

アプリケーションノート

Andrew+™ システムおよび OneLab™ 自動リキッドハンドリングプラットホームを使用した Fungitell® グルカン検出アッセイ

Robert D' Ordine

Associates of Cape Cod Inc., Waters Corporation



要約

Fungitell® グルカン検出アッセイの実行用に Andrew+ および OneLab を設定できることを実証します。

はじめに

Fungitell アッセイは、医学上重要なさまざまな真菌の主要な細胞壁成分である (1→3) - β -D-グルカン (BDG) を測定する、96 ウェルマイクロプレートをベースとしたカブトガニ血球抽出物 (LAL) を用いた比色アッセイです¹。 Fungitell は、浸潤性真菌感染の症状を呈している患者、または浸潤性真菌感染しやすい医学的状態の患者の血清中の BDG の検出について FDA 認可済みであり、CE マークを取得しています^{2,3}。この LAL ベースのアッセイは、1 ミリリットルあたり 1 ピコグラム (pg/mL、 10^{-12} g/mL) の範囲のグルカンを検出できる、極めて高感度の酵素カスケードメソッドです^{3,4}。このアッセイはかなり複雑なプロセスで、多くのピペットティングのステップが必要です。検量線の作成、サンプル前処理、サンプルの配置、試薬の分注に時間と手間がかかりますが、これらはこのアッセイにおける重要な

ステップです。検量線の作成およびサンプル作成に使用するリキッドハンドリングステップの自動化、およびプレート上でのサンプルおよび標準試料の配置の自動化により、これらのアッセイの効率が向上します。プロセスの自動化により、分析者は時間のかかる繰り返し作業から解放され、生産性が向上し、分析作業の質が改善されるとともに、実行の一貫性が得られます。さらに、追加のメリットとして OneLab イベントログにより、監査に完全対応できるプロセスが確保され、以後の分析および調査が簡素化されます。

LAL グルカンアッセイの実行に関する注意事項: 上記のように、この分析では、pg/mL 範囲の微量のグルカンが検出されます。IFU に示されているように、アッセイの実行に使用するすべての器具は、干渉の可能性がないかを試験する必要があります。このアッセイを実行するには、優れたラボテクニックと清浄な環境が必要です。結果は、静的エンクロージャー内の Andrew+ を使用して収集しました。

今回、標準のピペットおよびドミノを使用し、Andrew+ と OneLab を用いて Fungitell アッセイを実行して得られた結果の例を示します。ドミノとは、チューブ、プレート、チップ、試薬、およびその他の器具用のモジュール式ホルダーであり、デッキ上でさまざまな組み合わせで構成することができます。図 1 に、システムの物理的な構成および付随するドミノを示します。

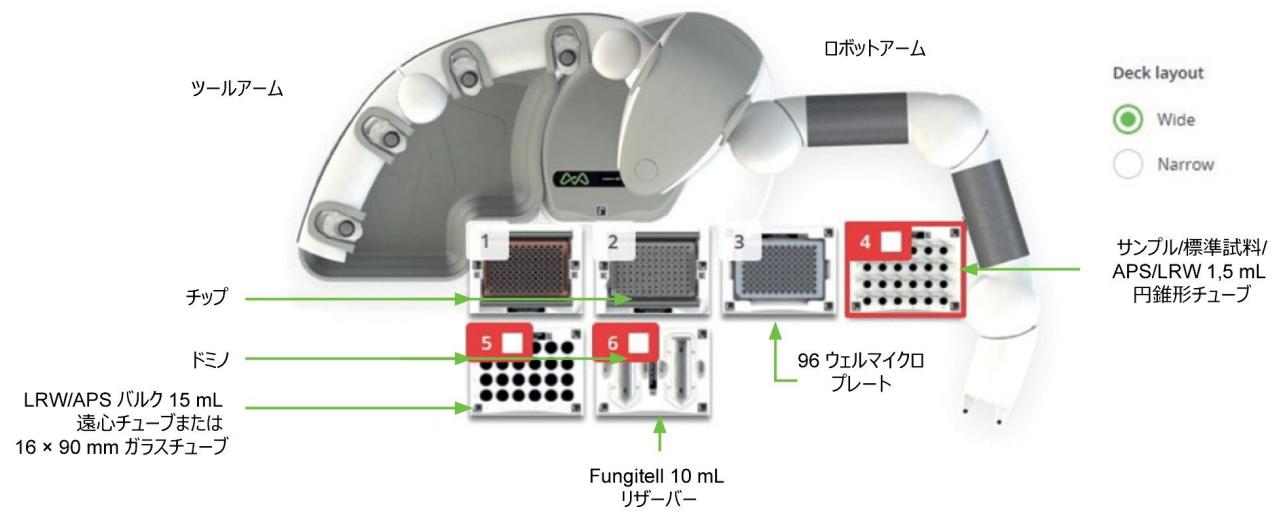


図 1. Andrew+ の構成

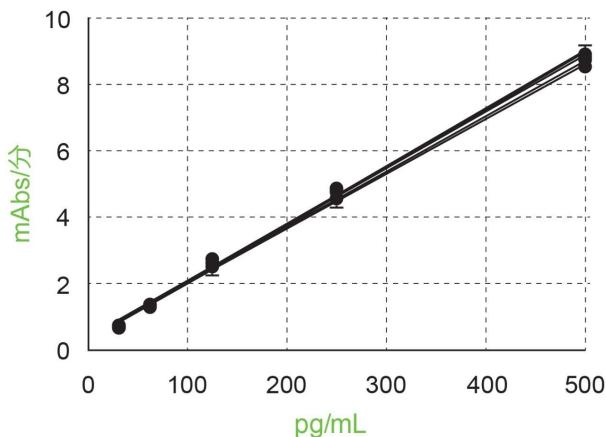
これは、このテクニカルノートに記載した結果を得るために、Fungitell アッセイで使用した構成です。使用した電子 Bluetooth 接続ピペットは、300 μ L マルチチャンネルピペット、300 μ L シングルチャンネルピペット、10 μ L シングルチャンネルピペットでした。LRW は LAL 試薬水、APS はアルカリ性の前処理溶液のことです。

結果および考察

Andrew+ システムのこの初期評価では、現在使用可能なドミノを使用して Fungitell を実行するための OneLab プロトコルの作成に取り組みました。このプロトコルは、検量線を作成してサンプル前処理を実行する Andrew+ および OneLab の機能を評価するように設計されています。この評価では、検量線のための段階希釈および複数の分析からのサンプル作成を実行する際の一貫性について、ロボットによって生成されたアッセイ結果から得られた成果を検討しました。

Fungitell メソッドの重要な要素は、検量線の作成です。ここに記載している各プレートについて、新規の希釈セットから新たな検量線を作成しました。このような希釈は、500 pg/mL のサンプルから出発した 300 μ L から 300 μ L の段階希釈として作成しました。これにより、濃度 500、250、125、62.5、31.25 pg/mL の 5 点検量線が作成されます。プロトコルの指示に従って、標準試料を 2 回繰り返しでプレートにロードしました。各プレートについて、各検量線の検量線レートデータ (mAb/分) を、線形回帰によって分析し、各分析について傾き、切片、R 値を算出しました。この一連の検量線データを得るために、2 日間にわたって 8 回分析を行いました。これらの結果を図 2 にまとめています。

。



	傾き	切片
値の数	8	8
最小値	0.0167	0.291
最大値	0.0175	0.434
範囲	0.000850	0.143
平均値	0.0171	0.363
標準偏差	0.000364	0.0419
平均標準誤差	0.000129	0.0148
変動係数	2.13%	11.5%

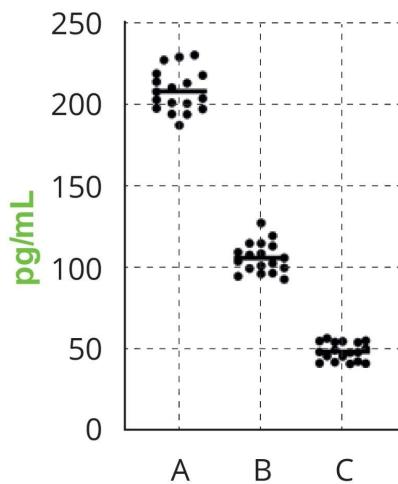
図 2. Andrew+ によって生成された Fungitell の検量線

このデータセット（8回の分析）では、同じロットの試薬およびグルカンの標準試料を異なる2日間で使用して、同じプロトコルをセットアップしました。各プレートの検量線は、独立した希釀セットから2回繰り返しで作成して使用しました。これらの検量線に使用した標準溶液は 500、250、125、62.5、31.25 pg/mL でした（これらの値の詳細な説明については、Fungitell の IFU を参照）。各セットの2回繰り返しのデータを、標準線形回帰で近似しました。このグラフにおいて、それぞれの x 軸との交点には 16 のデータポイントが含まれています。

8回の分析にわたる傾きと切片の分散はそれぞれ 2.3% と 11.5% でした。R 値はいずれも優れており、最小値は 0.997 でした（要件は $R \geq 0.980$ ）。これらの結果はすべて、IFU に示されている Fungitell アッセイの許容基準内に収まっ

ています。

検量線の評価に加えて、さまざまなサンプルをこれらの実験で試験しました。プレート内のサンプルの作成は、Fungitell アッセイの重要な部分であり、エラーにつながる可能性があります。サンプルは、プレート内で、各ウェルにサンプル 5 μ L とアルカリ性前処理溶液 20 μ L を添加することで作成します。それぞれの添加が独立したピペットティングステップであるため、粘性の高い血清サンプル 5 μ L を添加すると、大きくばらつくことがあります。1 セットの実験（図 3）では、3 サンプルを糖溶液で段階希釈して、血清の粘性を模倣しました。このような 3 サンプルを手動希釈によって作成し、通常の Fungitell プロセスで試験しました。



	A	B	C
値の数	18	18	18
最小値	188	93.1	41.1
最大値	231	128	56.7
範囲	43.0	34.6	15.6
平均値	209	106	48.7
標準偏差	12.8	9.34	5.49
平均標準誤差	3.02	2.20	1.29
変動係数	6.14%	8.79%	11.3%

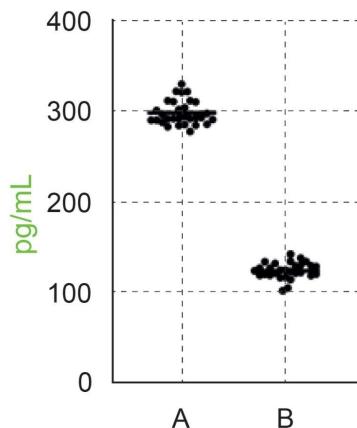
図 3. Andrew+ によって実行した Fungitell における糖ベースのサンプルの結果

散布図にはサンプルごとに 18 のポイントが含まれており、各セットのラインは平均です。各サンプルを、3 枚のプレートそれぞれについて 6 回分析し、18 ポイントのセット全体をこの分析に含めました。各プレートを完全に実行し、新たな検量線の作成をもって完了としました。これらの実験は、同じロットの試薬を使用して、3 枚のプレートにわたって同日に行いました。

実験は、それぞれサンプル濃度約 180、90、45 pg/mL で結果が得られるように設計しました。実験の目的は、プレート間およびさまざまな濃度でのサンプルの結果の分散を調べることでした。各プレートにつき、各サンプルを 6 回分析し、18 の結果を分析しました。サンプルの分散は 6 ~ 11% の範囲でした。この結果は、サンプルそれについて良

好な一貫性を示しています。

別の実験セットでは、2つの血清サンプルを調べました。これらのサンプルは、グルカンを添加した通常の市販の抗凝固剤不使用の血清を使用して作成したものです。目標の濃度はそれぞれ 250 ~ 300 pg/mL および 125 ~ 150 pg/mL でした。これら 2 サンプルを、3 枚のプレートにわたって、10 回繰り返しで試験しました。各血清サンプルを、前述の唯一の 5 μ L のピペッティングステップでロードしました。3 枚のプレートにわたるデータを検討し、その結果を図 4 にまとめています。



	A	B
値の数	30	29
最小値	278	102
最大値	330	143
範囲	52.4	40.3
平均値	298	124
標準偏差	13.4	8.92
平均標準誤差	2.46	1.66
変動係数	4.51%	7.17%

図 4. Andrew+ によって実行した Fungitell における血清ベースのサンプルの結果

散布図にはサンプルごとに 30 (A) ポイントまたは 29 ポイント (B) が含まれており、各セットのラインは平均です。各サンプルを、3 枚のプレートそれについて 10 回分析しました。各プレートを完全に実行し、新たな検量線の作成をもって完了としました。これらの実験は、同じロットの試薬を使用して、3 枚のプレートにわたって同日に行いました。サンプル B には 415 pg/mL のデータポイントが 1 つあり、これを外れ値と判断してこの分析から除外していることに注意してください（詳細については上の本文を参照）。

これらの結果も良好であり、サンプルの 3 枚のプレートにわたる分散は約 4 ~ 7% の範囲でした。サンプル B の分析において、1 つの結果が 415 pg/mL を超えていたため、除外されたことに注意してください。プレートを物理的に点検

した後、このサンプルの実験計画（1本のサンプルトランスファーチップ、1つのウェル、同じバルクサンプル）を理解し、OneLab の実行ログを検討してサンプルロードのパターンに異常がないことを確認した上で、これは「ホット」ウェルであったと結論付けました。この値は、プレートおよびセット全体にわたる統計的外れ値でもあります。

結論

異なる 2 日間に収集した 8 枚のプレートから得られた検量線の傾き (CV 2.1%、n = 8) および切片 (CV 11.5%、n = 8) の結果は分散が小さく、それぞれの場合で線形近似の R 値は 0.997 以上でした。これらの結果は、同じロットの試薬と器具を使用し、同様の実験計画下でこのアッセイを手動で行って得られた検量線の結果で見られた分散の範囲と比較して、同等以上になりました。

これらの実験では、2 セットのグルカン含有サンプルを試験しました。いずれの場合も、これらのサンプルを、同じロットの試薬と器具を使用して、3 枚のプレートにわたって繰り返して試験しました。これらの両方のサンプルセットで見られた分散は、約 4 ~ 11% と良好でした。全体として、これらの結果により、OneLab で設計されたプロトコルに従って動作する Andrew+ システムが、使用説明書に概説されている期待される要件の範囲内で Fungitell アッセイを実行できることが実証されました。

エンドトキシン⁵ およびグルカン⁶ の LAL ベースのアッセイを実施するためのカスタム自動化プロセスについて記載している論文は多く存在しています。いずれのプロセスも、一貫性と汚染に対する感度について同様の問題を克服する必要がありますが、Andrew+ が最も簡単で利用しやすいことが実証されています。

参考文献

1. Odabasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-glucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. *Medical Mycology* 44: 267–272.
2. De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P. et al. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer /Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institutes of Allergy and Infectious disease Mycosis Study Group (EORTC/MSG) Concensus Group. *Clin. Inf. Dis.* 46: 1813–1821.
3. Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y., and Hashimoto, Y. 1991. Activation of a Limulus coagulation factor G by (1→3)- β -D-Glucans. *Carbohydrate Res.* 218:167–174.

4. Fungitell Instructions For Use.https://www.fungitell.com/fungitell_assay#Kit_ifu <
https://www.fungitell.com/fungitell_assay#Kit_ifu > .
5. Tsuji KI, Martin PA, Bussey DM. 1984 Automation of chromogenic substrate Limulus amebocyte lysate assay method for endotoxin by robotic system. *Applied and environmental microbiology*. Sep 1;48(3):550-5.
6. Prüller, F., Wagner, J., Raggam, R.B., Hoenigl, M., Kessler, H.H., Truschnig-Wilders, M. and Krause, R., 2014. Automation of serum (1→3)-beta-D-glucan testing allows reliable and rapid discrimination of patients with and without candidemia. *Medical mycology*, 52(5): 455–461.

ソリューション提供製品

Andrew+ ピペットイングロボット <<https://www.waters.com/labautomation>>

<https://www.onelab.com>

OneLab ソフトウェア >

720008040JA、2023 年 8 月

^

© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

利用規約 プライバシーポリシー 商標 キャリア 法的通知およびプライバシー通知 Cookies
Cookie 環境設定