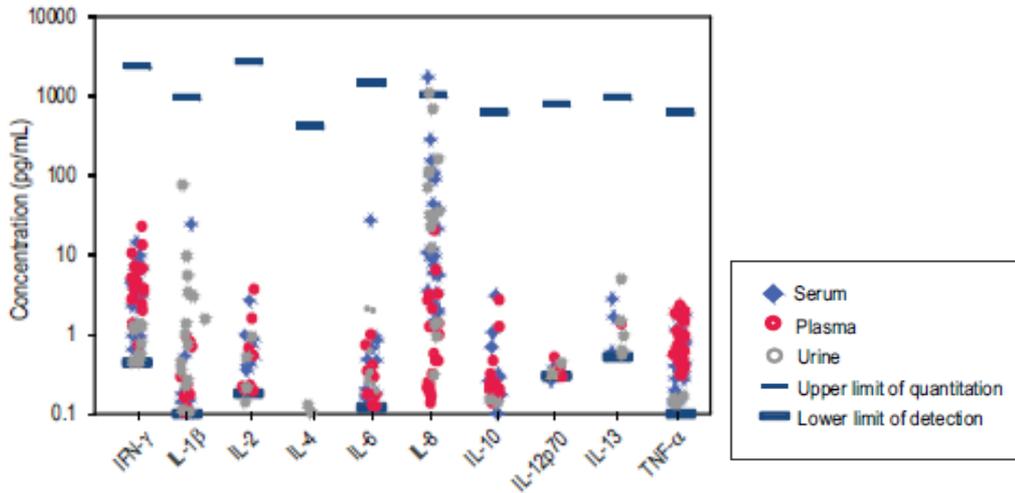
基本的な原理はELISA法と同様であり、検出にECLを使用

- ① プレートに固相化したCapture 抗体と分析試料を反応
- ② SULFO-TAG標識抗体（ルテニウム錯体）を添加し2次反応
- ③ プレート底面に電気を流すことで化学発光強度を測定
  - ルテニウム錯体が還元することにより、発光
  - 高感度 CCDカメラにて検出
  - 底面の反応する電極表面の検出抗体のみ発光するため、バックグラウンドノイズが少ない



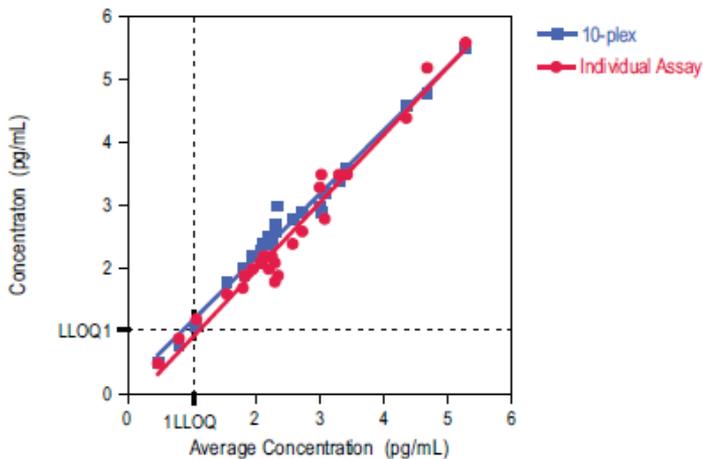
# 高感度マルチ免疫アッセイ

- ヒト血清、血漿、尿にてサイトカイン10項目を同時定量



ダイナミックレンジが広く、  
健常者レベルの低濃度領域  
まで定量

- マルチ測定とシングル測定と比較



両者の差ほとんどない  
→マルチで測定しても他項目と競合なく  
測定可能

# 高感度マルチ免疫アッセイ測定パネル

Panel	Analytes
Human Cytokines 30-plex	Eotaxin, Eotaxin-3, GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-8(HA*), IL-10, IL12p70, IL-12/IL-23p40, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A, IP-10, MCP-1, MCP-4, MDC, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TARC, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , VEGF-A *HA: high abundance
Human Proinflammatory Panel	INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70, IL-13, TNF- $\alpha$
Human Cytokine panel	GM-CSF, IL-5, IL-1 $\alpha$ , IL-7, IL-12/IL-23p40, IL-15, IL-16, IL-17A, TNF- $\beta$ , VEGF-A
Human Chemokine panel	Eotaxin, IP-10, MIP-1 $\beta$ , MDC, Eotaxin-3, TARC, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, MCP-4, IL-8(HA*)
Human TH17 Panel	IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, MIP-3 $\alpha$
Human Angiogenesis Panel	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, Flt-1/VEGFR-1, PlGF, FGF(basic), Tie-2
A $\beta$ Peptide Panel	A $\beta$ 38, A $\beta$ 40, A $\beta$ 42

上記以外にも様々なパネル、測定技術をご用意しております。お問い合わせください。

# アナリティカルデータの例-1

<u>感度</u>	LLOD Range (pg/mL)	LLOQ (pg/mL)	一般的なR&D社製 ELISA KitのLLOQ (pg/mL)
IFN- $\gamma$	0.05–0.62	7.47	15.6
IL-1 $\beta$	0.01–0.27	2.14	3.9
IL-2	0.01–0.29	0.89	31.2
IL-4	0.01–0.05	0.45	31.2
IL-6	0.01–0.11	1.58	3.1
IL-8	0.01–0.13	1.13	31.2
IL-10	0.01–0.15	0.68	7.8
IL-12p70	0.02–0.89	1.22	7.8
IL-13	0.03–0.73	4.21	125.0
TNF- $\alpha$	0.01–0.13	0.69	15.6

一般的なELISA法よりも、より高感度に測定が可能

# アナリティカルデータの例-2

## 正確性 (再現性)

	Control	Average Intra-run %CV	Inter-run %CV	Inter-lot %CV
IFN- $\gamma$	Control 1	3.6	9.2	7.2
	Control 2	3.8	8.2	6.5
	Control 3	5.0	7.3	5.0
IL-1 $\beta$	Control 1	3.3	5.5	1.7
	Control 2	4.0	6.1	3.2
	Control 3	4.1	7.7	5.8
IL-2	Control 1	4.4	6.2	4.9
	Control 2	5.8	8.2	4.8
	Control 3	5.0	10.5	4.5
IL-4	Control 1	5.6	9.6	9.8
	Control 2	5.4	9.6	9.4
	Control 3	6.4	9.9	9.2
IL-6	Control 1	3.6	5.2	4.2
	Control 2	3.9	6.8	5.1
	Control 3	4.5	7.3	5.5

日内再現性  
 日間再現性                      →                      ほぼCV=10%以内  
 ロット間正確性の評価

# アナリティカルデータの例-3

## Luminex法とECL法の比較

	IL-1B			IL-6		
	<i>Intra-assay</i>	<i>Inter Laboratory</i>	<i>Intermatrix</i>	<i>Intra-assay</i>	<i>Inter Laboratory</i>	<i>Intermatrix</i>
Luminex①	1.54	1.84	5.76	1.54	6.5	20.67
Luminex②	1.59	16.37	14.68	1.54	6.31	8.62
ECL	1.56	1.68	1.88	1.56	1.63	3.1

引用文献 Anal.Chem.2008,80,4741-4751

Luminex法での測定 ラボ内、ラボ間再現性及びサンプルマトリクスの影響あり

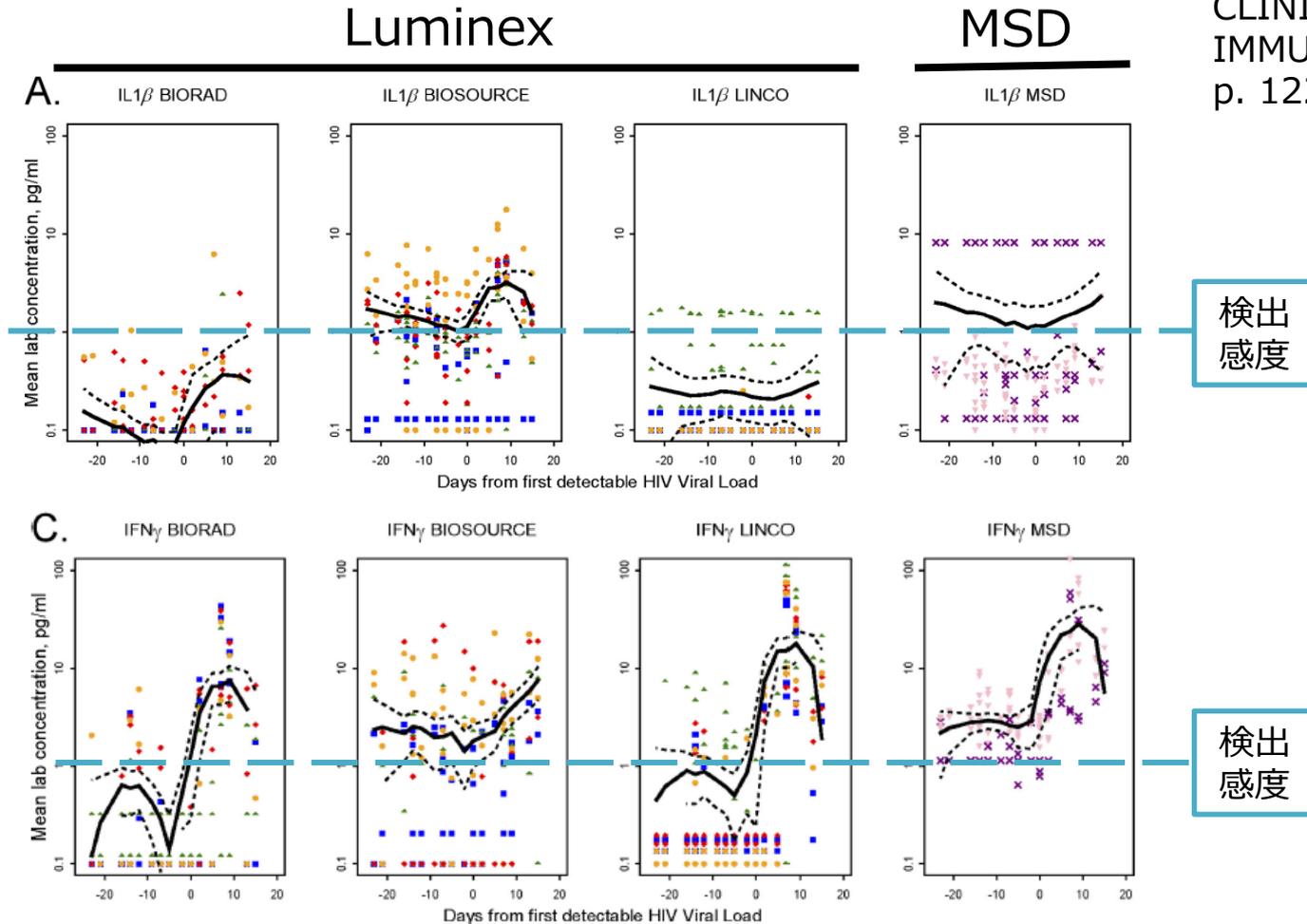


MSD社のECL法 優位性のある結果

# アナリティカルデータの例-4

## 実検体での低濃度域サイトカイン検出感度比較

引用文献  
CLINICAL AND VACCINE  
IMMUNOLOGY, Aug. 2011,  
p. 1229-1242



各種Luminexベースの測定法に比べ、  
MSD社システムで低濃度域の各種サイトカインを検出できている

# その他の多項目同時測定、高感度測定機器

## ・ サスペンションアレイシステム

Bio-Plex (BIO-RAD製)

Luminex® (ThermoFisher Scientific製)

Merck Millipore製、Affymetrix製など

- 最大100種類の生体分子を定量・検出可能



## ・ デジタルELSIA

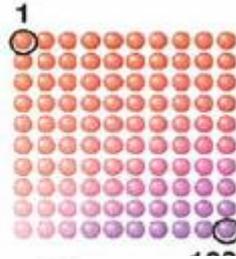
Simoa (Quanterix社)

- fMレベルの超高感度
- 最大4種類マルチプレックス測定



# Bio-Plexの測定原理

**1** 2種類の蛍光色素の量比を変えてビーズを100種類に色分け



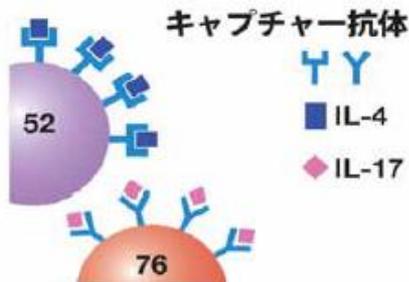
**2** 1種類のビーズに1つのキャプチャー抗体を結合



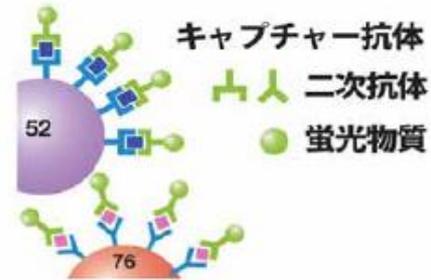
**3** ビーズを混合



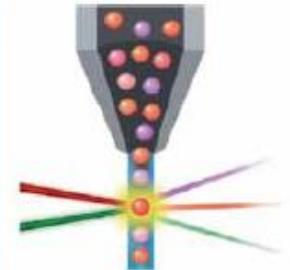
**4** 測定対象をビーズ上のキャプチャー抗体に結合させる



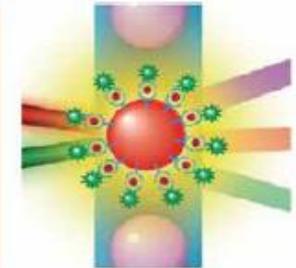
**5** 二次抗体と反応後蛍光物質でラベルする



**6** フローサイトメトリーの技術を利用してビーズを1つずつ検出部に送る



**7** グリーンレーザーで蛍光強度測定、レッドレーザーでビーズの種類を識別



バイオラッド社資料より

RESEARCH ARTICLE

## Increased fecal calprotectin levels in Crohn's disease correlate with elevated serum Th1- and Th17-associated cytokines

Arno R. Bourgonje<sup>1\*</sup>, Julius Z. H. von Martels<sup>1</sup>, Paul de Vos<sup>2</sup>, Klaas Nico Faber<sup>1‡</sup>, Gerard Dijkstra<sup>1‡</sup>

**Published:** February 21, 2018

クローン病（CD）マーカーであるCalprotectinに代わるマーカーをECL法を用いて探索

CD患者39名、糞便中カルプロテクチン 200 mg/kg以上、未満でグループ分け  
血清中の37種のサイトカインについて、2群で比較した



## 測定結果 考察

カルプロテクチン 200 mg/kg以上において有意差のあったサイトカイン

IFN- $\gamma$ 、CRP ( $p < 0.05$ )

IL-6、TNF- $\beta$ 、SAA、IL-17A ( $p < 0.01$ )

クローン病では

- Th1, Th17 反応の亢進がみられる
  - ✓ Th1 細胞からの産生：IFN- $\gamma$
  - ✓ Th17 細胞からの産生：IL-6、IL17A
- CRPの上昇
  - ✓ SAAはCRPとオーバーラップし、感度もより高い
  - ✓ IL-6やTNFなどの作用により産生

カルプロテクチンレベルとECL測定結果 相関がある

カルプロテクチンに代わるマーカーとして活用できないか

# 高感度マルチ免疫アッセイを用いると...

- 全37サイトカイン  
→ 5回のAssayで測定終了できる
- 網羅的に調べること  
で、着目する分子の候補選  
びができる

Detected molecules	Calprotectin < 200 mg/kg	Calprotectin > 200 mg/kg	P-value
<b>Pro-inflammatory panel</b>			
IFN- $\gamma$	7.80 (4.09–19.72)	23.00 (10.13–38.72)	< 0.05*
IL-1 $\beta$	0.05 (0.04–0.08)	0.05 (0.03–0.13)	0.945
	0.18 (0.12–0.23)	0.17 (0.10–0.25)	0.932
	0.04 (0.02–0.07)	0.04 (0.03–0.06)	0.777
	0.78 (0.39–1.15)	1.29 (0.93–1.88)	< 0.01**
	11.91 (7.20–15.43)	12.63 (6.35–68.62)	0.955
	0.32 (0.19–0.44)	0.37 (0.24–0.74)	0.321
	0.09 (0.03–0.26)	0.07 (0.04–0.18)	0.624
IL-13	0.56 (0.42–0.91)	0.77 (0.55–1.79)	0.153
TNF- $\alpha$	3.13 (2.50–3.67)	3.49 (2.87–4.79)	0.005
<b>Cytokine panel</b>			
GM-CSF	0.16 (0.07–0.29)	0.15 (0.07–0.24)	0.784
IL-5	0.26 (0.16–0.57)	0.26 (0.19–0.54)	0.883
IL-7	19.95 (13.57–28.08)	18.93 (10.18–27.09)	0.552
IL-12/23p40	118.18 (74.94–204.08)	158.38 (125.23–222.36)	0.157
IL-15	3.04 (2.31–5.66)	2.87 (2.44–5.74)	0.777
IL-16	284.06 (203.49–316.63)	285.97 (195.06–327.77)	0.755
IL-17A	5.25 (3.04–9.27)	8.22 (5.11–11.85)	0.058
TNF- $\beta$	0.49 (0.34–0.55)	0.55 (0.42–0.66)	0.051
<b>Chemokine panel</b>			
Eotaxin	266.32 (179.61–351.18)	240.14 (190.62–356.28)	0.955
MIP-1 $\beta$	90.12 (73.41–172.00)	80.40 (47.64–129.26)	0.322
Eotaxin-3	20.29 (15.72–30.32)	15.57 (11.79–22.39)	0.101
TARC	242.32 (138.99–512.79)	267.11 (156.86–359.57)	0.799
IP-10	2.99x10 <sup>3</sup> (2.40x10 <sup>3</sup> –4.62x10 <sup>3</sup> )	3.60x10 <sup>3</sup> (2.25x10 <sup>3</sup> –4.66x10 <sup>3</sup> )	0.590
MIP-1 $\alpha$	16.27 (13.31–20.75)	16.75 (12.69–24.30)	0.966
MCP-1	217.13 (166.20–357.20)	261.95 (188.06–357.75)	0.610
MDC	1.33x10 <sup>3</sup> (1.02x10 <sup>3</sup> –1.69x10 <sup>3</sup> )	1.28x10 <sup>3</sup> (1.07x10 <sup>3</sup> –1.66x10 <sup>3</sup> )	0.977
<b>Angiogenesis panel</b>			
VEGF	469.52 (236.89–726.63)	382.16 (223.83–896.71)	0.755
VEGF-C	569.55 (442.96–737.47)	462.11 (375.45–628.34)	0.141
VEGF-D	1.07x10 <sup>3</sup> (770.27–1.47x10 <sup>3</sup> )	901.29 (799.81–1.41x10 <sup>3</sup> )	0.777
Tie-2	804.11 (652.49–969.74)	708.28 (626.90–845.61)	0.213
Flt-1	147.69 (126.14–167.65)	144.15 (129.16–171.30)	0.932
PlGF	6.28 (5.45–7.40)	5.80 (5.10–7.85)	0.876
bFGF	5.08 (2.05–21.97)	9.12 (2.29–27.11)	0.745
<b>Vascular injury panel</b>			
SAA	4.78x10 <sup>6</sup> (2.84x10 <sup>6</sup> –8.87x10 <sup>6</sup> )	9.02x10 <sup>6</sup> (4.64x10 <sup>6</sup> –2.87x10 <sup>7</sup> )	< 0.05*
CRP	1.25x10 <sup>6</sup> (6.03x10 <sup>5</sup> –4.67x10 <sup>6</sup> )	6.79x10 <sup>6</sup> (3.61x10 <sup>6</sup> –2.64x10 <sup>7</sup> )	< 0.01**
VCAM-1	8.28x10 <sup>5</sup> (7.83x10 <sup>5</sup> –9.64x10 <sup>5</sup> )	8.91x10 <sup>5</sup> (7.67x10 <sup>5</sup> –1.02x10 <sup>6</sup> )	0.671
ICAM-1	4.97x10 <sup>5</sup> (4.27x10 <sup>5</sup> –6.00x10 <sup>5</sup> )	5.63x10 <sup>5</sup> (4.99x10 <sup>5</sup> –7.06x10 <sup>5</sup> )	0.062

# ELISA測定

## ELISA(単項目)

比色、蛍光、発光など多様な検出器に対応  
ラボ開設(2014年7月)から200項目以上の測定実績

### 【糖尿病】

GLP-1(Active,Total)  
GIP(Active,Total)  
DPP-IV activity, sCD26,  
膵glucagon

### 【酸化ストレス】

8-OHdG, AGE, CML,  
 $\alpha$ -Klotho, HO-1, HTLA4,  
methyglyoxal,  
MDA(TBARS), sRAGE

### 【唾液測定マーカー】

$\alpha$ -amylase, chromogranin  
A, cortisol, melatonin,  
sIgA, oxytocin,

### 【代謝】

adiponectin(HMW,Total),  
ghrelin, L-carnitine,  
leptin, NPY, PCSK9, PYY,  
RBP4, resistin

### 【増殖因子・サイトカイン】

chemerin, FABP4, FGF-21,23, G-CSF, GM-CSF, INF- $\gamma$ ,  
IL-1 $\alpha$ ,1 $\beta$ ,1ra,2,4,5,6,7,8,10,12,13,15,16,17A  
IP-10, L-FABP, MCP-1,4, MDC, MIP-1 $\alpha$ , TFPI, TGF- $\beta$ 1,  
TNF- $\alpha$ , vaspin, VEGF

### 【血管新生・接着因子】

ACE II, angiopoietin-1,2,  
angiotensin(1-7), angiotensin II,  
ICAM-1, VCAM-1

