

PD-L1 ELISA Kit, Human

ヒト PD-L1 ELISA キット

【I】キットについて

【I-1】背景と測定原理

がん細胞は、活性化 T 細胞表面に発現する PD-1 受容体に対する PD-L1(プログラム細胞死リガンド-1)を表面に発現し、PD-1/PD-L1 結合を介して T 細胞の活性を抑制することにより、免疫監視機構を回避します^{1), 2)}。近年、これらの免疫監視機構をがん治療に応用し、抗 PD-1 抗体薬や抗 PD-L1 抗体薬はこの結合を阻害することで T 細胞の活性化を増強することを目的として開発され、これまで様々な固形がんでその臨床効果や安全性が確認されています^{3), 4)}。

しかしながら、初期効果後の治療抵抗性が多く観察されておりますが、抗 PD-L1 抗体薬に対する耐性のメカニズムはほとんどわかっていませんでした。

最近、抗 PD-L1 耐性 NSCLC 患者から、膜貫通ドメインが欠損している 2 つのユニークな分泌型 PD-L1 スプライシングバリエーションが同定されました⁵⁾。

その分泌型 PD-L1 スプライシングバリエーションが「おとり」として作用することによって PD-L1 阻害薬に対する耐性を誘導することが示唆され、また、分泌型 PD-L1 スプライシングバリエーションが検出された患者における血漿(エクソソームフリー)または胸水中の可溶性 PD-L1 のレベルは、健康なドナーまたは分泌型 PD-L1 変異体を伴わない患者よりも高いものでした⁵⁾。

さらに、可溶性 PD-L1 の血中濃度は、がん患者の臨床病理学的特徴、治療反応、および生存転帰を予測する可能性があることも示唆されています⁶⁾。

本キットは、免疫チェックポイント関連分子である PD-L1 に対する高性能抗体を用いた 1 ステップサンドイッチ法により、血液サンプルや細胞培養上清中のヒト PD-L1 を高感度に定量することができます。

【I-2】キットの特長

- ・ 抗ヒト PD-L1 抗体を固相化したプレートと HRP 標識した抗ヒト PD-L1 抗体を用いた 1 ステップ サンドイッチ法により迅速で高感度にヒト PD-L1 を検出します（検出感度 1pg/mL）。
- ・ 特殊な装置は不要で、通常のプレートリーダーがあれば測定できます(波長 450nm)。

【I-3】キットの原理

この ELISA キットは 1 ステップサンドイッチ法を原理としています。 このキットの ELISA プレートは抗ヒト PD-L1 抗体が予め固相されています。

最初に、サンプルを HRP 標識抗ヒト PD-L1 抗体と共にプレートのウェルに加えます。


次に、洗浄後、プレートにトラップされたサンプル中のヒト PD-L1 と HRP 標識抗ヒト PD-L1 抗体の結合物に基質を添加します。

最後に、HRP による発色をプレートリーダーで読み取り、サンプル中のヒト PD-L1 を定量します。

【I-4】構成

保存温度：冷蔵（2～8℃）

	内容	容量	数量	危険表記および取扱上の注意
1	抗 PD-L1 抗体 固相化プレート	96well (8well x 12 strips)	1 枚	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋 などの保護具を着用の上、人体への接触を避けるよう十分に配慮してください。
2	標準 PD-L1	100μL	1 本*	
3	アッセイバッファー	15mL	1 本	
4	洗浄バッファー (10 倍濃縮)	15mL	1 本	
5	HRP 標識抗 PD-L1 抗体 (250 倍濃縮)	20μL	1 本	
6	基質液	12mL	1 本	

7	停止液(2N H ₂ SO ₄)	6mL	1 本	(成分として硫酸を 9.8%含む) 労働安全衛生法 第 57 条および 第 57 条の 2 に該当 危険    ・吸入すると有害（気体、蒸気、ミスト） ・重篤な皮膚の薬傷及び眼の損傷 ・重篤な眼の損傷 ・呼吸器系の障害のおそれ ・長期にわたる、又は反復ばく露による呼吸器系の障害のおそれ
8	プレートシール		1 枚	

*n=2 として、検量線 3 回分

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- ・マイクロピペッター(10～1000μL)
- ・マルチチャンネルピペッター
- ・リザーバー
- ・プレートシェーカー
- ・プレートリーダー（波長 450nm が測定可能なもの）
- ・プレートウォッシャー

【Ⅱ】試薬、サンプルの調製方法

【Ⅱ－１】洗浄バッファの調製

洗浄バッファ(10 倍濃縮)を精製水で 10 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分：洗浄バッファ(10 倍濃縮)15mL に精製水 135mL を加え、混合します。

【Ⅱ-2】標準 PD-L1 の希釈調製（アッセイ毎に 2 ウェル分ずつ調製）

	PD-L1 濃度 (pg/mL)	標準 PD-L1	アッセイ バッファー	希釈率
A	8000			
B	800	30μL of A	270μL	10
C	400	150μL of B	150μL	2
D	200	150μL of C	150μL	2
E	100	150μL of D	150μL	2
F	50	150μL of E	150μL	2
G	25	150μL of F	150μL	2
H	12.5	150μL of G	150μL	2

キットに入っている標準 PD-L1（上表の A）30μL にアッセイバッファー270μL を加え（10 倍希釈）、よく混合した溶液を B とします。この B 溶液 150μL にアッセイバッファー150μL を加え（2 倍希釈）、よく混合した溶液を C とします。以下、同様に 2 倍希釈した溶液を調製し、50μL ずつ測定して下さい。各濃度 n=2 では、50μL x 2 = 100μL 使用します。

希釈調製した標準 PD-L1(12.5~800 pg/mL)は、必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-3】抗体の調製

HRP 標識抗 PD-L1 抗体(250 倍濃縮)をアッセイバッファーで 250 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分：アッセイバッファー5mL に HRP 標識抗 PD-L1 抗体(250 倍濃縮)を 20μL を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗 PD-L1 抗体、必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-4】サンプル調製（血液サンプル）

血液サンプルは血清または血漿を用いてください。

測定範囲上限(800pg/mL)を越えたサンプルは、アッセイバッファーを用いて適宜希釈して測定することにより、その濃度を求めることができます。

【Ⅱ-5】 サンプル調製（細胞培養上清）

細胞培養液を 2,000 x g で 10 分間遠心して、破片を取り除きます。その上清液をサンプルとして測定します。測定範囲上限(800pg/mL)を越えたサンプルは、アッセイバッファーを用いて適宜希釈して測定することにより、その濃度を求めることができます。

【Ⅱ-6】 サンプルの保存

未希釈のサンプルは-20℃以下で保存します。また、凍結融解を繰り返さないでください。

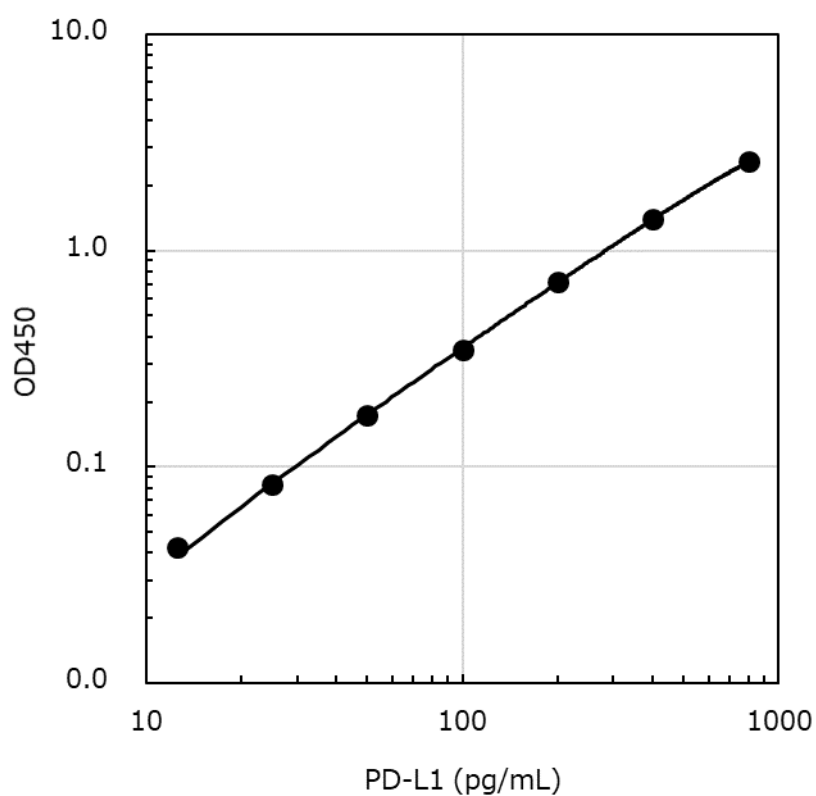
【Ⅲ】 測定方法

1. 抗 PD-L1 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. 標準 PD-L1 を希釈調製します（【Ⅱ-2】）。
3. 2 で希釈調製した標準 PD-L1 (12.5~800 pg/mL)もしくはサンプル溶液を 1 ウェルあたり 50μL ずつプレートへ加えます。
4. さらに、希釈調製した HRP 標識抗 PD-L1 抗体（【Ⅱ-3】）を各ウェルに 50μL ずつ加えます。
5. プレートにシールし、プレートシェーカーで攪拌(800rpm, 30 秒)します。
6. 室温で 1 時間プレートシェーカーを用いて攪拌(800rpm)して反応、もしくは 2 時間静置反応します。
7. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300μL の洗浄バッファーを加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。
8. 基質液を各ウェルに 100μL ずつ加え、室温で遮光して 20 分間静置反応します。
9. 発色の濃度を確認後、各ウェルに 50μL ずつ停止液を加えます。
10. プレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定します（測定波長：450nm）。
11. 横軸に標準 PD-L1 濃度、縦軸に吸光度を取り、標準曲線を描きます。
12. サンプルから得られた吸光度を標準曲線に対応させ、サンプル溶液の PD-L1 濃度(pg/mL)を読み取ります。

【Ⅳ】 測定例

【Ⅳ-1】 標準曲線

一例として、標準 PD-L1 濃度(pg/mL)に対する吸光度(OD450)をグラフに描くと図 1 のようになります。ただし、標準曲線は、アッセイ毎に新たに描いて、サンプル中の濃度を算出してください。



(各 PD-L1 濃度の吸光度からブランク吸光度を差し引いた値をプロットしています)

PD-L1 (pg/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度 (濃度計算値)	濃度計算値 (pg/mL)
	1	2		
0	0.066	0.068	0.067	
12.5	0.106	0.113	0.110	
25	0.15	0.151	0.151	
50	0.239	0.240	0.240	
100	0.421	0.407	0.414	
200	0.789	0.783	0.786	
400	1.460	1.462	1.461	
800	2.690	2.595	2.643	
血清サンプル	0.719	0.714	0.717	179.2

図1 標準 PD-L1 による標準曲線および血清サンプル測定

【IV-2】 検出感度

ブランク吸光度の標準偏差と検量線の傾きから算出した検出限界⁷⁾ は、1 pg/mL でありました。

【IV-3】 添加回収（血清、血漿）

各サンプルに既知濃度(3 濃度)の PD-L1 を添加し回収率を算出した結果は表 1 に示すとおりでありました。

表 1 各サンプルの添加回収

サンプル	回収率(%)	
	平均値	範囲
血清	94%	92-99%
血漿	91%	88-93%

【参考文献】

- 1) H. Dong, S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, L. Chen: *Nat Med.*, **8**, 793 (2002).
- 2) L. Chen, X. Han: *J Clin Invest.*, **125**, 3384(2015).
- 3) S. L. Topalian, F. S. Hodi, J. R. Brahmer, et al.: *N Engl J Med.*, **366**, 2443 (2012).
- 4) J. R. Brahmer, S. S. Tykodi, L. Q. Chow, et al.: *N Engl J Med.*, **366**, 2455 (2012).
- 5) B. Gong, K. Kiyotani, S. Sakata, et al.: *J Exp Med.*, 216, 982 (2019).
- 6) X. Zhu, J. Lang: *Oncotarget*, 8, 97671 (2017).
- 7) 厚生労働省, 厚生省医薬安全局審査管理課長通知, 医薬審, 第 338 号, 平成 9 年 10 月 28 日.

PD-L1 ELISA Kit, Human

【 I 】 About this kit

【 I – 1 】 Background and Measurement Principal

Tumor cells evade the immune surveillance by up-regulating surface expression of PD-L1, which interacts with PD-1 on T cells to elicit the immune checkpoint response^{1),2)}. In recent years, anti-PD-1 antibody drugs and anti-PD-L1 antibody drugs that inhibit this signal transduction have been confirmed to have clinical efficacy and safety in various solid cancers by enhancing T cell activation^{3),4)}.

However, therapeutic resistance after initial response has been increasingly observed, and mechanisms of resistance to anti-PD-L1 antibody therapies were mostly unknown.

Recently, it has been identified the unique secreted PD-L1 splicing variants lacking the transmembrane domain, from anti-PD-L1 therapies-resistant NSCLC patients⁵⁾.

It has been suggested that the secreted PD-L1 splicing variants induced the resistance to PD-L1 blockade therapy by acting as a “decoy”, and the levels of soluble PD-L1 in the exosome-free plasma or pleural effusion in patients detected with secreted PD-L1 splice variants were much higher than in healthy donors or patients without the secreted PD-L1 variants⁵⁾.

Increasing evidence suggests that the blood levels of soluble-PD-L1 might facilitate the prediction of clinicopathological characteristics, treatment response, and survival outcomes in the cancer patients⁶⁾.

This kit detects human PD-L1 by a one-step sandwich method using the high-performance antibody against human PD-L1, an immune checkpoint related molecule.

【 I – 2 】 Features

- Detects high sensitivity human PD-L1 with rapidly by a one-step sandwich method using solid phase anti-human-PD-L1 antibody and HRP conjugated anti-human-PD-L1 antibody. (Detection limit: 1pg / mL)
- No special equipment is required. Standard microplate reader capable of reading at 450nm will do the job.

【 I – 3 】 Kit Principle

This ELISA kit uses One-step Sandwich ELISA principle. The ELISA plate provided in this kit has been pre-coated with an anti-human PD-L1 antibody.

First, the sample is added into the wells of the ELISA plate with HRP conjugated anti-PD-L1 antibody and allowed to react. Next, after washing, substrate is added to the HRP conjugated anti-PD-L1 antibody reacted with PD-L1. Finally, HRP color development is read with a plate reader to quantify human PD-L1 in the sample.

【 I – 4 】 Kit Component

Storage temperature : 2 ~ 8 °C

	Reagent	Volume	Quantity
1	Anti-PD-L1 Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
2	PD-L1 Standard	100μL	1tube*
3	Assay Buffer	15mL	1vial
4	Washing Buffer (10X)	15mL	1vial
5	HRP Conjugated Anti-PD-L1 Antibody (250X)	20μL	1tube
6	Substrate Solution	12mL	1vial
7	Stop Solution (2N H ₂ SO ₄)	6mL	1vial
8	Plate Seals		1sheets

* Sufficient to create 3 standard curves with n=2.

Required Materials Not Included in the Kit

- Micropipettes (10 ~ 1000 μ L)
- Multichannel micropipette
- Multichannel micropipette Reservoir
- Plate shaker
- Microplate reader (enable to measure at wavelength 450nm)
- Plate washer

【Ⅱ】 Preparation of Reagents and Samples

【Ⅱ – 1】 Preparation of Washing Buffer(Prepare 2 wells for each assay)

- Dilute Washing Buffer (10 \times) to 10 folds with purified water.
e.g. For 1 plate, add 135 mL of purified water to 15mL of Washing Buffer (10 x) and mix well.

【Ⅱ – 2】 Preparation of Standard Protein solution

	Concentration (pg/mL)	PD-L1 Standard	Assay Buffer	Dilution factor
A	8000			
B	800	30 μ L of A	270 μ L	10
C	400	150 μ L of B	150 μ L	2
D	200	150 μ L of C	150 μ L	2
E	100	150 μ L of D	150 μ L	2
F	50	150 μ L of E	150 μ L	2
G	25	150 μ L of F	150 μ L	2
H	12.5	150 μ L of G	150 μ L	2

- To prepare Solution B, add 270 μ L of Assay Buffer into 30 μ L of PD-L1 Standard (Solution A), and then mix well (10 times dilution). To prepare Solution C, add 150 μ L of Assay Buffer into 150 μ L of Solution B, and then mix well (2 times dilution). Similarly, 2 times dilution series for Solution D through H should be prepared.
- Use 100 μ L for measurement, using 2 wells for each solution (n=2).

- Diluted PD-L1 Standard Solution(12.5~800 ng/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【Ⅱ-3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti-PD-L1 antibody (250x) to 250 folds using Assay Buffer.
e.g. For 1 plate, add 20μL of antibody (250x) into 5mL of Assay Buffer. Mix by inverting the tube.
- * Diluted antibody solution should be freshly prepared at each time before use.

【Ⅱ-4】 Preparation of Samples (For Blood samples)

Blood samples should be serum or plasma.

Samples generating absorbance values greater than that of the highest standard should be further diluted using Assay Buffer and reanalyzed.

【Ⅱ-5】 Preparation of Samples (For cell culture medium supernatant)

Centrifuge cell culture media at 2,000 x g for 10 minutes to remove debris. Collect supernatants and assay.

Samples generating absorbance values greater than that of the highest standard should be further diluted using Assay Buffer and reanalyzed.

【Ⅱ-6】 Sample Storage

Store un-diluted sample at -20 °C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

【Ⅲ】 Sample measurement procedure

1. Bring anti-PD-L1 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare PD-L1 Standard solution by serial dilution. (from step 【Ⅱ-2】)
3. Add 50μL each of serial diluted PD-L1 Standard solution (12.5~800 pg/mL) or Sample solution into the well.

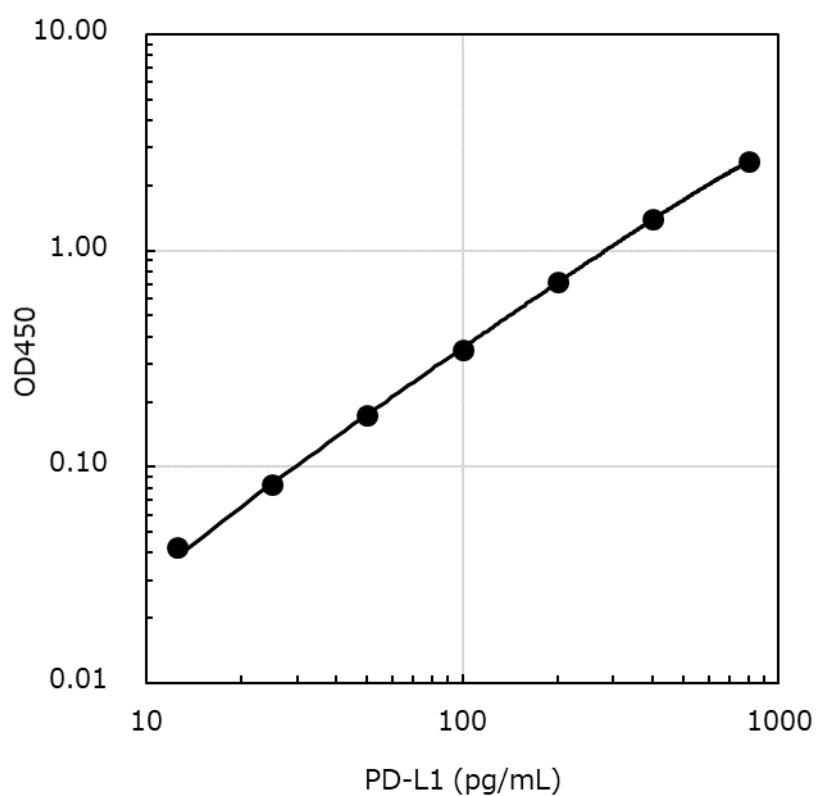
4. Furthermore, add 50 μ L each of diluted HRP conjugated anti-PD-L1 antibody (from step 【II-3】) to the well.
5. Seal the plate, and then shake in the plate shaker, and then shake it at 800 rpm for 30 sec.
6. Incubate at room temperature for 1 hour on a plate shaker set to 800 rpm, or for 2hours for static reaction.
7. Discard the reaction solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer(from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.
8. Add 100 μ L of Substrate Solution into each well, and then incubate at room temperature protected from light for 20min for static reaction.
9. Visually confirm the coloring, and then add 50 μ L each of Stop Solution.
10. Place into the Plate-reader, and read the absorbance of each well on a spectrophotometer at the wavelength of 450nm.
11. Create a standard curve by plotting the average blank control subtracted absorbance value for each PD-L1 Standard concentration (y axis) against the PD-L1 Standard concentration (x axis).
12. Determine the concentration of the target protein in the sample by interpolating the blank control subtracted absorbance values against the standard curve. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, if used, to obtain the concentration of PD-L1 in the sample.

【IV】 Measurement example

【IV- 1】 Standard curve

As an example, the graph of absorbance (OD450) against standard PD-L1 concentration is drawn as shown in Figure 1.

However, draw a new standard curve for each assay to calculate the concentration in the sample.



PD-L1 (pg/mL)	Absorbance (450nm)		Average	Calculated value (pg/mL)
	1	2		
0	0.066	0.068	0.067	
12.5	0.106	0.113	0.110	
25	0.15	0.151	0.151	
50	0.239	0.240	0.240	
100	0.421	0.407	0.414	
200	0.789	0.783	0.786	
400	1.460	1.462	1.461	
800	2.690	2.595	2.643	
Serum sample	0.719	0.714	0.717	179.2

Fig.1 Standard curve and measured values

【IV-2】 Detection limit

The detection limit⁷⁾ calculated from the standard deviation of the blank absorbance and the slope of the standard curve was 1 pg/mL.

【IV-3】 Recovery (Serum, Plasma)

Three concentrations of PD-L1 were spiked to evaluate signal recovery in the working range of the assay.

Table 1 Recovery of each sample

Sample	Recovery (%)	
	Average	Range
Serum	94%	92-99%
Plasma	91%	88-93%

【Reference】

- 1) H. Dong, S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, L. Chen: *Nat Med.*, **8**, 793 (2002).
- 2) L. Chen, X. Han: *J Clin Invest.*, **125**, 3384(2015).
- 3) S. L. Topalian, F. S. Hodi, J. R. Brahmer, et al.: *N Engl J Med.*, **366**, 2443 (2012).
- 4) J. R. Brahmer, S. S. Tykodi, L. Q. Chow, et al.: *N Engl J Med.*, **366**, 2455 (2012).
- 5) B. Gong, K. Kiyotani, S. Sakata, et al.: *J Exp Med.*, 216, 982 (2019).
- 6) X. Zhu, J. Lang: *Oncotarget*, 8, 97671 (2017).
- 7) Notification No.338 issued by the Director of Evaluation and Licensing Division, Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Pharmaceutical and Medical Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare, September 28, 1997.