KPSLセミナー

総合支援型研究検査ラボ
『九州プロサーチLLP(KPSL) 』

高感度マルチイムノアッセイ　技術のご紹介

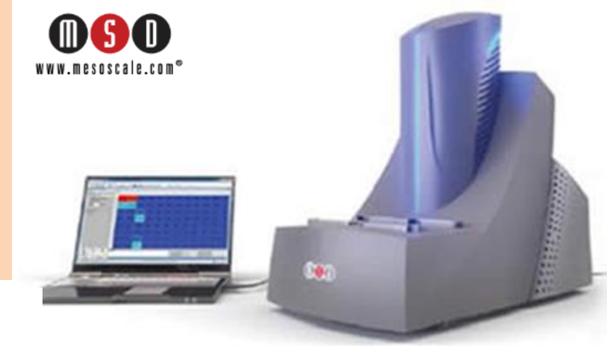
高感度マルチイムノアッセイ / ELISA

KPSL
九州プロサーチLLP

高感度マルチイムノアッセイ

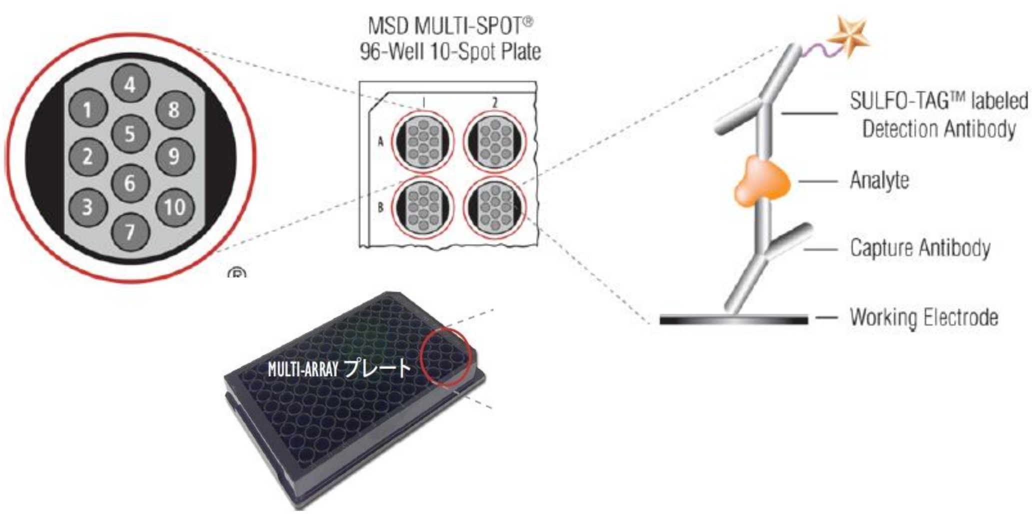
電気化学発光法（ECL）を利用した、多項目を同時に定量できる技術
バイオマーカー測定や免疫原性アッセイなどに活用

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



メソスケール社
MESO QuickPlex SQ 120

1. IFN-γ
2. IL-1β
3. IL-2
4. IL-4
5. IL-6
6. IL-8
7. IL-10
8. IL-12p70
9. IL-13
10. TNF-α



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

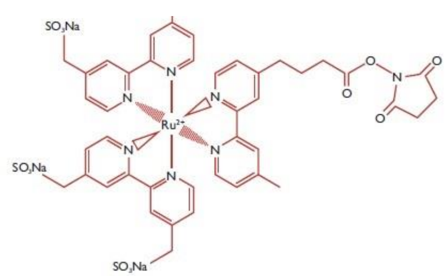
①プレートに固相化したCapture 抗体と分析試料を反応

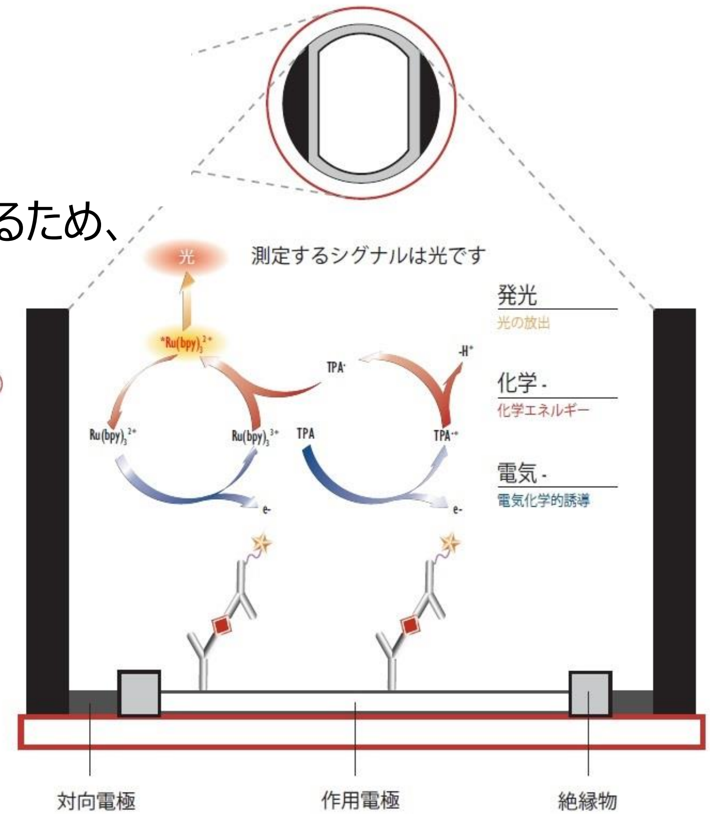
②SULFO-TAG標識抗体（ルテニウム錯体）を添加し2次反応

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

ter（MSD SULFO-TAG 標識）

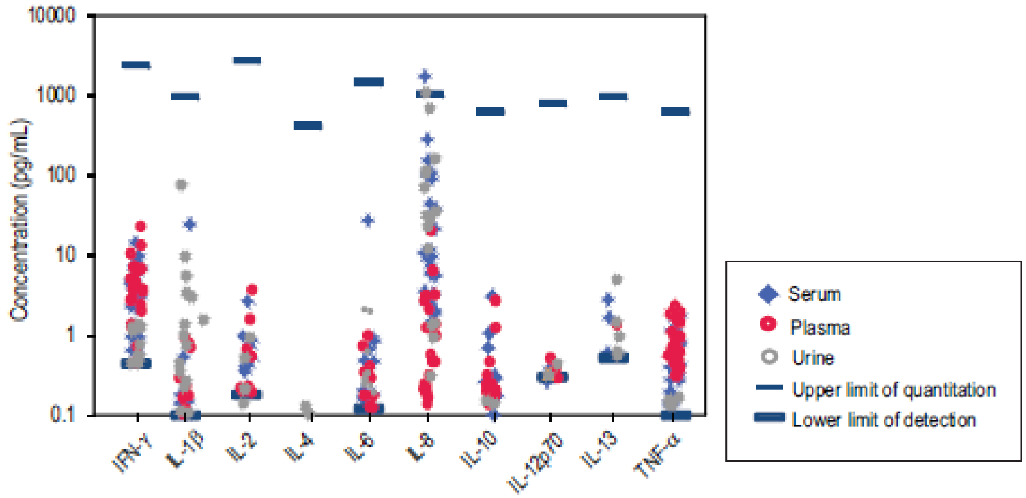




KPSL
九州プロサーチLLP

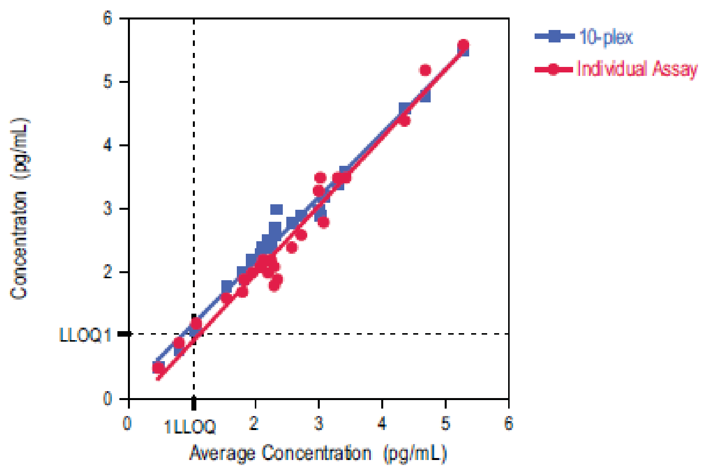
高感度マルチイムノアッセイ

- 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の比較



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

KPSL
九州プロサーチLLP

高感度マルチイムノアッセイ測定パネル

Panel	Analytes
Human Cytokines 30-plex	Eotaxin, Eotaxin-3, GM-CSF, INF-γ, IL-1α, IL-1β, 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-1α, MIP-1β, TARC, TNF-α, TNF-β, VEGF-A *HA : high abundance
Human Proinflammatory Panel	INF-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70, IL-13, TNF-α
Human Cytokine panel	GM-CSF, IL-5, IL-1α, IL-7, IL-12/IL-23p40, IL-15, IL-16, IL-17A, TNF-β, VEGF-A
Human Chemokine panel	Eotaxin, IP-10, MIP-1β, MDC, Eotaxin-3, TARC, MIP-1α, MCP-1, MCP-4, IL-8(HA*)
Human TH17 Panel	IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, MIP-3α
Human Angiogenesis Panel	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, Flt-1/VEGFR-1, PlGF, FGF(basic), Tie-2
Aβ Peptide Panel	Aβ38, Aβ40, Aβ42

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

感度

	LLOD Range (pg/mL)	LLOQ (pg/mL)	一般的なR&D社製ELISA KitのLLOQ（pg/mL）
IFN-γ	0.05–0.62	7.47	15.6
IL-1β	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-α	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

KPSL
九州プロサーチLLP

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-γ	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-1β	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		
	Intra-assay	Inter Laboratory	Intermatrix	Intra-assay	Inter Laboratory	Intermatrix
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

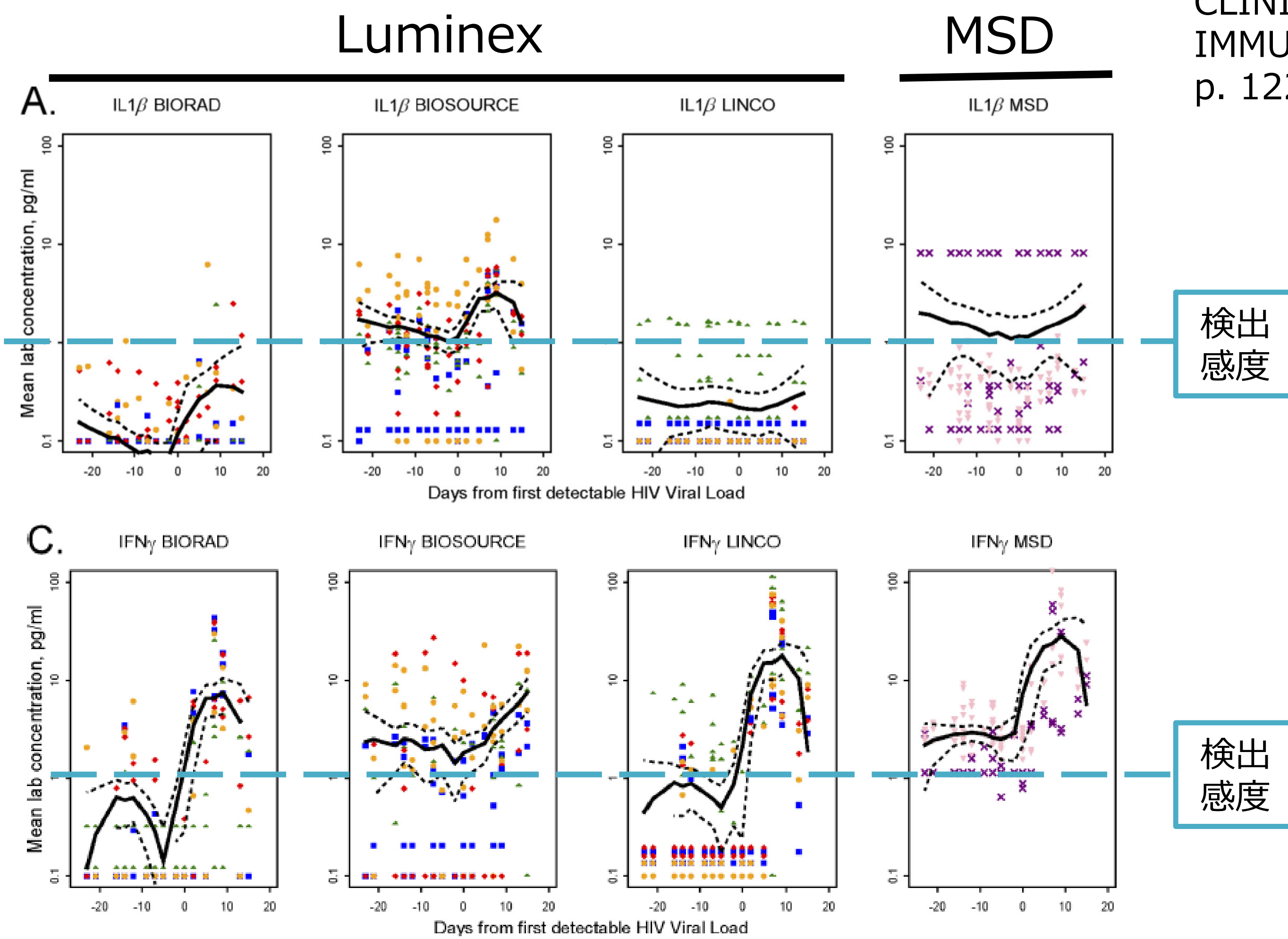
引用文献　Anal.Chem.2008,80,4741-4751

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

KPSL
九州プロサーチLLP

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

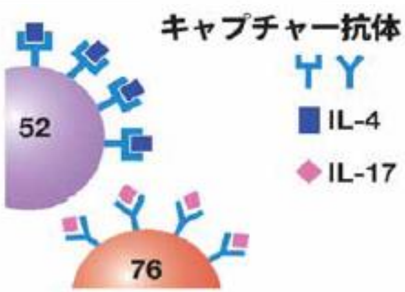
バイオラッド社資料より

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

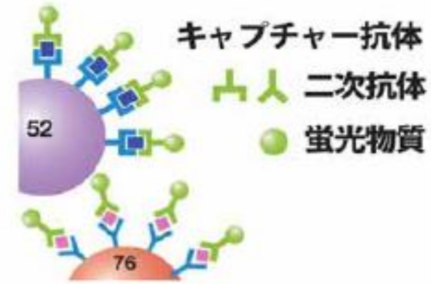
2 1種類のビーズに1つのキャプチャー 抗体を結合

3 ビーズを混合

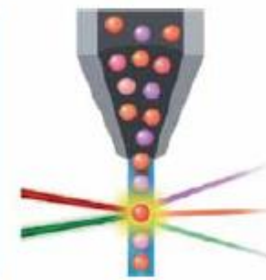
4 測定対象をビーズ上のキャプチャー抗体に結合させる



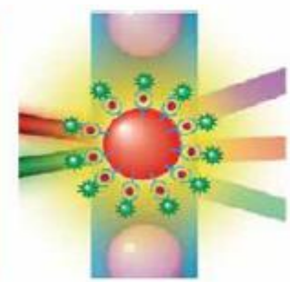
5 二次抗体と反応後蛍光物質でラベルする



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



KPSL
九州プロサーチLLP

高感度マルチイムノアッセイを用いた網羅的探索

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

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

Arno R. Bourgonje[1]*, Julius Z. H. von Martels[1], Paul de Vos[2], Klaas Nico Faber[1‡], Gerard Dijkstra[1‡]

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種のサイトカインついて、2群で比較した

KPSL
九州プロサーチLLP

測定結果一覧

Detected molecules	Calprotectin < 200 mg/kg	Calprotectin > 200 mg/kg	P-value
Pro-inflammatory panel			
IFN-γ	7.80 (4.09–19.72)	23.00 (10.13–38.72)	< 0.05*
IL-1β	0.05 (0.04–0.08)	0.05 (0.03–0.13)	0.945
IL-2	0.18 (0.12–0.23)	0.17 (0.10–0.25)	0.932
IL-4	0.04 (0.02–0.07)	0.04 (0.03–0.06)	0.777
IL-6	0.78 (0.39–1.15)	1.29 (0.93–1.88)	< 0.01**
IL-8	11.91 (7.20–15.43)	12.63 (6.35–68.62)	0.955
IL-10	0.32 (0.19–0.44)	0.37 (0.24–0.74)	0.321
IL-12p70	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-α	3.13 (2.50–3.67)	3.49 (2.82–4.79)	0.095
Cytokine panel			
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-β	0.49 (0.34–0.55)	0.55 (0.42–0.66)	0.051
Chemokine panel			
Eotaxin	266.32 (179.61–351.18)	240.14 (190.62–356.28)	0.955
MIP-1β	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	$2.99x10^3$ ($2.40x10^3$-$4.62x10^3$)	$3.60x10^3$ ($2.25x10^3$-$4.66x10^3$)	0.590
MIP-1α	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)	0.630
			0.977
			0.755
			0.141
			0.777
			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
Vascular injury panel			
SAA	$4.78x10^6$ ($2.84x10^6$- $8.87x10^6$)	$9.02x10^6$ ($4.64x10^6$- $2.87x10^7$)	< 0.05*
CRP	$1.25x10^6$ ($6.03x10^5$- $4.67x10^6$)	$6.79x10^6$ ($3.61x10^6$- $2.64x10^7$)	< 0.01**
VCAM-1	$8.28x10^5$ ($7.83x10^5$-$9.64x10^5$)	$8.91x10^5$ ($7.67x10^5$-$1.02x10^6$)	0.671
ICAM-1	$4.97x10^5$ ($4.27x10^5$-$6.00x10^5$)	$5.63x10^5$ ($4.99x10^5$-$7.06x10^5$)	0.062

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−γ、CRP（p<0.05）
IL-6、TNF−β、SAA、IL-17A（p<0.01）

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−γ、CRP（$p<0.05$）

IL-6、TNF−β、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−γ
  - ✓ 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

KPSL
九州プロサーチLLP

高感度マルチイムノ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
Pro-inflammatory panel			
IFN-γ	7.80 (4.09–19.72)	23.00 (10.13–38.72)	< 0.05*
IL-1β	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-α	3.13 (2.50–3.67)	3.49 (2.82–4.79)	0.095
Cytokine panel			
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-β	0.49 (0.34–0.55)	0.55 (0.42–0.66)	0.051
Chemokine panel			
Eotaxin	266.32 (179.61–351.18)	240.14 (190.62–356.28)	0.955
MIP-1β	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	$2.99x10^3$ ($2.40x10^3$-$4.62x10^3$)	$3.60x10^3$ ($2.25x10^3$-$4.66x10^3$)	0.590
MIP-1α	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)	0.630
MDC	$1.33x10^3$ ($1.02x10^3$-$1.69x10^3$)	$1.28x10^3$ ($1.07x10^3$-$1.66x10^3$)	0.977
Angiogenesis panel			
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	$1.07x10^3$ (770.27–$1.47x10^3$)	901.29 (799.81–$1.41x10^3$)	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
Vascular injury panel			
SAA	$4.78x10^6$ ($2.84x10^6$- $8.87x10^6$)	$9.02x10^6$ ($4.64x10^6$- $2.87x10^7$)	< 0.05*
CRP	$1.25x10^6$ ($6.03x10^5$- $4.67x10^6$)	$6.79x10^6$ ($3.61x10^6$- $2.64x10^7$)	< 0.01**
VCAM-1	$8.28x10^5$ ($7.83x10^5$-$9.64x10^5$)	$8.91x10^5$ ($7.67x10^5$-$1.02x10^6$)	0.671
ICAM-1	$4.97x10^5$ ($4.27x10^5$-$6.00x10^5$)	$5.63x10^5$ ($4.99x10^5$-$7.06x10^5$)	0.062

KPSL 九州プロサーチLLP

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,
α-Klotho, HO-1, HTLA4,
methylglyoxal,
MDA(TBARS), sRAGE

【唾液測定マーカー】
α-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-γ, IL-1α,1β,1ra,2,4,5,6,7,8,10,12,13,15,16,17A
IP-10, L-FABP, MCP-1,4, MDC, MIP-1α, TFPI, TGF-β1,
TNF-α, vaspin, VEGF

【血管新生・接着因子】
ACEⅡ, angiopoietin-1,2,
angiotensin(1-7), angiotensinⅡ,
ICAM-1, VCAM-1