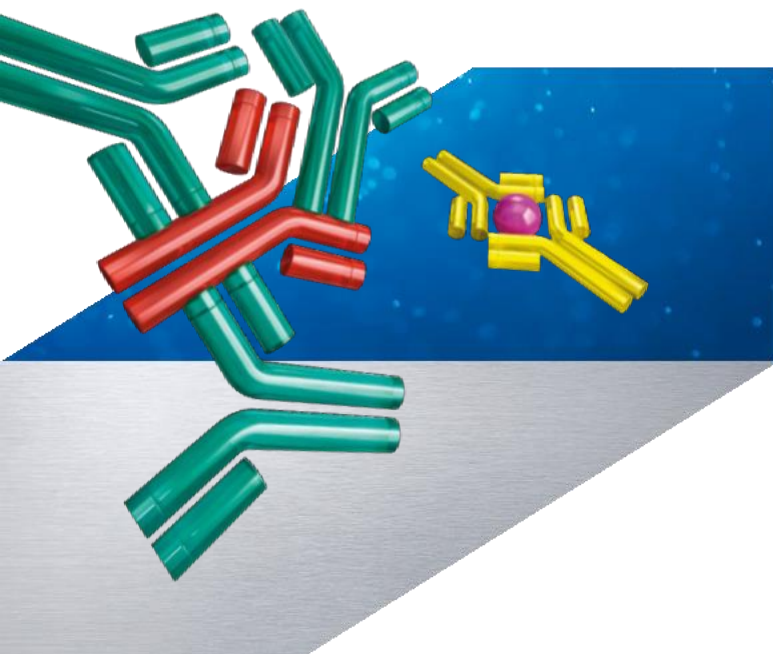


技術資料

免疫干渉反応ブロッキング剤 の使用方法

January 2018



はじめに

免疫干渉反応ブロッキング剤の役割とは？

免疫診断薬開発とキット製造において高い性能品質を確保することは、キット製造者にとって市場での成功と高い評価を得るキーとなります。免疫干渉反応は検査の品質に大きな脅威となります。そしてその影響は広範囲に及びます。干渉反応による誤った、信頼性を欠く検査結果は、患者に誤った診断を与え不適切な処置を施す恐れがあります。このような事例が報告されると同じブランドの全ての製品に対する不信感につながります。また、この問題の解決と是正措置のため多くの費用と時間を費やすこととなります。最適なブロッキング技術は、可能性のある干渉反応による影響を抑え、検査キット競合における優位性を保つための重要な要素となります。

ロシュ・カスタムバイオテックでは、最もよく見られる免疫干渉反応のタイプに応じて高い抑制効果を発揮できる幅広いブロッキング剤を取りそろえています。これらの製品は、ロシュが25年以上に渡り培ってきた体外診断用免疫検査試薬に用いる原料についての専門技術をもとに開発されたもので、安定した基盤を持つ当社免疫製品群のなかのひとつです。ロシュ・カスタムバイオテックは、診断薬業界からの要望を理解し、お客様への適切なブロッキング剤の提供のみならず、免疫測定検査における正確度、感度および精密度の向上のための最適な分析条件（濃度範囲、特異性等）についてもご相談に応じております。

ロシュ製ブロッキング剤は、以下の3種類の主な干渉に対してその機能ごとに分類されています：

抗体における干渉

検出系における干渉

固相表面における干渉

ブロッキング剤の使用方法

抗体における干渉

- A-1: はじめに
- A-2: ブロッキング剤の概要
- A-3: ブロッキング剤の選択法
- A-4: ブロッキング効果の確認
 - A-4-1: ブロッキング剤を評価するための一般的な推奨法
 - A-4-2: 酵素免疫測定法(1ステップまたは2ステップ、例:アルカリフォスファターゼ)の場合の評価法
ブロッキング剤をサンプル希釈液中に溶解
 - A-4-3: 酵素免疫測定法(1ステップまたは2ステップ、例:アルカリフォスファターゼ)の場合の評価法
ブロッキング剤を抗体コンジュゲート/酵素標識抗体を含む反応緩衝液に溶解

検出系における干渉

- B-1: はじめに
- B-2: ブロッキング剤の概要
- B-3: ブロッキング効果の確認
 - B-3-1: 酵素免疫測定法(1ステップまたは2ステップ、例:アルカリフォスファターゼ)の場合の評価法
ブロッキング剤をサンプル希釈液中に溶解
 - B-3-2: 酵素免疫測定法(1ステップまたは2ステップ、例:アルカリフォスファターゼ)の場合の評価法
ブロッキング剤を抗体コンジュゲート/酵素標識抗体を含む反応緩衝液に溶解

固相表面における干渉

- C-1: はじめに
- C-2: ブロッキング剤の概要
- C-3: 性能改善効果の確認
 - C-3-1: 酵素免疫測定法(1ステップまたは2ステップ、例:アルカリフォスファターゼ)の場合の評価法
ブロッキング剤を抗体コンジュゲート/酵素標識抗体を含む反応緩衝液に溶解

抗体における干渉

A-1: はじめに

異好性抗体とリウマチ因子 (RF) は免疫測定検査において大きな干渉の原因となります。血清／血漿サンプルに存在する異好性抗体は他の動物由来の抗体に対して幅広い反応性を示す特性があります。このような抗体は、一般的に human-anti-animal-antibodies (HAAA) と呼ばれており、最も代表的なものとして、ヒト抗マウス抗体 (human anti-mouse antibodies: HAMA) がこれに属します。異好性抗体は、偽陽性または偽陰性両方の誤った測定結果を与えます。この干渉に対しては、最適な抗体コンジュゲートと試薬組成のデザインとともに、動物種とサブクラスが同じブロッキング剤を使用することで最大のブロッキング効果が得られます。

A-2: ブロッキング剤の概要

製品名	剤型/包装 サイズ	溶解法/ 保存	サンプルサイ ズ/単位	調製液の濃度 (低/中/高)	Cat. No.
MAB33 IgG1	Lyo, custom fill	a,b,c* -15 to -25°C for 24 months	25 mg	50/500/5,000 µg/ml	11 200 941 103
Framework IgG	Lyo, custom fill	a,b,c* -15 to -25°C for 24 months	25 mg	50/500/5,000 µg/ml	03 369 846 103
MAB33 IgG1/ IgG1 Poly	Frozen liquid 0.005, 0.05, 0.250, 1, 5	n/a -60°to -90°C for 24 months	0.005 GAI	0.50/50/500 µg/ml	11 939 661 103
MAB33 IgG1/ Fab1 Poly	Lyo, 0.005, 0.05, 0.250	a,b,c* -15 to -25°C for 24 months	0.005 GAI	0.50/50/500 µg/ml	11 368 338 103
MAB IgG2b/ Fab2a Poly	Lyo, 5, 50, 250	a,b,c* -15 to -25°C for 24 months	5 mg	0.50/50/500 µg/ml	11 355 830 103
PAB H-IgG/ Fab Poly	Lyo, custom fill	a,b,c* -15 to -25°C for 24 months	0.01 GAI	0.50/50/500 µg/ml	11 668 544 103
PAB Sheep IgG	Lyo, custom fill	a,b,c* -15 to -25°C for 24 months	0.5 g	0.5/1.5/2.5 mg/ml PAB の 10 倍濃度	10 717 606 103
PAB Rabbit IgG	Lyo, custom fill	a,b,c* -15 to -25°C for 36 months	0.5 g	0.5/1.5/2.5 mg/ml PAB の 10 倍濃度	10 912 280 103
PAB Bovine IgG	Lyo, custom fill	a,b,c* -15 to -25°C for 24 months	0.5 g	0.5/1.5/2.5 mg/ml PAB の 10 倍濃度	11 293 621 103
HAMA Serum Type I positive control	Lyo	-15 to -25°C for 24 months	1 piece	1 ml の精製水に溶解後 1:20 に希釈	11 767 275 103
HAMA Serum Type II positive control	Lyo	-15 to -25°C for 24 months	1 piece	1 ml の精製水に溶解後 1:20 に希釈	05 167 060 103

* ストック溶液 (最終タンパク濃度 c=10 または 20 mg/ml)

- 1x PBS, 50 mM KPO₄, 150 mM NaCl
- 反応緩衝液
- 0.9% PBS (0.45 µm 無菌濾過、NaN₃ 添加、pH 6.9 以上)

抗体における干渉

A-3: ブロッキング剤の選択法

製品名	コンジュゲート抗体の種類	コンジュゲート抗体のサブクラス	コンジュゲート抗体のデザイン
MAB33 IgG1 #11200941103	Mouse IgG (HAMAs)	IgG1	1価*
MAB33 IgG1/IgG1 Poly #11939661103	Mouse IgG (HAMAs)	IgG2	多価** リウマチ因子
MAB33 IgG1/Fab1 Poly #11368338103	Mouse IgG (HAMAs)	IgG1, Fab fragment	多価** リウマチ因子
MAB IgG2b/Fab2a Poly #11355830103	Mouse IgG (HAMAs)	IgG2	多価** リウマチ因子
Framework IgG #03369846103	Mouse IgG (HAMAs)	IgG2	1価*
PAB H-IgG/Fab Poly #11668544103	Human IgG	IgG2	多価** リウマチ因子
PAB Sheep IgG #10717606103	Sheep IgG		
PAB Rabbit IgG #10912280103	Rabbit IgG		
PAB Bovine IgG #11293621103	Bovine IgG		

* コンジュゲート抗体は多価抗体または固相表面に高濃度でコーティングされた抗体

** コンジュゲート抗体は1価抗体または液相中の抗体

抗体における干渉

A-4: ブロッキング効果の確認

A-4-1: ブロッキング剤を評価するための一般的な推奨法

1. 2種類のモノクローナル抗体を用いる競合法またはサンドイッチ法の測定試薬に適用
2. ブロッキング剤はサンプル希釈液に直接添加するか、または、反応緩衝液、抗体コンジュゲートあるいはラテラルフロー（イムノクロマトグラフィー）測定試薬の固相に低濃度で添加します（A2の表：“調製液の濃度”の欄を参照）。
3. 最大の効果を得るためには、ブロッキング剤をモノクローナル抗体より先にサンプルに接触させます。このためには、ブロッキング剤をサンプル希釈液に添加します。
もし、お使いの試薬にサンプル希釈液が含まれていない場合は、第1反応開始前（サンプルとコンジュゲート抗体のインキュベーション時）、または第2反応開始前（後続のサンプルとコンジュゲート抗体のインキュベーション時）にブロッキング剤を反応緩衝液（コンジュゲート抗体含有）に添加します。
ラテラルフロー（イムノクロマトグラフィー）測定試薬においては、ブロッキング剤はコンジュゲートパッド、サンプル希釈液または前処理緩衝液に添加するか、試験パッドの手前に置かれているブロッキング用のメンブランに添加します。
4. ブロッキング剤の調製濃度はA-2の表をご参照ください。
5. 現行お使いのブロッキング剤は試薬（希釈液や反応緩衝液）から取り除いてください。
6. 陽性コントロール（干渉サンプル：例えば ロシュ製 HAMA serum Type I, II）および陰性コントロール（HAMA を含まない緩衝液等）を用意してください。
7. サンプルとしては、HAMA、HAAA またはリウマチ因子（RF）を含むヒト血清または血漿を用いてください。市販のサンプルを用いる場合は、干渉が HAMA、HAAA またはリウマチ因子（RF）に起因していることを確認してください。干渉は、非特異的な結合や検出系等の他の要因で発生する可能性があります。
8. ブロッキングの効果は、異なった濃度のブロッキング剤を用いて確認してください。
9. ブロッキング剤は2～3ロットを用いてロット間差を確認してください。
10. HAMA 陽性コントロール（HAMA serum Type I, II）は、偽陽性または偽陰性に対する感受性の評価のために用いることができます。これらは、干渉物質を含む正常ヒト血清ベースの凍結乾燥品で、保存剤は添加されていません。特性は以下のとおりです。
 - ・保存温度：-15～-25°C（輸送時は室温）
 - ・溶解法：1 ml の精製水で溶解し、使用前に 1:20 に希釈
 - ・溶解後の安定性：
 - 短時間の場合 +2～+8°C 保存で 1 週間
 - 長時間の場合 -15～-25°C 保存で 24 か月
 ただし、上記安定性は内容成分の安定性に依存。
また、繰り返しの凍結、融解を避ける。
11. ブロッキング剤を A-2 の表に従って溶解、調製してください。溶解後は、+2～+8°C 保存で 1 週間間、-15～-25°C 保存で 24 か月安定です。
12. ネイティブの干渉サンプルの測定数を増やしてブロッキングの効果を検証してください。個別の患者血清サンプル（n=100 以上）を測定し、実際の測定条件（サンプルの種類、測定範囲、測定装置、測定対象項目、測定濃度範囲）による参照法で得られた測定値について個々の患者血清測定回収率を比較してください。
13. ブロッキング剤の組成その他詳細については各々の製品の規格書をご参照ください。最適な反応条件はそれぞれの検査試薬の測定方法やブロッキング剤の種類によって異なります。したがって、ここでの記載内容はあくまでも参考としてください。最適な調製液濃度の設定等、反応条件の最適化を行ってください。

抗体における干渉

A-4-2: 酵素免疫測定法(1ステップまたは2ステップ、例: アルカリフォスファターゼ)の場合の評価法**ブロッキング剤をサンプル希釈液中に溶解**

1. A-3 の表(または別の選択ガイド)に従って最適なブロッキング剤を選択してください。
2. 抗体ブロッキング剤を A-2 の表に従って溶解してください。
3. ブロッキング剤を含まないサンプル希釈液を用意してください。
4. A-2 の表に従ってブロッキング剤をサンプル希釈液で溶解し、各種濃度の調製液を作製してください。
5. 干渉サンプルをブロッキング剤を含むサンプル希釈液で希釈してください。
6. 希釈後の干渉サンプルを反応容器に分注してください。
7. 測定法に従ってインキュベーションしてください。
8. 反応容器を洗浄してください。
9. 抗体コンジュゲートを反応容器に入れてください。
10. 測定法に従ってインキュベーションしてください。
11. 反応容器を洗浄してください。
12. 基質を反応容器に入れてください。
13. 測定法に従ってインキュベーションしてください。
14. 反応停止液を添加してください。
15. OD 値を読み取ってください。
16. 偽陽性の回避率(%)を計算してください。
17. 干渉陽性サンプルとして、ロシュ製 HAMA serum Type I: Cat. No. 11767275103 および Type II: Cat. No. 05167060103 をお使いいただくと便利です。

A-4-3: 酵素免疫測定法(1ステップまたは2ステップ、例: アルカリフォスファターゼ)の場合の評価法**ブロッキング剤を抗体コンジュゲート/酵素標識抗体を含む反応緩衝液に溶解**

1. A-3 の表(または別の選択ガイド)に従って最適なブロッキング剤を選択してください。
2. 抗体ブロッキング剤を A-2 の表に従って溶解してください。
3. ブロッキング剤を含まない反応緩衝液を用意してください。
4. A-2 の表に従ってブロッキング剤を抗体コンジュゲートを含む反応緩衝液で溶解し、各種濃度の調製液を作製してください。
5. 干渉サンプルを反応容器に分注してください。調製した抗体コンジュゲートおよびブロッキング剤を含む反応緩衝液を添加してください。
6. 反応容器中の干渉サンプルおよび抗体コンジュゲートとブロッキング剤を含む反応緩衝液を測定法に従ってインキュベーションしてください。
7. 反応容器を洗浄してください。
8. 基質を反応容器に入れてください。
9. 測定法に従ってインキュベーションしてください。
10. 反応停止液を添加してください。
11. OD 値を読み取り検量線から測定対象物の濃度を求めてください。
12. 偽陽性の回避率(%)を計算してください。
13. 干渉陽性サンプルとして、ロシュ製 HAMA serum Type I: Cat. No. 11767275103 および Type II: Cat. No. 05167060103 をお使いいただくと便利です。

検出系における干渉

B-1: はじめに

検出系における干渉は、ストレプトアビジンまたはアルカリフォスファターゼ (AP) 標識酵素のような検査試薬中の構成成分と患者検体中の異好性抗体との交差反応により惹起されます。これらの反応は、被検物質が存在しない場合でもシグナルとして認識され偽陽性の原因となります。標識酵素や直接標識剤は抗体による干渉のターゲットとなります。

B-2: ブロッキング剤の概要

製品名	剤型/包装サイズ	溶解法/ 保存	サンプルサイズ/単位	調製液の濃度 (低/中/高)	Cat. No.
*Alkaline Phosphatase Mutein rec. ¹	Lyo, custom fill	+2 to +8°C for 24 months	0.5 g	0.3/30/300 µg/ml	04 781 007 103
β-Galactosidase Mutein rec. ²	Lyo, custom fill	-15 to -25°C for 24 months	0.1 MGI	β-Galactosidase の濃度に依存	11 184 024 103
Streptavidin rec. inactive, Poly	Frozen liquid, 0.01, 0.4, 2 GAI	-60 to -90°C for 12 months	0.01 GAI	0.3/120/300 µg/ml	11 922 122 103

* 凍結乾燥品で以下の成分を含む

NaCl, 0.2 mmol/l, ZnCl₂ 0.1 mmol/l, TEA 30 mmol/l, MgCl₂ 1 mmol/l, raffinose, 50% (w/v), pH 7.6

¹ AP rec. highly active Cat. No.03137031103または AP rec. highly active CR reduced Cat. No.0535452103と組み合わせて使用

² β-Gal, rec. Cat. No.10570079103と組み合わせて使用

B-3: ブロッキング効果の確認

B-3-1: 酵素免疫測定法 (1 ステップまたは 2 ステップ、例: アルカリフォスファターゼ) の場合の評価法
ブロッキング剤をサンプル希釈液中に溶解

抗体における干渉、A-4-2 の項を参照し同様な手順にて実施してください。

調製液の最適濃度は、B-2 の表に従って求めてください。

B-3-2: 酵素免疫測定法 (1 ステップまたは 2 ステップ、例: アルカリフォスファターゼ) の場合の評価法
ブロッキング剤を抗体コンジュゲート / 酵素標識抗体を含む反応緩衝液に溶解

抗体における干渉、A-4-3 の項を参照し同様な手順にて実施してください。

調製液の最適濃度は、B-2 の表に従って求めてください。

最大のブロッキング効果は、最初にサンプルをブロッキング剤とともにインキュベーションしたときに得られます。

固相表面における干渉

C-1: はじめに

固相表面における干渉は、試験サンプル中の血清・血漿タンパクや疎水性物質と保護されていない固相表面の間での非特異的な相互作用によって惹起されます。このような相互作用は、使用されている各種固相（例えばコーティング処理または未処理のマイクロタイタープレートや各種ディスポーザブル製品）の表面の状態に依存し、バックグラウンドを増加させます。

ロシュ・カスタムバイオテックのウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin: BSA) 系ブロッキング剤は、免疫検査で使用されるあらゆるタイプの固相に対して有効です。これらのブロッキング剤は、反応表面、試薬成分および被検物質間の複雑なマトリックス中で発生する広範囲な干渉反応に対して効果があります。表面における干渉反応を効率的にブロッキングすることにより、バックグラウンドのシグナルを減少させ、感度を増加させることができます。また、試薬の安定性の向上にも寄与します。

固相表面における干渉

C-2: ブロッキング剤の概要

製品名	剤型/包装 サイズ	溶解法/ 保存	サンプルサイ ズ/単位	調製液の濃度 (低/中/高)	Cat. No.
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraction V, fatty acid free	Lyo, custom fill	n/a +2 to +8°C for 24 months	0.025 kg	0.5/2/5%	10 774 111 103
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraction V	Lyo, custom fill	n/a +15 to +25°C for 24 months	0.05 kg	0.5/2/5%	10 738 328 103
Bovine Serum Albumin (BSA), reduced sodium and potassium	Lyo, custom fill	n/a +15 to +25°C for 36 months	0.01 kg	0.5/2/5%	11 297 368 103
PAB Bovine IgG	Lyo, custom fill	a,b,c* -15 to -25°C for 36 months	0.5 g	0.5/2/5%, PAB の 10 倍濃度	11 293 621 103
Poly BSA I acetylated	Frozen solution 1.5, 10, 20 GAI	n/a -15 to -25°C for 24 months	1 g	0.5/2/5%	11 866 737 103
Poly BSA II succinylated	frozen solution 1.5, 10, 20 GAI	n/a -15 to -25°C for 24 months	1 g	0.5/2/5%	11 816 438 103
BPLA Type I	Lyo, custom fill	n/a +2 to +8°C for 24 months	0.01 kg	0.5/2/5%	11 726 536 103
BPLA Type IV	Lyo, custom fill	n/a +2 to +8°C for 24 months	0.01 kg	0.5/2/5%	11 726 544 103

* ストック溶液 (最終タンパク濃度 c=10 または 20 mg/ml)

- a) 1x PBS, 50 mM KPO₄, 150 mM NaCl
- b) 反応緩衝液
- c) 0.9% PBS (0.45 μm 無菌濾過、NaN₃ 添加、pH 6.9 以上)

固相表面における干渉

C-3: 性能改善効果の確認

C-3-1: 酵素免疫測定法(1ステップまたは2ステップ、例: アルカリフォスファターゼ)の場合の評価法

ブロッキング剤を抗体コンジュゲート／酵素標識抗体を含む反応緩衝液に溶解

1. ブロッキング剤の選択ガイドに従って最適なブロッキング剤を選択してください。
2. ブロッキング剤を C-2 の表に従って溶解してください。
3. ブロッキング剤を含まない反応緩衝液を用意してください。
4. C-2 の表に従ってブロッキング剤を抗体コンジュゲートを含む反応緩衝液で溶解し、各種濃度の調製液を作製してください。
5. 異なった種類の干渉サンプル、抗体コンジュゲートおよびブロッキング剤を含む反応緩衝液を測定法に従い反応容器中でインキュベーションしてください。
6. 反応容器を洗浄してください。
7. 基質を反応容器に入れてください。
8. 測定法に従ってインキュベーションしてください。
9. 反応停止液を添加してください。
10. OD 値を読み取り検量線から測定対象物の濃度を求めてください。
11. シグナル、バックグラウンド、S/N(シグナル/ノイズ)比、感度、精密度および試薬の安定性等の性能因子を計算してください。
12. 異なった種類のサンプルについて確認してください。
例: キットのキャリブレーター、コントロール、ヒト検体

免責事項

製造用途に限定

免責事項(Poly BSA Type I および Poly BSA Type II に関して)

体外診断用医薬品および医療機器製造用途に限定

custombiotech.roche.com

お問い合わせ先

Europe, Middle East, Africa, Latin America

Phone +49 621 759 8580
Fax +49 621 759 6385
mannheim.custombiotech@roche.com

United States

Phone +1 800 428 5433, ext. 14649 (toll-free)
Fax +1 317 521 4065
custombiotech.ussales@roche.com

Canada

Phone +1 450 686 7050
Fax +1 450 686 7012
custombiotech.can@roche.com

Japan

Phone +81 3 6634 1046
Fax +81 3 5479 0585
japan.custombiotech@roche.com

Asia Pacific

Phone +65 6371 6638
Fax +65 6371 6601
apac.custombiotech@roche.com

Published by

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim
Germany

© 2018 Roche Diagnostics GmbH
All rights reserved.