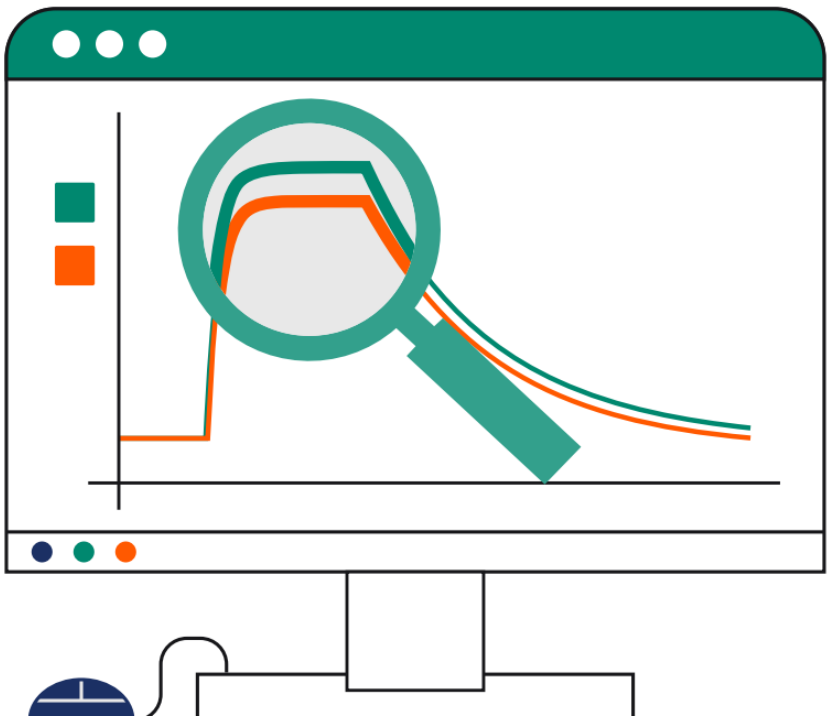
Biacore Insight Evaluation Software

Sensorgram comparison マニュアル

Insight Evaluation Software Ver.7.0～



目次

１. 本資料の目的 4

2. Sensorgram comparison について 5

2-1. 機能の目的 5

2-2. Similarity score を用いた同等性の定量 6

2-3. 測定フォーマット 7

Single-cycle kinetics （SCK） のフォーマット 8

Multi-cycle kinetics （MCK） のフォーマット 9

Single concentration （SC） のフォーマット 10

Multiple injections （MI） のフォーマット 11

3. Run setup 12

3-1. 共通要件 12

3-2. Standards のセットアップ 12

Standard の濃度設定 13

3-3. Samples と Controls のセットアップ 13

Sample の濃度設定 14

3-4. Ligand capture あるいは immobilization level 15

3-5. Biacore 1 series の推奨セットアップ 15

3-6. Biacore 8 series の推奨セットアップ 15

4. Sensorgram comparison analysis 17

4-1. Injection assignment 18

4-2. Blank settings & Comparison settings 19

Blank settings 19

Comparison settings 20

4-3. 解析範囲の除去 21

4-4. Comparison algorithm 22

Standard deviation（SD） 22

Max/min 23

Percentage deviation 23

4-5. Standard の取り扱い 25

同一ラン内に含める場合 25

Evaluation method に保存した Standards の利用 25

4-6. 見かけの化学量論比 26

4-7. Accept/Reject の管理 27

4-8. 実際の解析手順 27

4-9. 制限事項 28

5. GxP 環境下での分析 29

5-1. 測定メソッド内での Standards のロック 29

5-2. 規制環境下における Standards の取り扱い 29

1. 本資料の目的

本資料は Biacore Insight Software の基本ライセンスで利用可能な Sensorgram comparison について、その利用方法や解析方法について解説したものです。

本資料は Biacore Insight Evaluation Software User Manual ならびに Application guide を元にご案内しております。より詳細な解説は以下の web ページより正式な英語版マニュアルをダウンロードしてご確認ください。

https://www.cytivalifesciences.com/ja/jp/support/software/biacore-downloads/Biacore-Insight-Evaluation-Software

注：GxP 環境で管理された Procedure、アクセス制限、監査証跡などの機能を使用するには、別途 GxP extension および適切なユーザー権限が必要です。

2. Sensorgram comparison について

2-1. 機能の目的

近年のバイオ医薬品開発では、モノクローナル抗体に加え、二重特異性抗体、多重特異性抗体、抗体薬物複合体（ADC）など、より複雑な分子の開発が進んでいます。これらの分子は、複数の結合部位を持つことや不均一な結合挙動を示すことが多く、従来の 1:1 binding model に基づく速度論解析だけでは十分に評価できない場合があります。また、バイオシミラー開発においては、規制当局が Comparative Analytical Assessment（CAA）の一環として、先行バイオ医薬品との類似性を客観的に評価することが求められています。

このような背景から、結合相互作用データをモデルに依存せず直接比較し、結合挙動の微細な変化を高感度に検出できるアプローチへのニーズが高まっています。Sensorgram comparison は、この課題に対応するために開発された Biacore™ Insight software の機能であり、SPR 測定によって得られたセンサーグラム全体を統計的に比較することで、サンプル間の類似性を定量的に評価します。速度定数や平衡解離定数を算出する必要がなく、結合曲線そのものの形状を比較するため、複雑な結合メカニズムや多価結合を示す分子にも適用できます。

評価においては、まず基準となるサンプルを複数回測定し、参照標準（Reference Standard）を作成します。参照標準には、通常の測定バラつきを反映した類似性範囲（Similarity range）が設定されます。評価対象サンプルは、この参照標準と比較され、結合プロファイルの類似性が数値として算出されます。結果はグラフと数値の両方で表示されるため、サンプル間の違いを視覚的かつ客観的に評価できます。

本機能は、開発中の分子が目的とする医薬品原薬であることを確認する Identity test、バイオシミラー開発では、バイオシミラー候補と先行品の比較評価、製造ロット間のバラつき評価、長期保存やストレス試験における安定性評価、バッファー条件や温度条件など、異なるアッセイ条件が結合挙動に与える影響の確認、創薬スクリーニングにおける候補分子の選択など、研究開発から GxP 環境下での品質評価まで幅広い用途に活用できるツールです。

2-2. Similarity score を用いた同等性の定量

センサーグラムの類似性は、Similarity score と呼ばれる指標によって定量化されます。Similarity score は 0-100%の間で表され、個々の Standard センサーグラムから平均または中央値の標準曲線と Similarity range を定義し、Sample センサーグラムをこの範囲と比較します。

Similarity score は 2 つの要素を組み合わせて算出されます。まず、サンプルのセンサーグラム上のデータポイントが、上限および下限の許容範囲内に収まっている場合、そのポイントは 100%として評価されます。これは、期待される結合挙動と一致していることを意味します。

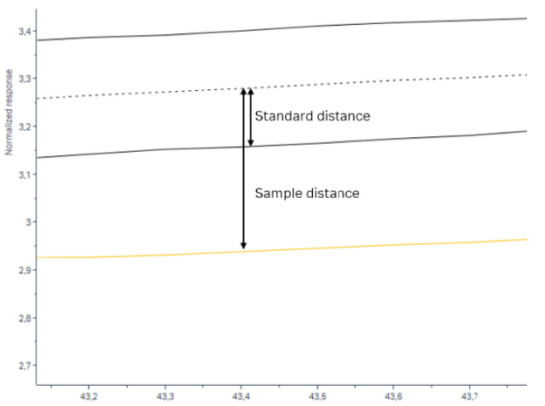
一方で、データポイントが許容範囲から外れている場合は、スコアが減点されます。減点の大きさは、測定値が最も近い許容限界からどれだけ離れているかに応じて決まります。つまり、許容範囲からの逸脱が大きいほど、Similarity Score は低くなります。

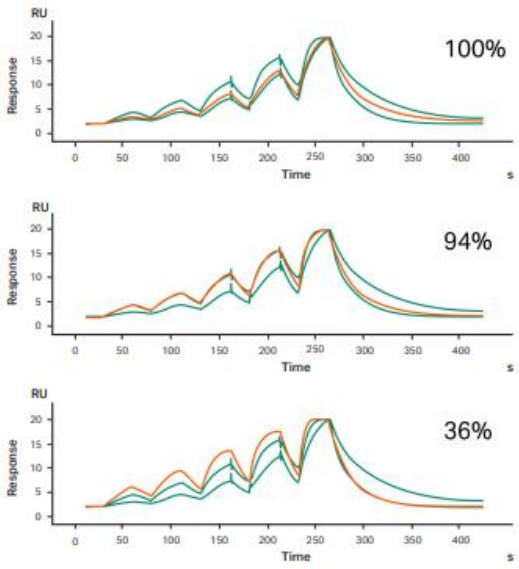
より詳細には、Similarity score は、Similarity range 内に含まれるデータポイントの割合と、範囲外ポイントの逸脱度から算出される Similarity rating を組み合わせて計算されます。

Similarity score = % inside + （% outside × Similarity rating）

また、Similarity rating は Standard distance と Sample distance の二乗和の比から計算されます。

このように、Similarity Score は、センサーグラム全体にわたる一致度と逸脱の程度を総合的に評価することで、参照標準に対するサンプルの類似性を、速度論モデルに依存せず客観的かつ定量的に示します。





2-3. 測定フォーマット

Sensorgram comparison は、センサーグラムが結合挙動をできる限り包括的に反映するよう、通常は速度論解析条件（kinetic conditions）で取得したデータに対して実施することが推奨されます。

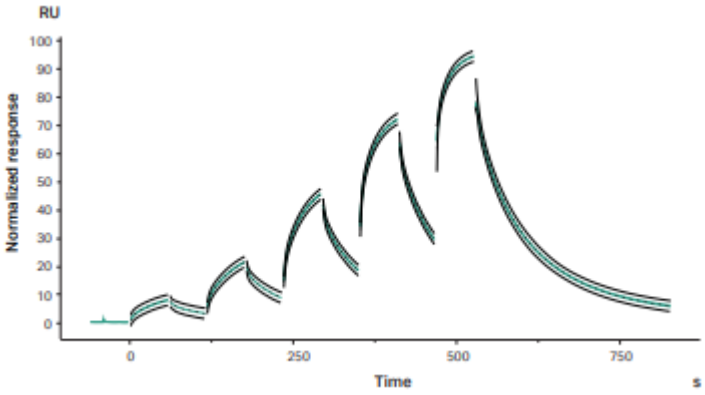
Sensorgram comparison では、4 種類の実験フォーマットがサポートされています。ソフトウェアは、サンプルの注入順序や変動パラメータに基づいて、実験フォーマットを自動的に判別します。

Sensorgram comparison による評価では、複数の測定ランのデータをまとめて解析・比較することが一般的です。ただし、同時に評価する測定ランは、すべて同じ実験フォーマットで実施されている必要があります。

以下の表に、Sensorgram comparison でサポートされる各実験フォーマットの概要を示します。

フォーマット	詳細
Single-cycle kinetics（SCK）	Single-cycle kinetics 添加コマンドを用いて全ての濃度を 1 回の測定サイクル内で連続的に添加する形式です。
Multi-cycle kinetics（MCK）	各濃度を個別の測定サイクルで評価する形式です。
Single concentration（SC）	濃度系列を取得することなく、単一濃度で複数サンプルの結合プロファイルを迅速に比較する形式です。異なる濃度で取得したセンサーグラムを比較することも可能です。
Multiple injections（MI）	**Analyte、Dual、Enhancement** など、複数の添加イベントを 1 サイクル内に組み込む形式です。多段階の相互作用を伴う複雑な結合挙動の比較に適しています。

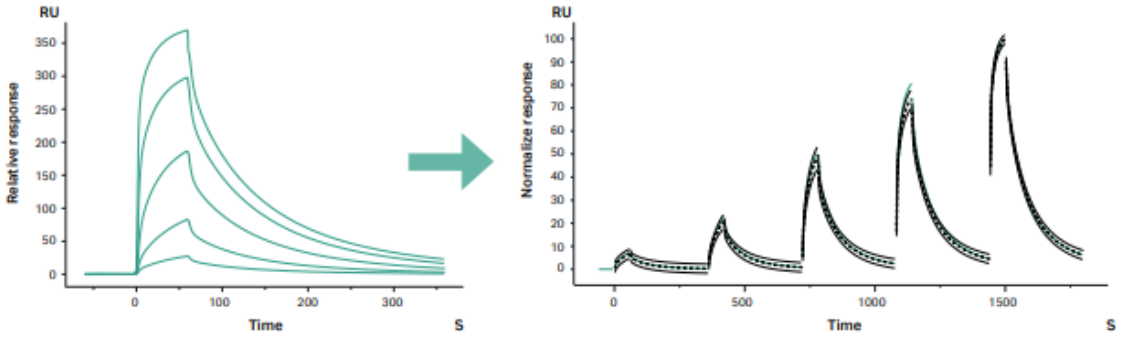
Single-cycle kinetics（SCK）のフォーマット



SCK では、複数のアナライト濃度を低濃度から高濃度へ順次添加し、最後に解離相を測定します。同一のリガンド表面上で連続的に測定を行うため、濃度系列全体が 1 本の連続したセンサーグラムとして取得されます。

このアプローチは、再生条件の確立が難しい場合や、解離が非常に遅い強い相互作用を示す場合に特に有効です。

Multi-cycle kinetics（MCK）のフォーマット



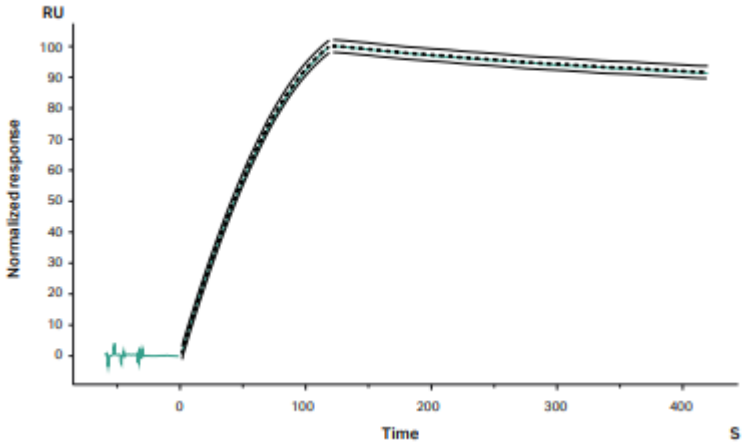
MCK は、各アナライト濃度を個別の測定サイクルで注入するアッセイフォーマットです。この形式では各濃度の測定ごとにセンサー表面のコンディショニングまたは再生が必要となります。

Sensorgram comparison では、事前定義済みのランメソッドを使用した直接結合アッセイおよびキャプチャーベースアッセイの両方に対応しています。**なお、MCK 測定では少なくとも 1 つの非ゼロ濃度について繰り返し測定を行うことが一般的に推奨されますが、このように一部の濃度のみで繰り返し測定を行う実験デザインは Sensorgram comparison ではサポートされていません。全ての濃度について同じ回数の繰り返し測定を行う必要があります。**

濃度系列は、低濃度から高濃度の順序だけでなく、任意の順序で測定することも可能です。ただし、**Biacore 8 series では parallel MCK（チャンネルごとに異なる濃度を測定する方式）は Sensorgram comparison ではサポートされていませんのでご注意ください。**

MCK データの解析では、各サイクルのセンサーグラムが低濃度から高濃度の順に仮想的な共通 X 軸上へ自動的に連結されます。これにより、SCKと同様に濃度系列全体の結合プロファイルを比較できるようになります。

Single concentration（SC）のフォーマット

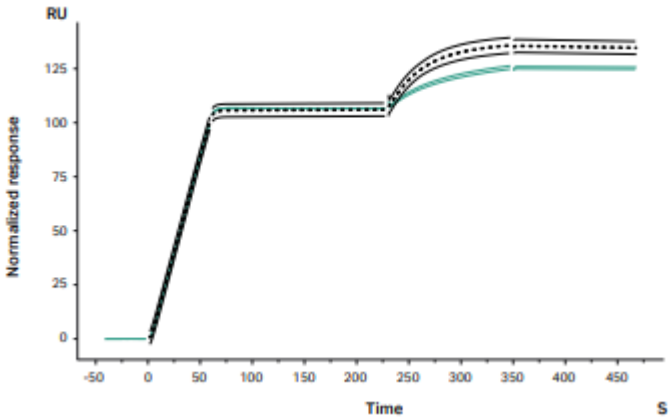


SC アッセイは、各測定サイクルにおいて単一濃度のアナライトを設定し、**Analyte injection** 添加コマンドを用いて実施します。

Sensorgram comparison における SC ワークフローは、サンプルと標準品の濃度が同じ場合だけでなく、異なる場合にも対応できます。ただし、濃度以外の実験条件は全ての測定ランで同一である必要があります。

SCK や MCK のような濃度系列を取得する必要がなく、結合挙動を迅速かつ柔軟に比較することが可能なため、例えば抗体スクリーニングのように、多数の候補分子の結合プロファイルを迅速に比較する用途に適しています。

Multiple injections（MI）のフォーマット



MI アッセイは、1 つのサイクル内で複数の添加ステップを組み合わせる実験フォーマットです。MI アッセイでは、Analyte、Dual、Enhancement などの添加を組み合わせることができ、実験デザインに応じて **Wash** や **Wait** の **Step** を挿入することも可能です。

MI のセンサーグラム全体の分類は、サイクル内での最初の添加によって決定されます。例えば、最初の添加が Standard に設定されている場合、その分類が MI のセンサーグラム全体に適用されることになります。

評価時には、Sensorgram comparison は MI のセンサーグラム全体の類似性を算出するだけでなく、各添加 **Step** の類似性も個別に評価します。

MI アッセイは、逐次的な結合イベントを伴うワークフローに適しています。例えば、二重特異性分子の評価や、抗原への結合後に別の受容体へ結合させるような一次相互作用から二次相互作用への解析などに有効です。また、結合メカニズム全体を評価するために複数の添加タイプを組み合わせる必要がある複雑な相互作用解析にも適しています。

なお、MCK フォーマットとは異なり、同一サンプルを異なる濃度で測定した場合でも、各センサーグラムは同じ X 軸上に連結されません。異なる濃度で取得したデータはそれぞれ独立したグループとして扱われ、個別に比較評価が行われます。

3. Run setup

3-1. 共通要件

有効な比較のため、比較対象の測定ラン（Run）ではデータ取得レート、流速、温度、結合時間、解離時間、注入コマンドおよびサイクル構成を一致させます。

3-2. Standards のセットアップ

測定ランの設定時、Biacore Insight Control Software で専用のコントロールタイプとして用意されている Standard を設定するか、Biacore Insight Evaluation Software の解析時に Variable Table から Standard を定義する必要があります。

Standard はできるだけ多く（最低 2 本）の測定データを用いて設定することが推奨されます。理想的には、以下のような様々な要因に起因する自然なバラつきを含めることで、より代表性の高い Standard を構築できます。

- 試薬ロットの違い
- サンプル調製の違い
- オペレーターの違い
- 使用機器の違い
- 測定日や測定ランの違い
- キャプチャー量または固定化レベルの違い

このような多様性を Standard データに組み込むことで、実際の測定バラつきを反映した comparison window を設定できるようになります。また、統計的な信頼性の高い類似性範囲（上限カーブおよび下限カーブ）を構築することが可能になります。

更に、評価時に定義した Standard は Evaluation method 内に保存できるため、将来の解析において同じ Standard を継続的に利用し、一貫した比較評価を行うことができます。

Standard の濃度設定

Standard は同一のアナライト濃度で設定することが推奨されます。異なる濃度で測定した Standard は、それぞれ別の Standard グループとして扱われ、解析では 1 つのアッセイ内に複数の Standard グループを設定できるため、異なる結合プロファイルを個別に評価することが可能です。

3-3. Samples と Controls のセットアップ

Sensorgram comparison による有効な評価を行うためには、Standards、Samples、および Controls について、アッセイ条件を可能な限り同一にすることが重要です。具体的には、以下の条件を統一することが推奨されます。

- Data collection rate
- 結合時間と解離時間
- 添加コマンド
- 流速
- 温度（Standards、Samples、Controls は同一温度で測定することが推奨されますが、温度ストレスが結合挙動に及ぼす影響を評価する目的で、異なる温度条件間の比較を行うことも可能です）

以下は任意設定です。

- 分子量
  - 見かけの化学量論比を自動計算するためには、リガンドおよびアナライトの分子量を設定する必要があります。
- ブランクサイクル
  - ブランクサイクルは含めることを推奨します。ブランクとして設定するには、Control type を Blank に設定するか、濃度を 0 に設定します。
  - ネガティブコントロールとしては適していません。ブランクデータは Response level cut-off によって解析から除外される可能性があるほか、Normalization によって差異が過度に強調される場合があるためです。
- ポジティブコントロール

- Standard と同じ、または類似した結合プロファイルを示す既知の結合分子です。ポジティブコントロールのセンサーグラムは、通常、設定された Similarity range 内に入ることが期待されます。

- ネガティブコントロール
  - リガンドには結合するものの、Standard とは明確に異なる結合プロファイルを示す分子です。ネガティブコントロールのセンサーグラムは、通常、Similarity range の外側に位置することが期待されます。

測定ランには適切な Controls を組み込むことが推奨されます。Controls を含めることで、アッセイが適切に実施されていることを確認できるだけでなく、測定の安定性をモニタリングし、Similarity score の結果をより信頼性高く解釈することが可能になります。

Sample の濃度設定

最も信頼性の高い比較結果を得るため、Samples と Standards をできるだけ同じ濃度で測定することが推奨されます。わずかな濃度差であれば、Sensorgram comparison の Normalization 機能によって補正できる場合があります。

SCK と MCK の場合：

Samples と Standards は同じアナライト濃度で測定することが推奨されます。

SC および MI の場合：

Samples と Standards は同じ濃度でも異なる濃度でも評価可能です。ソフトウェアには濃度情報を入力する必要がありますが、その値は概算値でも構いません。入力した濃度はデータ整理のために使用されるものであり、Similarity score の計算には影響しません。ただし、スクリーニングのように Samples と Standards の濃度差が大きい場合には飽和やマストランスポートの影響によってセンサーグラムの形状が変化することがあります。そのような場合には、センサーグラム全体を比較するのではなく、解離相に着目した比較を行うことが推奨されます。

3-4. Ligand capture あるいは immobilization level

Standards と Samples の両方で、固定化量またはキャプチャーレベル（RU）はできるだけ同程度に維持することが推奨されます。センサー表面上のリガンド量にわずかな差がある場合は Sensorgram comparison の Normalization 機能によって補正されます。

3-5. Biacore 1 series の推奨セットアップ

- Fc2-1、Fc4-3、Fc6-5 のペアワイズでフローセルを用いることが推奨されます。
- Standards は 1 組または複数組のフローセルペアを用いて測定することが推奨されます。
    - サンプルは、どのフローセルペアから取得したデータであっても比較可能です。
    - 直接固定化リガンドを用いるアッセイでは、3 組すべてのフローセルペアで Standard を測定することが推奨されます。これにより、センサー表面間のバラつきを標準データに反映できます。
- ブランクサイクルを含めることが推奨されます。

3-6. Biacore 8 series の推奨セットアップ

- Standards は複数のチャネル（8 チャネル全て、あるいはその一部）で測定することが推奨されます。
    - 複数の Standards と、それに対する Samples を同一ラン内で解析することも可能です。
- 解析時には、全てのアッセイ条件が一致している場合、異なるチャネルで取得した Standards は統合されて使用されます。
    - 複数チャネルを利用することで、Standards、Controls、および Blanks を同一ラン内に組み込み、同一条件下での自然なバラつきを取り込むことができます。
- ベースライン補正のため、各チャネルにブランクサイクルを含めることが推奨されます。
- ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールは、任意のチャネル、サイクルに配置できます。
- 各チャネルには異なる固定化リガンドを設定することもできます。
    - 各チャネルの 2 つのフローセルにそれぞれ異なるリガンドを固定化し、合計 16Fc での測定が可

能です。この場合、それぞれのリガンドは独立した Standard グループとして扱われ、比較評価も個別に実施されます。

4. Sensorgram comparison analysis

解析を開始する前に、Standard、Blank、Positive control および Negative control が適切に定義されていることを確認します。また、センサーグラム、ベースライン、Reference surface への結合、固定化レベルまたはキャプチャーレベルを確認し、明らかな異常やアーティファクトがないことを確認します。

Sensorgram comparison の解析画面（ワークスペース）は 7 つのパネルと Settings パネル（左）で構成されています。デフォルトでは全てのパネルが表示されているわけではありません。

青：Standards、緑：ポジティブコントロール、赤：ネガティブコントロール、黄：Samples



	パネル	詳細
①	Thumbnails	・Sensorgram comparison のグループ化ルールに基づいて分類されたデータを表示 ・表示形式は以下の 3 通り： (a) センサーグラムのみ（デフォルト） (b) センサーグラム、平均または中央値の標準曲線、および Similarity range (c) Deviation curve、平均または中央値の標準曲線、および Similarity range（Deviations パネルの内容と対応）
②	Bar chart	各グループの Similarity score を表示
③	Scatter chart (not shown)	・Similarity score と許容範囲内に含まれるデータポイントの割合（Points inside range）との関係をプロット表示

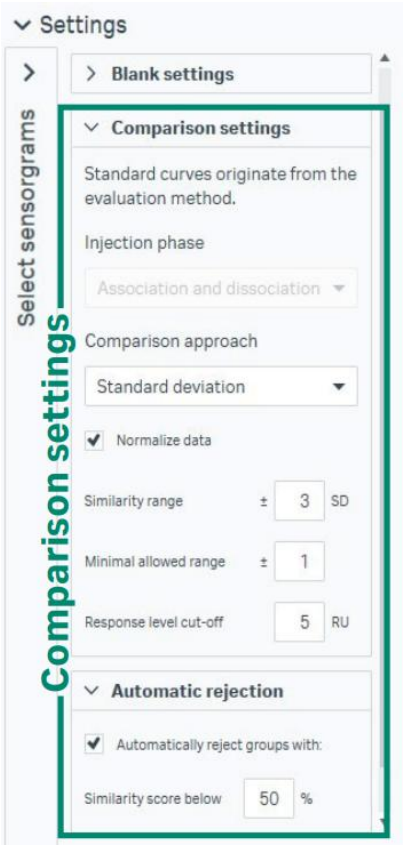
		・多数の小さな逸脱によってスコアが低下しているのか、少数の大きな逸脱によってスコアが低下しているのかを区別できる
④	Comparison chart	平均値または中央値から作成された標準曲線、および Similarity range の上限・下限カーブを重ねて表示
⑤	Result table	各グループについて、パラメータ値および比較結果を表示
⑥	Details (not shown)	現在選択されているグループについて、個々のパラメータ値、個々のセンサーグラム、およびブランクセンサーグラムを表示
⑦	Deviations chart	選択したグループについて、各データポイントにおける個々の Sample センサーグラムの、平均標準曲線または中央値標準曲線からの逸脱量を表示

4-1. Injection assignment

Sensorgram comparison では、どの Injection command を比較対象として使用するかを Injection assignment で指定します。Biacore Insight Software はランメソッドの構成に基づいて利用可能なフォーマットを自動的に判別します。

設定	内容
Analyte	Analyte injection を比較対象として使用します。Multi-cycle kinetics（MCK）または Single concentration（SC）の解析に使用します。
Single-cycle kinetics	Single-cycle kinetics injection を比較対象として使用します。
Multiple injections	Analyte、Single-cycle kinetics、Dual、Enhancement から構成される複数 Injection のシーケンス全体を比較します。解析結果は Injection 全体に対する Similarity score に加え、各 Injection ごとの Similarity score も表示されます。

4-2. Blank settings & Comparison settings



Blank settings

Sensorgram comparison では、Blank として定義したセンサーグラムを差し引くことで、バッファー変動や非特異的シグナルの影響を低減できます。

Blank は Control type を Blank に設定するか、濃度を 0 として定義します。Multiple injections（MI）フォーマットでは、最初の Injection で定義された Blank が使用されます。

Blank の品質は解析結果に大きく影響するため、Details パネル内の Blanks タブを確認し、異常な Blank は除外することを推奨します。

設定	内容
Use blanks within same group	同一グループ内の Blank を使用します。複数の Blank が存在する場合は中央値が使用されます。
Use other blanks	別グループの Blank を利用します。以下の方法を選択可能です。

	Preceding: 最も近い前方の Blank を使用します。 Following: 最も近い後方の Blank を使用します。 Nearest: 最も近い Blank を使用します。 Median consecutive preceding and following: 前後の Blank 群の中央値を使用します。
No subtraction	Blank subtraction を実施しません。

Comparison settings

Setting	詳細	Allowed values	Applications
Injection phase	センサーグラムのどの部分を類似性解析に含めるか設定します。	・結合相と解離相（デフォルト） ・結合相のみ ・解離相のみ	結合相や解離相など、解析上重要な領域に絞って評価したい場合や、一部の領域にアーティファクトが含まれる場合に有効。
Comparison approach	選択したアルゴリズムに基づいて平均または中央値の標準曲線を算出し、Similarity range の上限および下限カーブを作成します。	・標準偏差（SD）（デフォルト） ・Max/min ・% deviation	Standards 間のバラつきの大きさや、求める評価の厳しさに応じて適切なアルゴリズムを選択。
Normalize data	注入開始時のレスポンスを 0、選択した注入中の最大レスポンスを 100 としてスケーリングします。これにより、レスポンスの絶対値ではなくセンサーグラムの形状に重点を置いて比較できます。Standard deviation 法および Max/min 法で使用でき、Percentage deviation 法では使用できません。	Yes/No	キャプチャー量や固定化量の違いによってレスポンスが変化する場合でも、センサーグラムの形状そのものに着目して比較したい場合に有効。特にキャプチャーアッセイで有効。

Minimal allowed range	Standards のバラつきが極めて小さい場合に、類似性範囲が過度に狭くなることを防ぎます。この設定は、実際のバラつきが設定した最小範囲より小さい場合にのみ適用されます。	・Default = 0 RU ・User defined (e.g., ±1 RU)	Standards 間のバラつきが極めて小さい場合に使用。比較許容範囲が過度に狭くなることを防ぎ、実用的な比較基準を維持する。
Response level cut-off	レスポンスが設定した閾値未満のセンサーグラムを評価対象から外します。これにより、レスポンスが小さいデータが類似性解析に影響を与えることを防ぎます。	・Default = 1 RU ・User defined	レスポンスが小さいデータや結合が認められないセンサーグラムを解析対象から除外する際に有効。
Automatic rejection	Similarity score が設定した閾値を下回るグループを自動的に Reject と判定します（バーグラフ上で R（Rejected）として表示されます）。 手動で設定した Accept／Reject は、Automatic rejection による判定より優先されます。	・Default = 0 % ・User defined threshold (%)	スクリーニングや比較性評価において、類似性の低いサンプルや規格外のセンサーグラムを自動的に判別するために使用。

4-3. 解析範囲の除去

測定中のバルクシフトや Injection 開始・終了時のアーティファクトが Similarity score に影響する場合は、不要な範囲を解析対象から除外できます。

Comparison chart および Deviations chart では以下の操作が可能です。

- Injection 開始および終了付近（約 1 秒）の自動除去
- 任意範囲の手動除去
- 同一 Cycle への一括適用
- 同一 Flow cell／Channel への一括適用

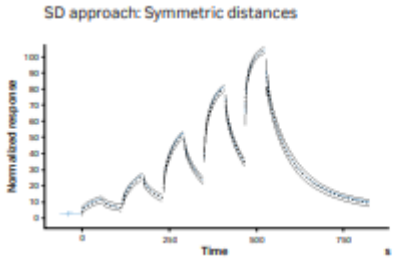
- 除去範囲の Undo および Restore

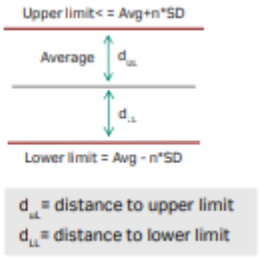
Multiple injections（MI）フォーマットでは、Injection 間の Wash や Wait 領域も解析対象から除外できます。

特に Dual injection や複雑な MI アッセイでは、比較に不要な区間を除外することで、目的とする結合挙動のみを評価できる場合があります。

4-4. Comparison algorithm

Standard deviation（SD）



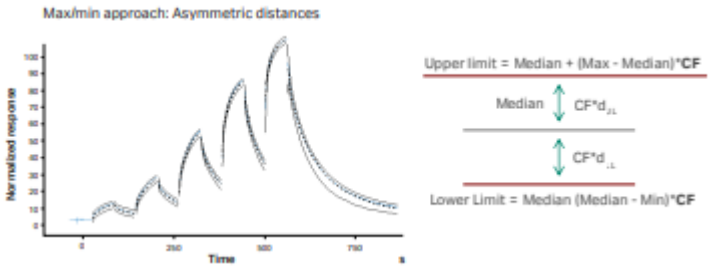


SD（標準偏差）法における Similarity range は、平均 Standard レスポンスの各データポイントに対して、指定した数の SD を上下に設定することで定義されます。これは Sensorgram comparison におけるデフォルトの比較手法です。

この手法は、Standard のバラつきが正規分布に従うことを前提としています。実際には、Standard のバラつきが非正規分布になる明確な理由がない場合、SD 法は最初に検討すべき一般的なアプローチです。ただし、この手法を適切に使用するためには標準偏差を統計的に意味のある形で算出できる十分な数の Standard のセンサーグラムが必要です。

この手法は、アッセイ性能の評価や、製品や試薬の経時的な安定性評価に有用です。例えば製造ロットの品質管理において、標準的なバラつきの範囲内で結合挙動が維持されているかを確認する用途に適しています。

Max/min

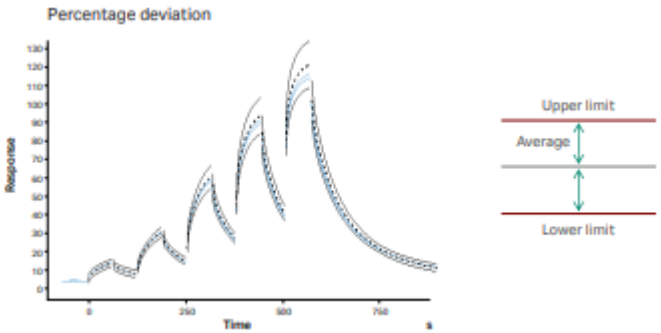


Max/min 法では、中央値のセンサーグラムを中心となる参照曲線として使用し、上限および下限は、Standard 群の最大値と最小値、あるいは中央値と最大値・最小値との距離に基づいて設定されます。

また、各限界曲線までの距離（Max – Median または Median - min）は、Curve Factor（CF）を適用することで調整できます。CF を大きくすると comparison window は広くなり、小さくするとより厳しい比較条件を設定できます。

この手法は、スクリーニングアプリケーションにおいて、候補分子を迅速に選別するための許容範囲を設定する場合に有効です。また、結合挙動が不均一な相互作用や、外れ値を含むデータセットの解析にも適しています。SD 法のように正規分布を前提としないため、バラつきが対称的でない場合も設定できます。

Percentage deviation



Percentage deviation 法では、平均標準曲線を中心として、設定した割合に基づく Similarity range を作成します。詳細な計算方法は Evaluation Manual の「Sensorgram comparison algorithms」を参照してください。

この方法は、シグナル強度に応じて類似性範囲が拡大または縮小するため、レスポンスが大きくなるほどバラつきも大きくなるようなデータに適しています。また、Standard が少ない場合や、Standard のセンサーグラム同士の重なりが非常に大きく実際のバラつきがほとんどない場合でも、実用的な比較範囲を設定できます。このアプローチは、開発初期段階の解析や、Standard 数が限られている場合に適しています。例えば、初期スクリーニング段階において、限られた Standard データを元に比較性評価を行う場合に有効です。

Percentage deviation 法では、センサーグラムの Normalization はサポートされていません。したがって、こ

の手法を使用する場合は、Standard と Sample の固定化レベル、キャプチャーレベル、および測定条件をできるだけ一致させることが推奨されます。

4-5. Standard の取り扱い

Standards は、同一ラン内に含める方法と、保存済みの Evaluation method から適用する方法の 2 通りで使用できます。測定ラン内に Standard を含めた場合、解析は自動的に Standard を認識し、デフォルトの類似性範囲を作成した上で、Sample との比較解析を実施します。

同一ラン内に含める場合

同一ラン内に含まれる Standards を使用する方法は、アッセイ間のバラつきが予想される場合や、測定セッションごとに実験条件が変化する可能性がある場合に推奨されます。

このような場合には、Standards と評価対象 Samples を同じラン内で測定することで、その時点の実験条件を反映した比較ウィンドウ（Similarity range）を設定可能で、当日の測定バラつきを適切に反映した類似性評価が可能になります。

このアプローチは、以下のような用途に適しています。

- キャプチャーレベルや固定化レベルのバラつきが大きいアッセイ
- 抗体やバインダーのスクリーニングアッセイ
- 開発初期段階におけるアッセイ開発および最適化

Standards をラン内に含めた場合、Sensorgram comparison は Standard サイクルを自動的に認識し、デフォルトの similarity range を作成した上で、その条件に基づいて Samples の評価を行います。

Evaluation method に保存した Standards の利用

Standards は、複数の測定ランから収集したデータを統合し、品質確認を実施した上で、evaluation method 内に保存することもできます。これにより、将来の解析でも同じ Standards セットを一貫して使用できるため、再現性の高い比較評価が可能になります。

この方法はアッセイの安定性が十分に確認されており、固定化された Similarity range を用いた評価が望ましい場合に適しています。

このアプローチは、以下のような用途に適しています。

- ロット間の比較性評価

- 安定性試験およびストレス試験
- バリデーション済みアッセイやルーチン測定など、一貫した参照に基づく評価が求められるワークフロー

Standards を Evaluation method 内に保存すると、以降の解析において再現性およびトレーサビリティを確保した同等性評価が可能になります。

また、Evaluation method 内に保存された Standards が存在する場合、Sensorgram comparison ではその Standards が優先的に使用されます。そのため、測定ラン内に Standards が含まれていても、それらは評価には使用されません。

この仕組みにより、規制対応が求められる運用においても、検証済みかつ固定化された Standards を用いた一貫性のある評価を実施できます。なお、測定ラン内の Standards を用いて評価を行いたい場合は、新たに Sensorgram comparison を立ち上げる必要があります。

4-6. 見かけの化学量論比

見かけの化学量論比は、固定化またはキャプチャーされたリガンド量に対して、どの程度のアナライトが結合しているかを示す指標です。アナライトの結合量をリガンド量との相対関係で評価するための推定値として利用されます。

この値は、リガンドおよびアナライトの分子量が設定されている場合に計算されます。計算には、アナライトの最大結合量とリガンドレベルが使用されます。Multiple Injections（MI）アッセイでは利用できません。

算出された見かけの化学量論比は、各センサーグラムごとに Details table に表示されるほか、Result table にはグループ平均値として表示されます。

見かけの化学量論比は、Normalization によってレスポンスの大きさが補正されている場合でも、結合容量の違いを把握できるという利点があります。そのため、アッセイの一貫性やサンプル間の比較性を確認するための補助的な指標として活用できます。

4-7. Accept/Reject の管理

Sensorgram comparison では、評価対象となるグループに対して Accept または Reject の判定を設定できます。Accept／Reject は以下のグループレベルパネルから設定できます。

- Thumbnails
- Bar chart
- Scatter chart
- Result table

Reject されたグループはバーグラフ上で「R」と表示され、グレー表示になります。

また、Automatic rejection 機能を利用することで、指定した Similarity score 未満のグループを自動的に Reject として判定することもできます。

なお、Accept／Reject はグループ単位の判定であり、個々のセンサーグラムを除外する Exclude とは異なります。個別のセンサーグラムに対する除外は Comparison chart、Deviations chart、Details パネルから実施します。

4-8. 実際の解析手順

1. 1 つまたは複数の Run を開く。
2. Standard が Run setup または Variables table で定義されていることを確認する。
3. Sensorgram comparison item を作成する。
4. Injection assignment を確認する。
5. Blank subtraction 設定を確認し、異常な Blank を除外する。
6. Comparison approach、Normalization、Similarity range などを設定する。
7. 不適切なグループまたは異常曲線を除外する。
8. Bar chart、Comparison chart、Deviations chart を確認する。
9. 承認するグループを Accepted に設定する。

4-9. 制限事項

- 異なる Biacore シリーズ間で取得したデータを同じ評価内で比較することはできません。
- Standard を保存した Evaluation method は、Standard を取得した装置と同じ Biacore シリーズの Run に適用する必要があります。
- Evaluation method に保存された Standards を使用する場合、Standards の個別除外や解析範囲の除去はできません。
- Evaluation method に Standards が保存されている場合、保存された Standards が優先され、測定ラン内の Standards は同じ Sensorgram comparison item では使用されません。
- Evaluation method に Standards が保存されている場合、Injection phase は変更できません。
- Insight Software Ver.7.0 では、Capture、ABA、Poly、Inject and elute の各 Injection type は Sensorgram comparison でサポートされません。

5. GxP 環境下での分析

Sensorgram comparison はデータインテグリティおよびトレーサビリティが求められる GxP 規制環境でも利用することができます。Biacore Insight Software では、評価ワークフローが管理された監査可能な手順に基づいて設計されており、同等性評価は検証済みの Evaluation method とロックされた Standards を用いて実施されます。本ソフトウェアは 21 CFR Part11 の要件に対応しており、電子記録、監査証跡、および管理された Evaluation method をサポートしています。

これらの機能により、Sensorgram comparison は、ロット間同等性評価、出荷判定試験、安定性試験、ストレス試験などの規制対象アプリケーションにおいても信頼性高く適用することが可能です。

5-1. 測定メソッド内での Standards のロック

- 規制環境下のワークフローでは、Standards を定期的に測定するとともに、一般ユーザーによる変更を防ぐためにロックする必要があります。
- Biacore Insight Control Software では、公開済みの GxP procedure の中で特定のアッセイステップをロックする機能を有しています。

GxP procedure 内で Standards を保護するためには、以下の設定を推奨します。

- 全ての Standards を独立したアッセイ **Step** として設定する。
- その **Step** を公開済み procedure 内でロックし、権限を持たないユーザーによる変更を防止する。
- ロックされた Standards 測定 **Step** は、アッセイワークフロー内で必要に応じて繰り返し実行するよう設定できる。
- 日常的な運用を行うユーザーは、ロックされた Standards での測定を実行可能だが、内容を変更することはできないため、完全な GxP トレーサビリティを維持できる。

このアプローチにより、参照検体の挙動を厳密に管理しながらも、実験運用上の柔軟性を確保することができます。

5-2. 規制環境下における Standards の取り扱い

Evaluation method 内に保存された Standards は、公開済みの GxP procedure を使用した評価時に自動的に適用されます。これらの Standards はロックされており、通常ユーザーが編集または削除することは

できません。また、規制モード下で Standards や evaluation settings を変更する場合は、適切な権限と変更履歴の記録が必要となります。

なお、規制対応用の Evaluation method に Standards が含まれていない場合は、測定ラン内に Standards を組み込んで評価を行う必要があります。

■総合お問合せ窓口

TEL : 03-5331-9336

● 機器アフターサービス

（営業日の 9:00～17:00、音声案内に従い①を選択）

● 製品技術情報に関して

（バイオダイレクトライン、営業日の 9:00～12:00、13:00～17:00）

音声案内に従い②を選択後、対象の製品別の番号を押してください。

❶：ÄKTA、クロマトグラフィー関連製品

❷：ビアコア関連製品

❸：電気泳動関連製品、画像解析装置

❹：IN Cell Analyzer、ワットマン製品、その他製品

e-mail : Tech-JP@cytiva.com（常時受付）

● 納期／在庫お問合せ

（営業日の 9:00～12:00、13:00～17:00、音声案内に従い③を選択）

注）お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

注）アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。オペレーターにつながります。

www.cytivalifesciences.co.jp

論文に掲載いただく際の名称・所在地

Cytiva / Tokyo, Japan

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336

e-mail : Tech-JP@cytiva.com

掲載されている内容は 2021 年 8 月現在のもので予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問い合わせに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。