

*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。
*下記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認の上、操作して下さい。
<http://metallogenics.co.jp/>

測定の意義

ニボルマブは、ヒト PD-1 (Programmed cell death-1) に対するヒト型 IgG4 モノクローナル抗体である。PD-1 は、活性化したリンパ球 (T 細胞、B 細胞及びナチュラルキラーT 細胞) 及び骨髄系細胞に発現する CD28 ファミリー (T 細胞の活性化を補助的に正と負に制御する分子群) に属する受容体である。ニボルマブは PD-1 の細胞外領域 (PD-1 リガンド結合領域) に結合し、PD-1 と PD-1 リガンドとの結合を阻害することにより、がん抗原特異的な T 細胞の活性化及びがん細胞に対する細胞傷害活性を増強することで持続的な抗腫瘍効果を示すことが確認されている。

また、薬物の薬理効果はその投与量よりも標的部位の濃度と深く関係していることが知られている。そのため血中薬物濃度は治療効果や副作用発現の重要な指標となる。臨床において、抗体医薬品の生体内挙動に個人差が示唆される場合がある。一般に薬物は生体に投与された後、生体の分解・排泄システムを経て消失し、その血中濃度は指数関数的に減少する。薬物の血中濃度が効果を発揮する濃度を下回ることにより、有効性が得られなくなる可能性があるため、血中の抗体医薬品濃度を測定・解析することが治療効果の評価・考察に重要な役割をもつと考えられる。本キットはニボルマブを短時間に多検体測定する方法を提供することにより薬理学研究に資するものである。

測定原理

本キットは PD-1 タンパクと抗ニボルマブモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法キットです。

- ① 固相化プレート上の PD-1 タンパクと試料中のニボルマブを反応させる。
- ② 反応後、試料を洗浄操作により除去する。
- ③ 固相化 PD-1 タンパクと結合したニボルマブとビオチン標識抗ニボルマブ抗体を反応させる。
- ④ 反応後余剰のビオチン標識抗ニボルマブ抗体を洗浄操作により除去する。
- ⑤ 固相化、PD-1 タンパク-ニボルマブ-ビオチン標識抗ニボルマブ抗体複合体と HRP(Horseradish peroxidase)標識ストレプトアビジンを反応させる。
- ⑥ 余剰の HRP 標識ストレプトアビジンを洗浄操作により除去する。発色基質を加え、吸光度を測定し、検量線より濃度を求める。

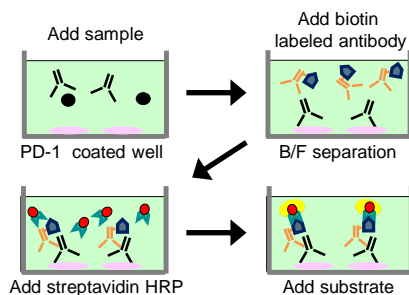


図 1 : 測定概略

キット内容

合計 96 測定分 (商品コード: C-FP01Q)		
1.	PD-1 タンパク固相化プレート	×1
2.	ビオチン標識抗ニボルマブ抗体 (100×)	0.12 mL×1
3.	R-1: 抗体希釈液	12 mL×1 ●
4.	HRP 標識ストレプトアビジン (100×)	0.12 mL×1
5.	R-2: ストレプトアビジン希釈液	12 mL×1 ●
6.	洗浄液 (10×)	20 mL×1 ●
7.	Diluent: 試料希釈液	60 mL×1 ●
8.	標準試料: ニボルマブ (0, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200µg/mL)	0.5mL×8 チューブ
9.	R-3: 発色基質 (TMB)	12 mL×1 遮光ボトル
10.	R-4: 反応停止液 (1 mol/L 硫酸)	12 mL×1 ●
11.	マイクロプレートシール	×3

キット以外に必要な器具・試薬

- マイクロプレートリーダー
- マイクロピペットおよびチップ
- マルチチャンネルピペット
- メスシリンダー
- サンプルチューブ
- マイクロプレートシェーカー
- ペーパータオル
- マルチチャンネルピペット用 リザーバー
- 精製水

測定試料の注意点

- 試料は新鮮なもの又は-20°C 以下で保存したものを使用して下さい。保存料は使用しないでください。
- 400 倍に Diluent にて希釈し、測定試料としてください。
- ペムプロリズマブを含む試料は測定値に影響を与えますので使用しないでください。

操作方法

1. 試薬の調製
 - (1) **WR1** (Working Reagent 1: ビオチン標識抗ニボルマブ抗体試薬) の調製
 - ① ビオチン標識抗ニボルマブ抗体 (100×) 全量を **R-1** のボトルへ添加する。
 - ② **R-1** のボトルラベルのチェックボックスへ印 (**R-1**) を付け、これを **WR1**: Working Reagent 1 とする。
 - (2) **WR2** (Working Reagent 2: HRP 標識ストレプトアビジン試薬) の調製
 - ① HRP 標識ストレプトアビジン (100×) 試薬全量を **R-2** のボトルへ添加する。
 - ② **R-2** のボトルラベルのチェックボックスへ印 (**R-2**) を付け、これを **WR2**: Working Reagent 2 とする。
 - (3) **WB** (Wash Buffer: 洗浄液) の調製
 洗浄液 (10×) 全量を精製水で 10 倍希釈し、**WB**: Wash Buffer とする。
 - (4) **標準試料**
使用直前によく攪拌しそのまま使用する。

2. 測定試料の調製

400 倍に **Diluent** にて希釈し、測定試料とする。

表 1. 試料希釈例

試験管 No.	希釈サンプル	試料量 (μL)	Diluent 量 (μL)	開始希釈倍率	希釈倍率
1	血清、血漿	10	190	血清、血漿	20
2	試験管 No.1	10	190	20	400

※高値検体についてはさらに希釈を行い再測定すること。

3. 測定

(1) 各標準試料、測定試料を PD-1 タンパク固相化プレートのウェルに 100 μL ずつ分注する。(各試料 2 ウェルずつ)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○

- : 標準試料 (ニボルマブ濃度)
- ① : 200 μg/mL
- ② : 100 μg/mL
- ③ : 50 μg/mL
- ④ : 25 μg/mL
- ⑤ : 12.5 μg/mL
- ⑥ : 6.25 μg/mL
- ⑦ : 3.13 μg/mL
- ⑧ : 0 μg/mL
- : 試料

図 2. プレート上の試料・標準試料配置例

(2) PD-1 タンパク固相化プレートにマイクロプレートシールを貼り付け、室温で 1 時間反応させる。

(3) (2)の反応時間終了後、反応液を廃棄し、**WB** にて洗浄する。

※ 洗浄操作

- A) **WB** 300 μL をウェルに添加する。
- B) ウェル中の **WB** を廃棄する。
- C) A)および B)を 2 回繰り返す (合計 3 回)。
- D) ペーパータオルに叩きつけるようにし、しっかりと液を切る。

(4) 各ウェルに、**WR1** を 100 μL 添加する。

(5) PD-1 タンパク固相化プレートにマイクロプレートシールを貼り付け、室温で 1 時間反応させる。

(6) (5)の反応時間終了後、反応液を廃棄し、(3)と同様に **WB** にて洗浄する。

(7) 各ウェルに、**WR2** を 100 μL 添加する。

(8) PD-1 タンパク固相化プレートにマイクロプレートシールを貼り付け、室温で 30 分間反応させる。

(9) (8)の反応時間終了後、反応液を廃棄し、(3)と同様に **WB** にて洗浄する。

(10) 各ウェルに、**R-3** を 100 μL 添加する。

(11) PD-1 タンパク固相化プレートを、マイクロプレートシェーカーなどで振とうし、遮光して室温で 30 分間反応させる。

(12) 各ウェルに、**R-4** を 100 μL 添加する。

(13) 450 nm の吸光度を測定する。

4. 測定値の算出

(1) 試料毎に吸光度の平均値を求める。

(2) 検量線試料のニボルマブ濃度に対する吸光度をプロットし、検量線を作成する。

(3) 検量線より試料中のニボルマブ濃度を読み取る。

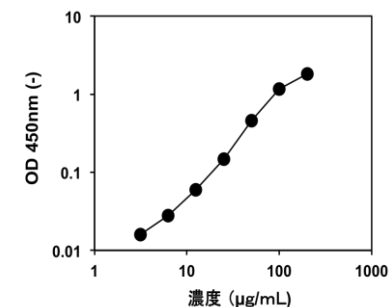


図 3. 検量線の例

注意点

1.測定

- ・別ロットの試薬は使用しないでください。
- ・検量線は測定毎に作成してください。
- ・発色基質はできるだけ光を当てないでください。
- ・洗浄後の PD-1 タンパク固相化プレートは、測定終了まで乾燥させないでください。
- ・PD-1 タンパク固相化プレートは、底面に PD-1 タンパクが固相化されていますので、ピペットとの接触によって抗体がはがれると、ばらつきの原因となります。ピペットがプレートの底面や壁面に触れないようにしてください。
- ・プレートの温度のムラは測定値のばらつきの原因となります。
 - A) 試薬及びプレートは、必ず室温(20~25℃)に戻してから使用して下さい。
 - B) 反応は必ず室温で行ってください。また、室内でも温度差や風当たりなどで、温度ムラの生じる箇所があります。エアコンの吹き出し口近辺などの温風や冷風の当たる場所、熱源近辺、窓際などの日光の当たる場所などでは使用しないでください。
 - C) 指などで長時間プレートに触れると、プレートが体温により加温されプレート内で温度差が生じます。プレートにはなるべく触れないようにしてください。
- ・試薬は順番通り、正確な時間で滴下してください。また、反応時間は正確にとってください。
- ・反応停止液は強酸です。取り扱いには十分注意してください。
- ・ベムプロリズマブを含むサンプルを測定すると、ニボルマブ検出のための反応が阻害され、ニボルマブ測定値が実際より低値になるため、ベムプロリズマブを含むサンプルは本キットで測定できません。

2.本キットを分割使用する際の注意

- ・標準試料は当日中に使用しない場合、キャップをしっかりと閉め、冷蔵保存してください。
- ・試薬は、しっかりとキャップを閉め、冷蔵保存して下さい。
- ・未使用の PD-1 タンパク固相化ウェルは、チャック袋に乾燥剤を同梱の上、保管してください。
- ・試薬・PD-1 タンパク固相化ウェルは開封後冷蔵で一週間保管が可能です。

製品仕様

測定範囲： 3.13 - 200 µg/mL

測定数：96 測定

測定方法：ELISA 法

測定波長：450 nm

測定試料：血清、血漿

特異性：人血清成分との反応はありません。

参考文献

- 1.) 最適使用推進ガイドライン ニボルマブ (遺伝子組換え) (販売名: オプジーボ点滴静注 20 mg、オプジーボ点滴静注 100 mg) ~非小細胞肺癌~ 平成29年2月 厚生労働省

製造販売業者

セルスペクト株式会社

岩手県盛岡市北飯岡 1-10-82

※クオンテスト™は、セルスペクト株式会社の試薬キットの名称です。

問い合わせ先

メタロジェニクス株式会社

〒260-0015 千葉市中央区富士見 1-14-13

千葉大栄ビル

TEL：043-227-6767

FAX：043-227-6768

e-mail：sales@ak-j.com

URL：http://metallogenics.co.jp/

※ 取扱説明書、測定プロトコル等、製品に関する最新の情報は下記弊社 web サイトのサポートコーナーでご確認下さい。
<http://metallogenics.co.jp/>

- ※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではありません。あらかじめご了承下さい。
- ※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダーを用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承下さい。
- ※ 品質に関してのお問い合わせの際は試薬キット包装袋に貼付の Lot No.をご確認の上、お問い合わせ下さい。
- ※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコルは予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切にご使用下さい。
- ※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については付属の安全データシート (SDS) に従って下さい。
- ※ 「Metallogenics (MG)」はメタロジェニクス(株)とセルスペクト(株)が展開する研究用試薬ブランドの名称です。