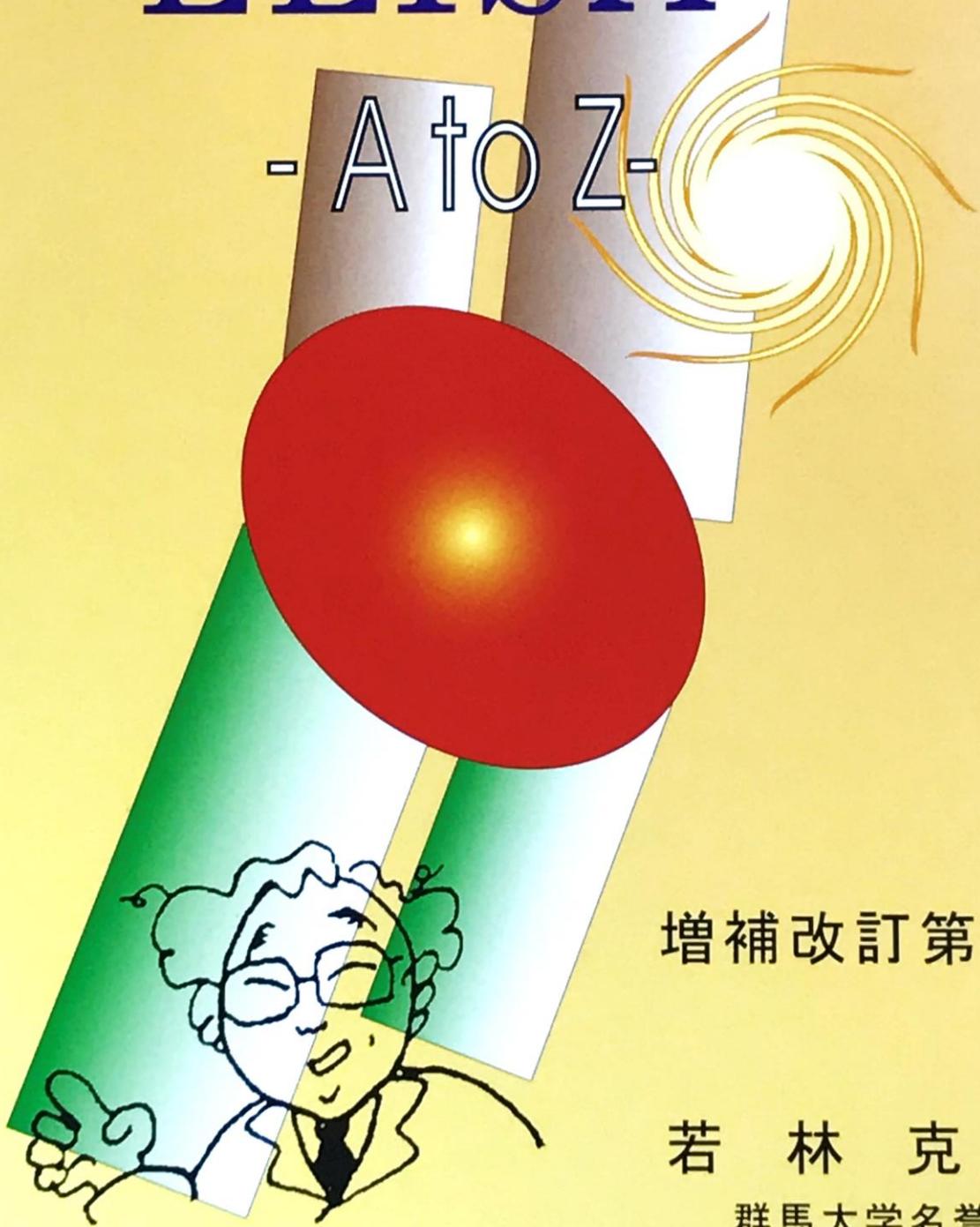


ELISA

- A to Z -



增補改訂第5版

若林克己

群馬大学名誉教授

ELISA — A to Z —

目 次

序論—イムノアッセイについて—

A. 測定とは何か	1
定性的検出、定量的測定、絶対量の測定と相対量の測定、 標準物質(標準品)について	
B. 測定法の評価	3
診断マーカーとしての有用性から見た検討と評価 正しくかつ精密に測定できるかどうかという性能を検討、評価する	
C. 免疫学的測定法とは何か?	5
抗体とは何か? 免疫学的測定法の歴史 どのような種類の測定法があるのか?	
D. 免疫学的測定は有用か?	16
特徴と問題点 免疫学的測定法のライバルは?	

I. ELISA 入門

21

ELISA では抗体をどう利用するのか?
シバヤギキットで使用している酵素と色原性基質
最後のステップ—吸光度の測定

II. ELISA の実技

A. シバヤギ製キット操作法の手ほどき	25
1. プレート, 標準液, 試料溶液, 試薬溶液は室温に戻してから添加・分注	
2. 試薬溶液の調製法	
3. 抗体固相化プレートの構造と使用方法について	
4. プレートの洗浄法	
5. 標準液と試料の採取と加え方 ピペットの許容される誤差について、「プレウェットティング」法、「共洗い」法	
6. 試薬溶液の加え方 マルチペットの使い方	
7. 攪拌操作	
8. プレート・リーダーと吸光度測定	
9. 1 試料 1 ウェルではなぜいけないのか?	
10. キット使用上の全般的注意事項	
B. ピペットの種類と注意事項	38
プランジャー往復—空気介在型、プランジャー漸進型、 プランジャー往復—空気不介在型、ピペットの繰り返し精度のテスト、 その他ピペット操作で注意したいこと	
C. ピペットの精度と測定精度との関係	44
—ELISA が有利な理由—	
D. 使用済み試薬等の処理方法	45

III. もっと ELISA

A. 誤差について	47
偶然誤差あるいは確率誤差、系統誤差、ひどい誤り ELISA の各過程について偶然誤差（バラツキ）の生じる要因を考える 系統誤差：偏りについて—なぜ偏った測定値が出るのか	
B. 求められる分析法バリデーション項目	49
C. ELISA での検量線と測定値の計算	50
1. ELISA の指標	
2. ELISA では測定値をどう計算するか マニュアル計算、回帰曲線による計算機処理、回帰と計算の具体例 EXCEL による ELISA 計算	
3. 検量線の吟味	
4. ELISA の吸光度のバラツキは測定値にどう反映するか	
5. 結合量と検量線のシミュレーション	
D. 精度（precision）に関するパラメータと計算	72
1. 併行精度（repeatability）と室内再現精度（intermediate precision）の計算	
2. 室間再現精度（reproducibility）	
E. 真度（accuracy, trueness）を評価する試験法の実際	77
1. 希釈試験（特に血液成分の影響の有無）（dilution linearity test）	
2. 添加回収試験（recovery test, spike recovery test）	
3. 他のアッセイ系との相関性試験	
F. 測定試料の安定性	80
G. 測定系の頑健性（robustness）	83
H. 精度管理 —管理図による毎回のアッセイの評価	84
I. ELISA の performance を改善する	86
1. 試料の繰り返しの数と測定平均値の信頼性について	
2. エッジ現象とその対策	
3. 試料中の血液成分の影響と対策	
4. 血液試料の pH について	
5. ピペットとピペッティングで注意すること	
6. 試料とキットの適合性テストについて	
7. Blank の非特異的吸着による吸光度の増大を洗浄法の改善で低下させる	
8. ELISA 施行上の留意事項のまとめ	
9. 技能検定で腕を磨く	

IV. 付録

付録 1：血液試料の採取法	93
血清試料の採取法、血漿試料の採取法	
付録 2：ペプチド溶液、試薬溶液の調製に関してあれこれ	94
ペプチド・タンパク質の保存・秤量と溶液の調製、 保存法、秤量と溶解、ペプチドやタンパク質が溶けない場合 緩衝液などの調製、結晶水にご注意！ 古い重曹は重曹ではない pH メータについて、電極のゴム栓を外せ！ pH 基準緩衝液をけちるな！	
もっと詳しく知りたい人のために	98
日英術語対照表及び索引	100

ELISA – A to Z –

序論 – イムノアッセイについて –



A. 測定とは何か

1. 定性的検出：最も手軽な方法で、あるかないかを判定する

この場合、+または-で結果を表現します。従って結果を統計処理するときには出現率の検定程度になってしまい、情報量からいえば極めて不十分です。

2. 定量的測定：絶対量、相対量、活性値など数量的に表現できるようにする

この場合、「ある」、「ない」以外に「どれくらいあるか」という情報が加わります。

これによって多くの統計処理が可能となり、様々な面からの評価が可能となります。

Measurement：広い意味で「寸法、大きさ、広さ、長さ、厚さ、深さ、量」などを測ること、または測って得られた数値。

Assay：もともとの意味は

- 1 鉱石を 試金する。金銀などの含有量を調べる。
- 2 …を 分析（評価）する。分析の結果 …の 含有量を示す。
試金、分析評価、分析物、試金物、（試金）分析表
などです。

医学・生物学・化学的には、Dorland の Medical Dictionary によれば、

Determination of the purity of a substance or the amount of any particular constituent of a mixture.

すなわち、「混合物に含まれる或る特定の物質の量または純度を決定すること」を意味します。これには物質の単離法を加えるか、あるいは測定系の特異性が高いことが要求されます。

3. 絶対量の測定と相対量の測定

絶対量とは、「その事物に固有の量（広辞苑）」というはっきりしない定義がありますが、ここでは、例えばグラムで表現できる質量などと考えておきましょう。グラムと言えば誰もが重さを想像できますから。

測定対象の物質をグラム(mg、 μ g、ng)などで示したいのがアッセイの目的なのですが、そうは行かないこともあります。

例えば、「力価」(potency)とか「活性値」(activity)あるいは「単位」(unit)で表現しなければならない場合も出て来ます。これらをここでは相対量と呼ぶことにします。これらは定義が無ければ全く何のことか分かりません。

絶対量で表現できるもの：例えばステロイド、甲状腺ホルモン、ヒスタミンのような小分子物質は 100%純粋なものが入手できるので、生物活性が安定しているものは重さ（正確には質量というべきだが）で表現することが可能であるし、安心していられます。

相対的にしか表現できないもの：例えば蛋白ホルモンとか酵素のような大分子物質は 100%純粋なものが入手困難でありました。最近は大分子物質でも合成品や精製品が手に入る場合があります。重さで表現されることもあります。しかし、そのような物質が生理活性を持っていて、力価の異なる分子種が存在するような場合、しかも不活性化の可能性のある場合には、重さで表現しても余り意味が無いことがわかるでしょう。このような場合には生理活性を単位として表現するのがむしろ当を得ています。また抗体なども抗原との結合を指標として測定すると重さではなく活性値とか力価（単位重量あたりの活性値）で表現せざるを得ません。

注意事項

“mole” と “M” について

非常にしばしば取り違えることの多い単位で、充分注意が必要です。

mole (モル, 記号は mol) : **重さの単位**です。グラム分子といわれ、分子量にグラムをつけた量を言います。例えば A という物質の分子量が 350 であるとすれば、この物質の 1 mole は 350g です。1 mole の中にはその物質の分子が 6.022045×10^{23} 個（これを Avogadro 数、Avogadro number といいます）の分子が含まれている。言い換えれば、ある物質 6.022045×10^{23} 個の分子の重さが 1mole なのです。

M(molarity) : **濃度の単位**です。1 リットルの溶液の中に 1 mole の物質が溶けている濃度です。すなわち、1 mol/l で、1 リットルの溶媒に 1 mole を溶かすものではありません！念のため。間違えて molality と書くと、これは重量モル濃度、すなわち 1 kg の溶媒に溶けている溶質のモル数、mol/kg の意味になってしまうのだそうです。

測定分野では、nM、pM、fM、aM などが通常使用されます。

ちなみに、n= 10^{-9} (ナノ)、 p= 10^{-12} (ピコ)、 f= 10^{-15} (フェムト)、 a= 10^{-18} (アット) を意味します。

測定値の表現について

アッセイの測定結果の表し方には 2 種類あります。重さと濃度です。

重さで表現する場合：測定に用いたチューブ(tube)、またはウェル(well)当りの標準品の重さまたは単位。例えば、ng/tube、ng/well とか mU/tube、mU/well などです。

濃度で表現する場合：測定試料 ml または dl に含まれる標準品の重さ、または単位。例えば、pg/ml、ng/dl などです。

これを取り違えると大変な間違いを起こすことになります。仮に試料を 100 μ l 使って測定した場合、pg/ml で表わすと、pg/well の 10 倍の数値となります。

検量線の横軸に記されている表現のしかたに充分注意すべきです。

4. 標準物質（標準品）について

相対的にしか表現できないものを表現するには、適当な基準を設けて、それを [単位] として物差しに使わざるを得ません。ホルモンなどにはこの例が多いのです。

「単位(U)」はある一定の生物活性を 1 U として決めて行く場合と、国際機関(例えば WHO) が一定の標準品を作って、その力価を mg 当り何単位と決めて配布する場合があります。例えば NIH-LH-S1、NIH-FSH-S1 などは 1 mg を以って 1 NIH-U としています。

生物活性を基にしている単位の決め方は、例えば PTH では、体重 8-16kg のイヌに 16-18 時間以内に血中 Ca 値 1mg/dl の上昇をもたらす量を 100 USP ユニットと決めています。カルシトニンでは、体重 100g の絶食雄ラットに静注して 1 時間後に血漿 Ca 値を 10% 低下させる量を 10MRCmU と定義しています。

いずれにしても実際には入手した国際標準品を自分の試料と比較することで測定値を計算する事になる訳です。



B. 測定法の評価

測定法は二つの面から評価されます。

ひとつは測定系の有用性から見た評価で、特に臨床的に応用されることを目的とする場合には、その評価はキットの売れ行きに影響するので、作成者側からは重要な問題といえるでしょう。

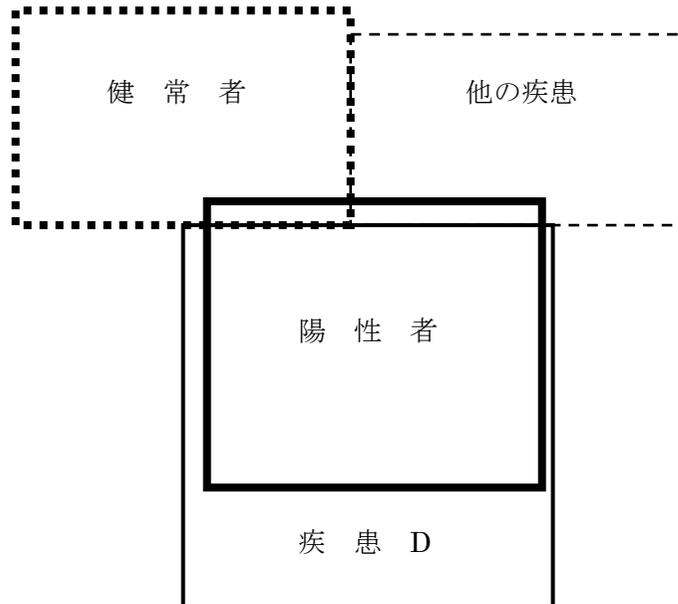
もう一つはキットそのものの性能、すなわち目的とする物質を正確、かつ精密に測定できるかどうかという面から評価されるのです。

1. 診断マーカーとしての有用性から見た検討と評価

測定法がその目的とする意図に沿っているかどうか、例えばある疾患の臨床診断に用いようとする場合、診断法としての有用性から判定します。

「D」疾患の診断を例にとりますと。「D」と「正常者あるいは他の疾患」を考えて

アッセイの有用性



感度：「D」の患者の何パーセントが陽性に検出されるか？（陽性の定義も重要）

陽性とは、定性的な検出反応なら、検出される反応があったこと。

定量的な測定なら、カットオフ値(Cut-off Value)以上の測定値（通常正常者の平均値+2（場合によっては3）SDを高値の、平均値-2（場合によっては3）SDを低値のカットオフ値とする事が多い）

SD：標準偏差値

（試料数が非常に多い場合には平均値±2 SD の範囲には全体の約 95%が含まれるからです）

特異性：陽性者の何パーセントが「D」の患者であるか？

○ここで述べられている感度と特異性は測定法の性能の項で述べられている感度・特異性とは異なる定義であるので注意して下さい。

感度、特異性が共に高い→有用性が高い

ということになります。

2. 正しくかつ精密に測定できるかどうかという性能を検討、評価する

正しく精密な測定とは上記の有用性とは関係なく、測定しようとする物質だけを、試料中の重さあるいは濃度として高い信頼性で決定できるかどうかという性能のことです。

性能の評価のことはバリデート(validate)とかバリデーション(validation)とか言われ、その

テストを行うことを Validity test と言っています。

どのような評価法が必要かは、国際的な合意事項として、ICH(International Conference of Harmonization, 日米 EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議)、や第 14, 15 改正日本薬局方の参考情報、厚生労働省からの通達(医薬審第 338 号)などで示されています。その内容やアッセイバリデーションに関しては別項で詳述します。



C. 免疫学的測定法とは何か？

免疫学的測定法(Immunoassay)とは、強い親和性と良好な特異性を持つ抗体を結合試薬として利用した測定法です。

1. 抗体とは何か？

抗体 (antibody) は異物である抗原 (antigen) が体内に入ることによって免疫反応を起こし、形成されるタンパク質で抗原と特異的に結合する性質を持つものの総称です。

抗体はタンパク質としてはイムノグロブリン(Ig)に属します。

(抗体のほか、正常γグロブリン、骨髄腫タンパク質、J鎖等も含まれる)

イムノグロブリンには G(IgG)、M(IgM)、A(IgA)、D(IgD)、E(IgE)、のクラスがあります。

IgG の基本構造：H 鎖 (MW 5-7 万) と L 鎖 (2.3 万) から構成されます。

基本的には H 鎖 2 本、L 鎖 2 本からなります。

H 鎖はクラスごとに特徴的構造を持ち、 γ (IgG)、 μ (IgM)、 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE) の 5 種があります。

L 鎖にも λ 、 κ があります。

定常部と可変部

可変部：H鎖、L鎖のN末端部分は同種動物の同一クラスでもアミノ酸配列が一定しない (V_L、V_H)・・・抗原との結合部

定常部：可変部以外の部分はクラスやサブクラスで一定したアミノ酸配列を持つ(C_L、C_H)
分子量は IgG で約 15 万、IgA (基本構造の 2 量体+J 鎖で約 39 万)、IgD (17・20 万)、IgE (約 19 万)、IgM (基本構造の 5 量体+J 鎖で約 90 万)。

註) J 鎖：IgA、IgM を構成するポリペプチド鎖、分子量 1.5 万。

基本分子の重合体を形成するのに役立つ鎖。

抗原とは何か？

抗原とは、抗体を作る性質(immunogenicity)があり、かつ抗体と特異的に結合する性質

(specific binding)を持つ物質を言います。

ハプテン(hapten)：抗体とは結合するが抗体を作らないものです（小分子物質）。

モノクローナル抗体（単クローン性抗体）とポリクローナル抗体（多クローン性抗体）

通常の免疫法で作られ抗体は、それを産生する細胞が全く同一ではないために、可変部の構造が一定していないので、抗原に対する認識場所や親和性などに多様性があり、そのような抗体の集合となっています。これをポリクローナル抗体と言っています。

ポリクローナル抗体は抗原のさまざまな場所に結合するため、抗原認識部位が特定できず、他の構造類似の抗原との結合の可能性もあって、特異性の面では難点があります。一方、見かけの親和性が高くなるというボーナス効果があり、抗体過剰領域では大分子集合体を形成することによって沈降反応を起こします。

これに対して、単クローンの抗体産生細胞が作り出す抗体は一次構造が均一であり、抗原を認識する場所が一定しています。従って明確な特異性を持つ結合試薬として使用することができます。ただし、抗体過剰領域でも沈降反応を起こしません。

親和性も一般に高くありません。

抗体を作り出すには？

ポリクローナル抗体

抗体をつくるには、ある動物の抗原を異種動物に免疫補助剤と共に投与して免疫します。

ハプテン性の物質の場合には、高分子物質をキャリア（担体）として結合させ、免疫します。抗原の一部のアミノ酸配列をキャリアに結合、免疫する場合があります。

免疫法には、免疫補助剤（アジュバント）と共に皮内多数個所に繰り返し投与する方法や、リンパ節に直接投与する方法などがあります。

免疫を行うと、一次免疫応答（生体が初めて抗原に接した時の反応）では主として IgM クラスが産生されます。

二次免疫応答（一次免疫応答の後、同じ抗原に再び接した時の反応。免疫記憶（註）が生じているため応答速度は速く、血中抗体価も著しく上昇する）では主として IgG クラスが産生されます（クラススイッチといわれる）。

註：免疫記憶とは一次免疫によって寿命の長い特異的 T 及び B 細胞クローンが増加することによる。

モノクローナル抗体

単一なクローンの抗体産生細胞を得るために、マウスなどをまず免疫し、その動物の脾臓か

ら抗体産生細胞を取り出し、培養系に持ちこんで、骨髄腫細胞（ミエロマ細胞）と融合させてから、細胞（ハイブリドーマ）が 1 ウェル当たり 1 個となるように希釈して培養を続け（クローン化）、培養液に分泌された抗体の性質を調べて望むような抗体を産生する細胞のみに絞り、増殖させ、マウスの腹腔内に移植して更に増殖させることにより腹水中に分泌された抗体を収穫します。腫瘍細胞の増殖性と抗体産生細胞の機能とを併せ持ったハイブリドーマ（雑種腫瘍細胞）を巧みに利用することで可能となったものです。

抗体をどう利用するのか？

免疫学的測定法では、抗体は特異性の高い結合試薬として使用します。

抗体は一般的には単離・精製せずに抗血清のまま、あるいは IgG 分画として使用します。

特異性が高いので敢えて精製する必要はあまりないのです。

抗体は溶液状態で使用したり、あるいは試験管やウェルの表面に吸着させ(coating)、測定対象物質である抗原を捉えるもの（キャプチャー抗体、固相化抗体）として使用します。この場合には固相化する抗体の量を増やすために抗体の精製が行われます。

更に非競合的測定系では酵素やビオチンなどで標識して、キャプチャー抗体に結合した抗原量を測定するのに用いられます。

2. 免疫学的測定法の歴史

免疫学的結合反応、沈降反応などを利用して物質を測定する方法は古くからありました。

例えば単純には抗体価の測定法として抗体と抗原の溶液の界面における沈降反応を利用した方法や、寒天板での拡散沈降反応（オクタロニー・テスト）、半定量的には赤血球凝集反応とか、ラテックス凝集反応、補体結合反応などです。

定量性を特徴とする免疫学的測定法は、S. A. Berson と R. S. Yalow のラジオイムノアッセイ (Radioimmunoassay, RIA) に始まり、次の 2 論文がその殆ど全てを示しています。

1) Insulin- I^{131} metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subject.

Berson, S. A., Yalow, R. S., Bauman, A., Rothchild, M. A. and Newerly, K.

J. Clin. Invest. 35, 170-190, 1956

糖尿病患者の血液中でインスリンが分解されることが糖尿病の原因ではないかという仮説を検討するために放射性ヨードでインスリンを標識して患者の血清とインキュベートすると、ろ紙電気泳動における標識インスリンの位置が移動することから始まって、インスリンと糖尿病患者の血中にあるインスリン抗体との結合を検討することになった論文です。

当時インスリンのようなホルモンには抗体はできないものであると考えられていたため表題のように「インスリン抗体」の代わりに「インスリン結合グロブリン」という表現をせざるを得なかったといういわく付きのものです。(糖尿病の患者は長期間のブタインスリンによる治療を受けていたため、インスリン抗体が出来ていたのです。)一定量の標識インスリンに患者の血清を加え、それに非標識のインスリンを加えると、抗体と結合する標識インスリンの量が非標識インスリンの量に応じて減少すると言う競合的結合原理をはじめて明らかにしたもので、これが RIA の確立につながったのです。面白い逸話があります。

...we studied the metabolism of ^{131}I -labeled insulin in diabetes and made the discovery that virtually all insulin-treated diabetics had insulin-binding antibodies.

Our attempts to disseminate this information may be of some interest. The first journal to which we submitted the paper rejected it after many months with a comment by a referee to the effect that everyone knows that insulin does not make antibodies. We were able, however, to present the work before the Society of Nuclear Medicine at its first annual meeting in Portland, Oregon in June, 1955. after which the Seattle group under Robert Williams provided confirmation. (Yalow の文章 In “Principles of Competitive Protein-Binding Assays”, Ed. Odell & Daughaday, J.B.Lippincott Co., pp.1-21, 1971)

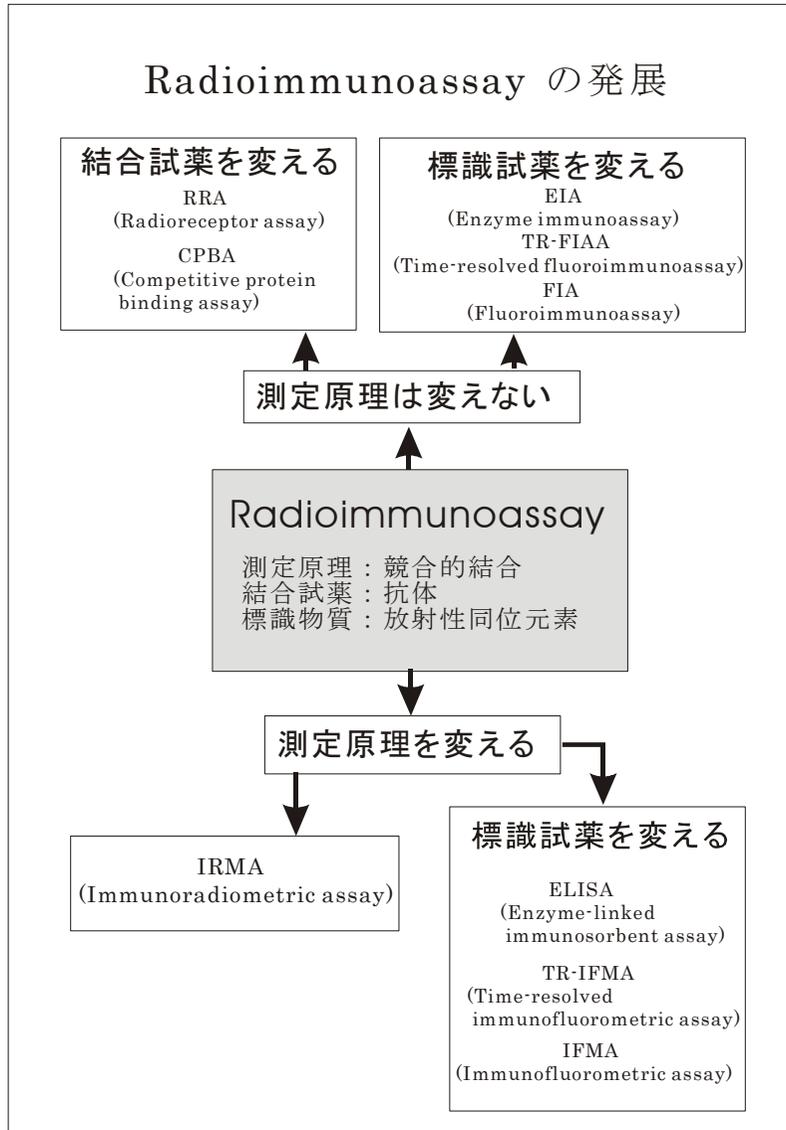
2)Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody.

Berson, S. A. and Yalow, R. S.

J. Clin. Invest. 38, 1996-2016, 1959

RIA を理論的に確立した論文です。

RIA はその後様々なホルモンに応用され、研究上はもとより臨床的にも広く使用されるようになりました。その理由は、RIA の測定感度が非常に良好で、それまで不可能であったホルモンの血中濃度を測定するのに適していたからです。このため RIA の利用は内分泌学の研究に飛躍的發展をもたらすと共に、臨床診断の面でも大きな貢献をすることになり、Yalow はノーベル賞を受賞しました。臨床診断への応用は、企業的にも大きな興味を引き、様々な測定キットが売り出されるようになりました。RIA は、標識物質、結合試薬、測定原理を検討することで多くのヴァリエーションを生み出す可能性を持っていました。そのため、図“Radioimmunoassay の発展”に示すように、今日の多様な測定法が考え出されたのです。



3. どのような種類の測定法があるのか？

測定原理による分類

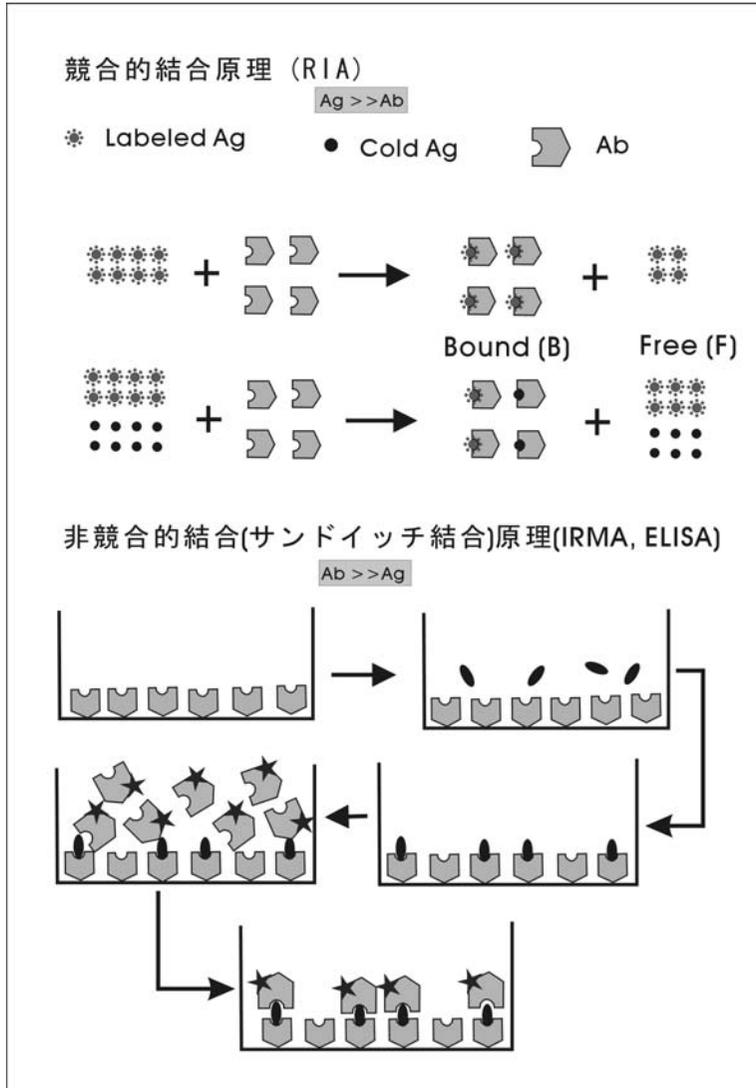
●競合的結合原理によるもの(Competitive assays)

一定量(少量)の抗体に対して標識物質と非標識物質とが競合的に結合することを利用して測定します。反応系に標識抗原のみを加えれば抗体に結合するものはすべて標識抗原です。

これに非標識抗原を加えるとその量に応じて(図では 1:1)抗体と結合する標識抗原の量は減少して行きます。検量線は双曲線タイプになります。

●非競合的結合によるもの(Non-competitive assays)

固相化した充分量のキャプチャー抗体で測定対象物質を捉え、それを標識した抗体で認識させる、いわゆるサンドイッチ結合により測定するものです。



***測定原理と検量線 (標準曲線、Standard curve)**

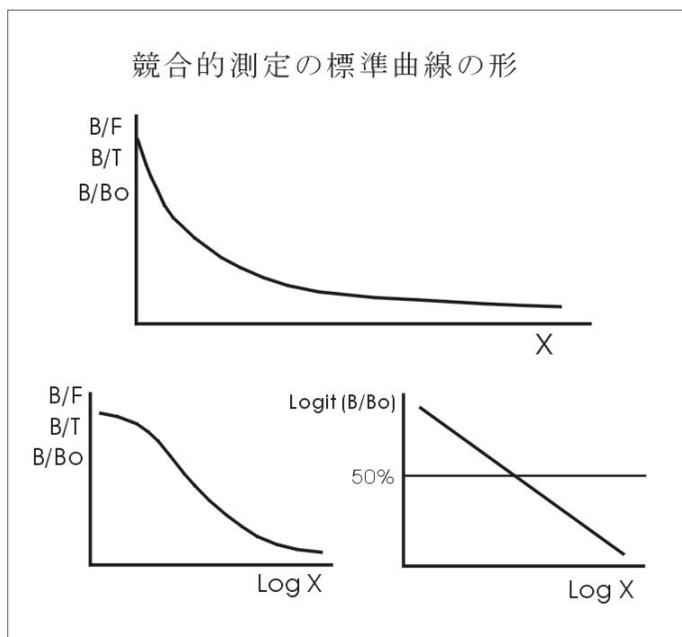
通常、測定の際には、標準物質を用いて検量線を描き、試料の反応結果を照合することで測定値を計算するのですが、検量線は測定原理によって異なる形をとります。

競合的測定原理による測定系の場合

○横軸に標準品濃度をとった場合には、双曲線型となります。

(初期の頃用いられたもので、今日ではほとんど用いられません)

○横軸に標準品濃度の対数をとった場合には、逆シグモイド曲線型になります。



この場合縦軸には B/F、B/T、B/Bo などが使用されます。

F : ある濃度の標準品の存在下で遊離している標識物質

B : ある濃度の標準品の存在下で抗体と結合した標識物質

Bo : 標準品が存在しない時に抗体と結合した標識物質

○横軸に標準品濃度の対数をとって、縦軸に B/Bo の Logit をとった場合には右下がりの直線に近い検量線が得られます (よく用いられる)。

$$\text{logit } B/Bo = \ln \left\{ \frac{B/Bo}{1-B/Bo} \right\}$$

B/Bo をパーセント表示した場合は、1 の代わりに 100 を用いる。

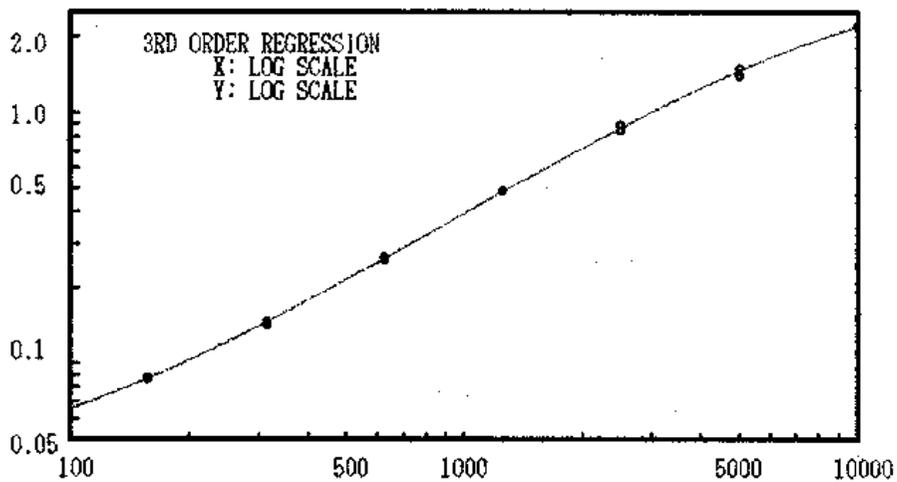
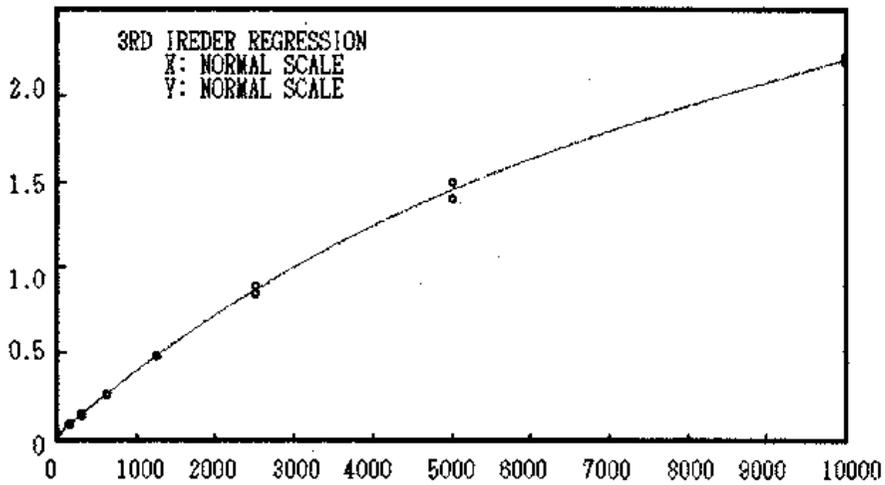
$$\text{logit}(B/Bo) = \ln \left\{ \frac{B/Bo}{100-(B/Bo)} \right\}$$

非競合的結合原理による測定系の場合

○ELISA の場合横軸に標準品の濃度の対数、縦軸に吸光度(absorbance)をとると右上がりの緩い曲線が得られます。測定範囲を絞ると直線に近くなります。

○縦軸に吸光度の対数をとると直線に近いシグモイドカーブが得られます。

ELISA の検量線



ELISA については後に「ELISA 入門」の項以後で詳しく述べますが、検量線は縦軸に酵素反応の結果として生じる呈色の吸光度をとることになります。この際、吸光度の対数を使用すると上のような緩いシグモイドカーブとなります。

反応系による分類

●均一系による測定(Homogeneous assays)

測定が終始溶液状態で行なわれる測定系を言います。

●不均一系による測定(Heterogeneous assays)

固相化された抗体などを用いて反応、洗浄が行なわれる測定系を言います。

動物種に関する分類

動物種が問題となるのは分子量の大きなタンパク質のような場合、アミノ酸配列に種特異性があり、抗体がそれを認識してしまうためです。ハプテン性の小分子物質の場合には（例えば cAMP とかステロイドホルモンなど）動物種による違いがないので問題を生じません。

●Homologous Assay：同じ動物種の測定系、例えばヒトの試料を、ヒトのインスリンを標準品として、ヒトのインスリンに対する抗体を使って測る系を言います。正統派です。

●Heterologous Assay：ある動物種のための測定系を別種の動物に使う系です。種特異性のために高分子物質の場合、成功しないことが多いが、種が近い場合には使用できることがあります。例えばウシとヤギ、ラットとマウス（全て可能というわけではないが）サンドイッチ結合原理による測定の場合には競合的結合原理の場合よりも成功する率は高くなります。

●Hetero-antibody Assay：RIA のような競合的測定の場合、heterologous assay が成功しないとき、標識物質と標準品は homologous なものを使用し、抗体は heterologous なものを高濃度で使用すると成功することが多いのです。

(Iwasawa, A. et al. Endocrinol. Japon 38, 673-683, 1991)

注意！：Homogeneous（均一の意味で用いる）

Homologous（動物種が同じであること）。

Heterogeneous（不均一）

Heterologous（動物種が異なること）

標識物質による分類： 図 “Immunoassays” 参照

●放射性同位元素

使用される放射性同位元素(Radioisotope, RI)は感度の点から半減期の短いものが良く、¹²⁵I（半減期 60 日）が最も良く使用されます。¹³¹I（半減期 8 日）も使用できるが、半減期が短いため研究室での標識のみで、商業的には使用されません。ヨードは酸化すると親電子試薬としてタンパク質中のチロシンやヒスチジンと容易に結合するので、タンパク質の標識に便利なのです。トリチウム(³H)は合成の際分子内に組み込んで使用されるので小分子物質標識に向いています。半減期が 12 年と長いので出来るだけ多くのトリチウムを組み込んで測定感度が上がるようにする必要があります。

Immunoassays

Competitive assays (競合的測定法)		Non-competitive assays (非競合的測定法)	
RIA	Radioisotopes (放射性同位元素標識)	IRMA	
EIA	Enzymes (酵素標識)	ELISA	
TR-FIA	Lanthanide(EU, Sm) (ランタニド元素標識)	TR-IFMA	
FIA	Fluorescent substances (蛍光物質標識)	IFMA	
LIA	Luminescent substances (発光物質標識)	ILMA	

ここではRIA、IRMAに倣って、競合的測定法にはIA、非競合的測定法にはMAという接尾語をつけて統一しているが、全てが合意されている訳ではない。

放射性同位元素を用いることの難点は、その使用がRI施設内に限定されていること、放射性廃棄物の処理に関する規則が厳しいことです。測定を行うことで受ける放射線の外部被曝は全く問題とするに足らぬ量です。半減期60日のヨード125は20ヶ月で1000分の1に減少するにもかかわらず、厳しい規制が行なわれています。

Radioimmunoassay (RIA)、

RIで抗原を標識し、競合的結合原理を利用して測定を行う系です。

Immunoradiometric assay (IRMA)

RIで抗体を標識したサンドイッチ結合原理により測定するものです。

●酵素

酵素としては、 β -グルクロニダーゼやペルオキシダーゼがよく用いられ、最終的には色原

性基質(chromogenic substrate)を用いて発色に持って行き、比色定量します。蛍光を発するようになる基質(例えば4-メチルウンベリフェリルβ-D-ガラクトサイド、2-ニトロフェニルβ-D-ガラクトサイドなど)も蛍光測定が鋭敏なためよく用いられます。

酵素はその分子量が大きいことから、抗原抗体反応に影響の出る場合があります。しかし、成功した場合には放射性同位元素による測定よりも概して優れた感度を示します。

Enzyme immunoassay (EIA)

酵素を利用した競合的結合原理による測定法です。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISAは抗原を固相化して抗体を検出・測定するのにも用いられます。

ELISAは広く用いられているので後で詳しく解説します。

●蛍光物質

Fluoroimmunoassay (FIA)

紫外線を照射すると蛍光を発する物質つまり蛍光物質で標識した抗原を用いる競合測定で、最初に導入された蛍光物はFITC(fluorescein isothiocyanate)でした。Isothiocyanateの部分がタンパク質のアミノ基に結合します。照射すべき紫外線は励起光と呼ばれその波長は蛍光物質によって異なります。

Immunofluorometric assay (IFMA)

抗体を蛍光物質で標識してサンドイッチ結合で測定するものです。

●ランタニド元素

Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA)

ランタニド(Lanthanides)は周期律表の欄外に別枠でまとめられている原子番号57から71までの元素のことです。これらの元素はある条件下で蛍光を発します。例えば、現在主として使用されている63番のユーロピウム(Eu)のキレートは励起光340nmを受けて615nmの蛍光を発します。両者の波長の差(ストークスシフト)が大きく、蛍光が長波長であることから励起光の影響を受けにくく、また蛍光寿命が非常に長いため、蛍光測定を励起光の照射後一定の時間が経ってから行うことで共存物質の蛍光が消滅してから測定することが出来ます。これを時間分解蛍光測定(time-resolved fluorometry)と言っており、TR-FIAの由来となっています。この測定法はDELFI(Dissociation-enhanced lanthanide fluorometric immunoassay)とも呼ばれていますが、これは登録商標です。

タンパク標識用のEu-キレートで標識を行い、最終の蛍光測定には酸性下にEuをキレートから遊離させ、界面活性剤のミセルに包み込んで別途のキレートを形成させ、励起光を

照射することで発光させます。「Dissociation-enhanced」の表現はこのことに由来しているのです。

●発光物質

Luminescence immunoassay

化学発光物質で標識する測定法で、ルミノールとかアクリジニウムエステルが使用されます。また生物発光に関係する物質で標識して酵素的生物発光に持ちこむもの、あるいは酵素で標識して化学発光物質となる基質を使う方法もあります。

●スピン試薬

Spin-immunoassay

ピペリジン-N-オキシド誘導体、ピロリジン-N-オキシド誘導体、オキサゾリジン-N-オキシド誘導体のようなフリーラジカルで標識して、エレクトロン・スピン・レゾナンス (ESR、註) スペクトルの変化を指標として測定する方法です。

註) **ESR** : 電子は $1/2$ のスピンを持つため、これに磁場を掛けるとスピンは磁場に平行な状態と反平行な状態にわかれる。この二つの状態の差のエネルギーに相当するエネルギー量子をもつ電磁波を加えるとスピン状態の反転がおこる現象。フリーラジカルは奇数個の電子を持つので不対電子が存在し、正味の $1/2$ のスピンを持つ。

その他標識物質としてはまだいろいろあるのですが、実用面からここでは省略します。



D. 免疫学的測定は有用か？

1. 特徴と問題点

免疫学的測定法は特異性の優れた、親和性の高い抗体を結合試薬として使用しているため、以下のような長所を持っています。

- 測定感度が良好である。
- 測定対象物質に対する特異性が優れている。
- 一般的に測定精度が高い。
- 操作が簡単で費用が安い。
- 一度に多数の試料を扱える。

●問題点

免疫学的測定法は、歴史的に生理活性物質の測定に使用されたことから始まり、身体成分、薬物やその代謝物、食品添加物や遺伝子操作農産物、環境汚染物質などに拡大されて行きました。

免疫学的測定法で最も問題となるのは、結合試薬として抗体を用いていることに由来する特異性の問題です。特に生理活性物質の場合、免疫学的測定法の測定結果が生理活性を反映しないことがあるという点です。なぜでしょう？

抗原分子における **antigenic determinant** (抗体を作らせる部分、**epitope**) は生理活性を発現する部分 **bioactive site** とは通常一致しません。**Bioactive site** とは、生理活性を持つ抗原が受容体と結合する場所や作用を発現する場所を指しています。

抗体は、免疫された動物が異物と認識する場所に対してつくられます。

つまり、種特異性の高いところが認識されやすいのです。

一方、生理活性はさまざまな動物種で共通していることが多く、生理活性発現部分は種特異性が低いところなのです。

例：インスリン

インスリンはプロインスリンという 1 本鎖のペプチドがジスルフィドボンドで折れ曲がり、中間部分が切り離されて出来るので、一見 2 本のペプチド鎖が結合して出来ているように見える。切り離される中間部分はコネクティング・ペプチド(CP)と呼ばれるが、CP のアミノ酸配列は動物種による違いが大きい。一方、インスリン本体の部分は種差がほとんど無い。インスリン本体に突然変異が起これるとその動物は生存できなくなる可能性が大きく、そのためインスリン本体のアミノ酸配列は進化の過程で保存され易くなる。哺乳類ではモルモットだけが他の動物のインスリンとかなり構造が異なっており、従ってインスリンの抗体はモルモットで作られることが多い。

●Antigenic determinant と bioactive site が異なると、どういうことになるのか？

測定対象物質が分子的にただ一種類しかなくて、標準品と測定試料中の物質とが同一の分子構造を持っている場合には全く問題は無いのですが、標準品と試料中の物質の分子構造が異なるような場合には問題を生じます。そのようなことが実際にあるのでしょうか？

代謝的面から

生理活性物質の役目は、メッセージを標的器官の細胞に伝えることにあります。役目が済んだらメッセージは **OFF** されなければなりません。そこで **bioactive site** が何らかの修飾を受けることが多いのです。その結果不活性化されたり、活性が変化したりします。一方、生理活

性に関係の無いところは温存されるので、そのような様々な代謝物が血液中に存在することになります。もしも抗体がそのような代謝物とも結合してしまうとしたら、免疫学的測定法での測定値は生理活性のある本来の物質を上回り、測定対象物質の生理活性を反映できないことになります。特に薬物などの場合にはこのようなことが起こる可能性が大きいのです。

分子多様性の面から

ある一つの生理活性を示す物質が、一つしかないとは限りません。

例：ステロイドホルモン

ステロイドホルモンはその生理活性から、アンドロゲン（男性ホルモン）、エストロゲン（卵胞ホルモン）、ゲスターゲン（黄体ホルモン）、グルココルチコイド（糖質副腎皮質ホルモン）、ミネラルコルチコイド（鉱質副腎皮質ホルモン）などに分類されます。それぞれのグループには、構造がある程度共通して、強弱は異なるが同じ作用をもつステロイドがいくつかあります。この場合、免疫学的測定法は抗体の作成法を工夫することによって一つ一つのステロイドを区別して測定することもできるし、それが不可能な場合には、HPLCなどで分離した後測定に持って行くことも出来ます。

例：ペプチド、タンパク質

ペプチド性生理活性物質には、構造が類似しているが作用の異なる、あるいはある程度同じ作用のある、XXXファミリーといわれるグループがあります。

ペプチドやタンパク質ホルモンにはその生合成やプロセッシング過程で分子的に多様性を生じることが多く、またもともと遺伝情報、すなわちDNAの段階から多種類の分子を生じる仕組みとなっているものもあります。

糖タンパク質には糖鎖配列の異なるものが多く存在します。これは糖鎖のプロセッシング過程の途上にあるさまざまな前駆物質を反映しています。

このような場合、免疫学的測定法が生理活性を反映しないのはむしろ常識です。

2. 免疫学的測定法のライバルは？

では、免疫学的測定法以外にどんな測定法があるのでしょうか？

一般的に測定法を大別すると、物理・化学的測定法、生物学的測定法（生物検定）があります。

物理・化学的測定法

混合物から目的とする物質を何らかの方法で単離あるいは他の物質を測りこまないような処理をくわえ、その後その物質の持つ特性を測定して定量する方法です。

免疫学的測定法はこのグループに属しています。すなわち抗体との結合能を利用して他の物質を測りこまないようにし、標識物質の特性を利用して定量する訳です。

機器分析で良く知られている HPLC は溶解性や吸着性を利用して他の物質から単離し、その物質の持つ UV 吸収から定量する。検出感度の改良により、機器分析も免疫学的測定法のライバルとなっています。更に免疫学的測定法と機器分析の組み合わせも有効です。

生物学的測定法（生物検定、Bioassay）

測定対象物質の持つ生理活性を利用して、生物（個体、組織、細胞）の反応を指標として定量するものです。生理活性を持つ物質に関しては、もっとも基本的な測定法と言えるでしょう。ホルモン研究の歴史からいえば、ホルモンの発見はホルモン産生器官を取り除いたときに起きる生体の障害と産生器官の抽出物投与による障害の阻止・回復に由来しています。この点から動物の個体を用いた測定法がまず行われたのは当然でしょう。

個体を用いる測定（*In vivo* assay）の問題点

個体の反応には個体差が大きい。

→バラツキが大きい→測定値の信頼限界が広い→精度が悪い→多数の動物を必要とする。従って、

高価である。

生命倫理的にも問題。

その後、組織・細胞培養法が一般化するにつれて、培養組織、培養細胞を用いた生物学的測定法が生まれて来たのです。

培養組織、培養細胞を用いた測定法（*In vitro* assay）の特徴と問題点

組織、特に細胞はプールすることで均一化(homogenize)することができる。

→反応が均一になる→バラツキが小さくなる→精度が良好。

生体を有効に使用できる→最小限の個体数で測定できる。

場合によっては細胞のホモジネートが使用できる。

クローン化されたセルラインを使うことが出来る場合もある。

しかし、*in vitro*での結果は必ずしも *in vivo* と一致しません（分子多様性のある場合）。

通常生理的に放出される生理活性物質の量は一過性に増大した後、不活性化や排泄によって減少します。*In vitro* では反応期間中生理活性物質が培液中に存在することになります。

→測定感度が良くなるが、一方では生物学的な分子の安定性（生物学的半減期）という重要な因子の影響が無視される。

生物学的測定法間でも測定値の違いがある

ひとつのホルモンの生物学的測定に用いられる生体反応はひとつとは限りません。例えば、

黄体形成ホルモン(LH)の場合には、*in vivo* assay では、雄ラットの前立腺腹葉重量法 (ventral prostate weight assay、VPW)、雌ラットまたはマウスでの卵巣アスコルビン酸減少法(ovarian ascorbic acid depletion test、OAAD)、*in vitro* assay では雄ラット精巢の間質細胞(Leydig cell)を使ったテストステロン産生法などがあります。LHには分子多様性があるため、これらの測定法で測定した結果は必ずしも一致しないのです。

HCGの測定例(Van Hall et al. Endocrinology 88, 456, 1971)

LHと作用、構造の似たホルモんに胎盤絨毛で作られるHCGがあります。

HCGの糖鎖についているシアル酸は生理活性の発現に重要な影響を与えます。そこで、シアル酸を部分的に取り去ったHCGを作り、様々な測定法で活性を検討した結果は次の表のようなものでした。

シアル酸除去率(%)	活性力価(IU/mg)		
	OAAD	VPW	RIA
0	11,290	11,740	4,430
47	1,250	220	6,020
70	86	0.7	4,100
100	56	1.2	4,830

OAAD法は投与後約2時間で結果を判定する方法で、VPWは3日間の投与で4日目に判定します(精巢に働いてアンドロゲン産生を起し、そのアンドロゲンが前立腺を肥大させる)。脱シアル酸の影響は、生理活性の発現に時間の掛かる測定法の場合に、より大きな影響が出ることがわかります。一方、RIAでは脱シアル酸の影響は無いといって良いでしょう。つまり、抗体の認識部位ではないのです。

このように、生物学的測定法自体にも測定値の不一致という問題があるのです。

重要なことは、それぞれの測定法が何を測定しているのかを十分に理解した上で測定値を分析、判定することなのです。

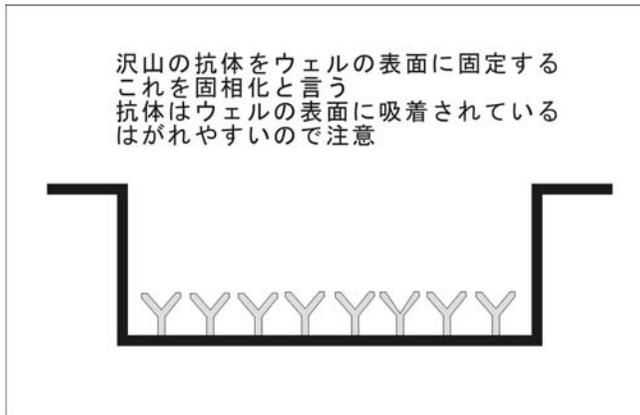
測定値を盲信せず、常に反省しつつ仕事を進めて行きたいものであります。

I. ELISA 入門

ELISA では抗体をどう利用するのか？

ELISA では通常 96 のウェルを持つマイクロプレートを使います。

まず、抗体をウェルの表面に吸着させて置きます（コーティング、**coating** とか固相化とも言います）。この抗体はキャプチャー抗体と言われ、測定対象物質である抗原を捉えるために使われます。抗体は大雑把に言って Y 字形をしていると考えられ、Y の先端の部分に抗原を認識し、結合する可変領域があり、抗体がウェルの底面に吸着するのは吸着しやすい柄の部分



(Fc) です。ウェルの材料はポリスチレンが主体で、もともとタンパク質を吸着し易いのですが、構造を色々考えて特に吸着しやすい素材になっていません。これに抗体の溶液を加えると自動的に吸着が起きます。出来るだけ多くの抗体を吸着させることによってごく少量の

抗原でも捉えることが出来るようになります。

では、キャプチャー抗体をどのように使うのでしょうか。

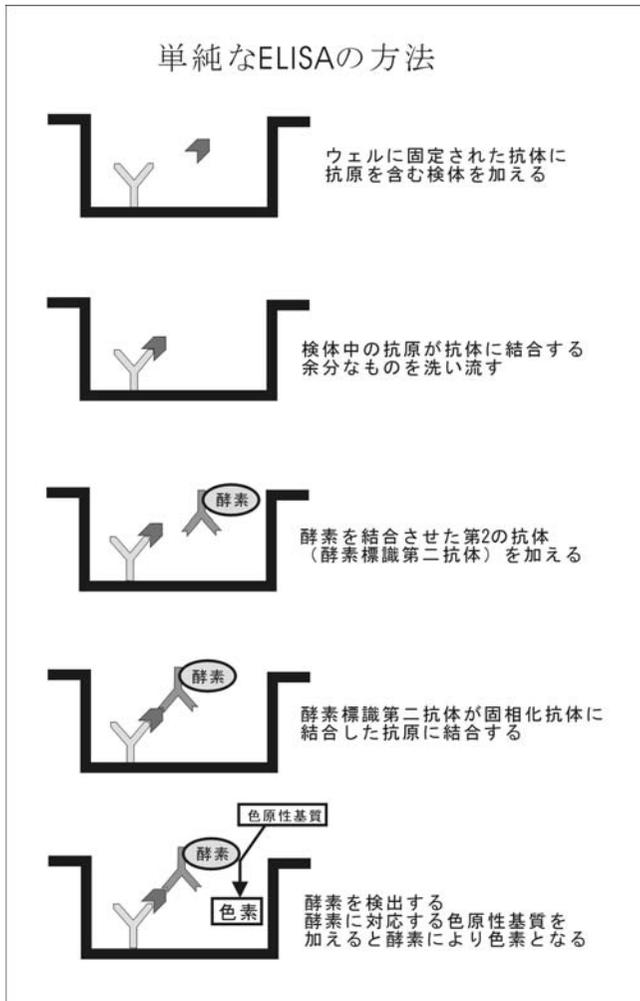
次のページの模式図で使って説明しましょう。

ここでは画面の都合上、抗体が 1 個しか付いていないように描かれていますが、実際は数多くの抗体が吸着されているのです。ウェルに固相化された抗体に抗原を含む溶液（標準液、または検体、測定試料）を加え、抗体に抗原が結合するまでの時間、通常は 1-2 時間、放置します。結合が終わったら、余分な液を捨て、ウェルを洗います。こうすると固相化抗体に結合した抗原だけがウェルに残ります。

次に、抗原のキャプチャー抗体が認識する場所（エピトープ）とは異なるエピトープを認識する抗体（第二抗体とか二次抗体と言う）を加えて、しばらく放置します。この第二抗体にはあらかじめ化学的に酵素を結合させてあります。

加えられた酵素標識第二抗体はキャプチャー抗体に結合した抗原を認識し、それに結合します。その後余分な酵素標識第二抗体を洗い流します。

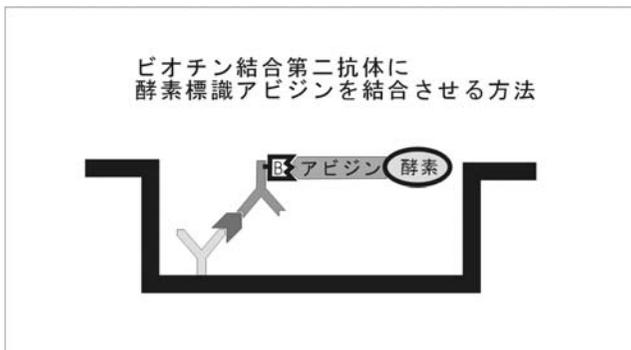
次に、酵素の色原性基質の溶液を加え、酵素反応を行わせると、色原性基質は酵素の作用を受けて色素に変わります。



そこで反応停止液を加え酵素反応を止めてから、色素の呈色を 96 ウェルマイクロプレート用の比色計で測定します。こうしてキャプチャー抗体に結合した抗原の量が色素として測定できることになるのです。比色定量の結果は、吸光度（アブソーバンス、absorbance）として表現されるので、標準品の測定結果から横軸に抗原濃度、縦軸に吸光度をとることによって検量線が描かれ、測定試料の吸光度から試料中の抗原量が計算出来る訳です。図に示した ELISA の実施方法は、もともと単純な方法です。酵素の分子量はかなり大きいので、この方法の場合、抗体に酵素を標識すると抗体の結合能に立体障害などが生じる可能性があります。また 1 分子の抗体に多

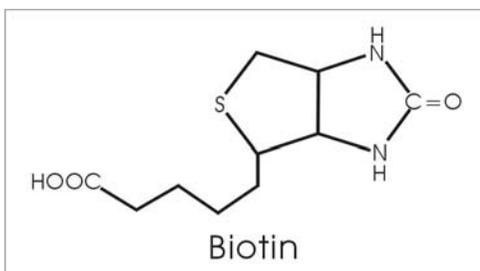
くの酵素を結合させることは困難です。

そこで別なタンパクに酵素を結合させて抗体に対する立体障害を少なくする方法が考えられました。図のように、第二抗体はビオチンで標識します。ビオチンは分子量が非常に小さい物質です。



物質です。

ビオチンとはもともと生体に存在する生理活性物質ですが、これと非常に強い親和力で結合するタンパク質が卵白の中に含まれていてアビジンと呼ばれています。このアビジン



に酵素を結合させ、抗原と結合したビオチン標識第二抗体と反応させれば、立体障害を克服できます。またアビジンに結合させる酵素を増やすことにより増幅効果も期待できるのです。ELISA ではこのような改善方法も用いられています。

ELISA は、抗体-抗原-抗体の形になるので、サンドイッチ法とも呼ばれています。つまり抗体がパンで抗原をハムと考えるわけです。

シバヤギキットで使用している酵素と色原性基質

シバヤギのキットでは通常ペルオキシダーゼと言う過酸化水素を分解する酵素を使用しています。ペルオキシダーゼにはいくつかありますが、ここでは HRP と呼ばれる西洋わさび(Horseradish)由来のペルオキシダーゼです。その主な性質を次の表に要約しておきます。

ペルオキシダーゼ(Hydrogen peroxidase, Horseradish peroxidase, HRP)	
反応	色原性基質 + H ₂ O ₂ ⇌ 酸化型色素 + 2H ₂ O
起源	西洋わさび(Horseradish)
分子量、至適 pH	40,000、pH 6.5
基質特異性	色原性基質(水素供与体)については特異性はない。過酸化物としては H ₂ O ₂ 、CH ₃ OOH、C ₂ H ₅ OOH のみ
阻害剤と活性化剤	阻害剤: CN ⁻ 、S ²⁻ 、F ⁻ 、N ₃ ⁻ (抗凝固剤として用いられるフッ素イオンと保存料として用いられる NaN ₃ に注意!)
安定性	乾燥、冷蔵状態で数年間、水溶液で冷蔵 1 年間安定

ここでひとつご注意願いたいのは、検体に存在する可能性のある阻害剤です。ペルオキシダーゼの阻害剤は、表にあるように CN⁻、S²⁻、F⁻、N₃⁻ でなどです。特に血液試料を採取するときに採血管がフッ素や NaN₃ でコーティングされているものを使用することがあります。

ELISA では検体を抗体と反応させた後で洗浄するので、阻害剤が決定的な酵素活性抑制を起こすほどではありませんが、洗浄後僅かに残存しているものが酵素をいくらかでも抑制すれば、発色の低下となって現れる可能性があります。これらの採血管は使用しないことが望ましいのは言うまでもないことです。抗凝固剤としては一応ヘパリンをお勧めしますが、キットによってはヘパリンが測定系に影響を与えることもあり、そのような場合には取扱説明書に明記されているので、その指示に従い、例えば EDTA-2Na やクエン酸ナトリウムを使用するか、何も加えず血清として測定するべきです。

シバヤギキットで HRP の色原性基質として使用されているのは、TMB と呼ばれる、3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン(3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine)です。

前表にあるように、HRP によって過酸化水素が分解され、生じた活性酸素が TMB を酸化します。この結果できた青紫の色素は反応を停止するために加えられる硫酸酸性下では黄色になり、450nm に吸収を持つようになります。

最後のステップー吸光度の測定

そこで吸光度を測るには、TMB 由来色素の吸収波長の 450nm での吸収を測定します。

ウェルの均一性や、キズなどの影響をキャンセルするために、副波長として 620nm の吸光度も求め、450nm の吸光度との差を真の吸光度として扱います。

吸光度とは、比色定量の基盤となる光の透過と溶液中の物質濃度との関係を示すランベルトとベールの法則(Lambert-Beer's law)によって決められる数値でのことです。

$$\text{吸光度} = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon l c$$

I_0 : 入射光、 I : 透過光、 ϵ : モル吸光係数、 l : 吸収層(cm)、 c : 濃度(M)

つまり、入射光に対する透過光の割合、即ち透過率の逆数の対数が吸光度(absorbance)です。

例えば光が 10%しか透過しないときには、吸光度は $100/10 = 10$ 、 $\log_{10} = 1$ となります。50%の透過率では、 $100/50 = 2$ 、 $\log_{10} = 0.301$ となります。

ランベルトとベールの法則では、この吸光度が溶解している物質特有のモル吸光係数と光の通路(光路)の長さ即ち吸収層、及び物質のモル濃度の積となることを示しています。従って特定の物質を同じ長さの吸収層で測定すれば、吸光度はその物質の濃度に比例する、ということになります。ELISA での物質(色素)の濃度は抗体に結合した抗原の量に比例した酵素の作用の結果ですから、前に述べましたように、横軸に標準品濃度、縦軸に吸光度を採って検量線とすることが出来るのです。

序論ーイムノアッセイについてーで述べましたように、ELISA の場合縦軸、横軸のスケールのとり方によって検量線の形は大きく変わります。コンピュータ計算をする場合はどのとり方でもあまり違いはないのですが、回帰曲線のフィットネス、つまり回帰曲線が各標準点をどれだけ近く通るかは、回帰曲線が直線に近い緩やかなカーブとして得られるほうが良好です。ELISA の場合には縦、横共に対数変換を行う事をお勧めします、つまり両対数方眼紙を使う訳です。

以上でざっと ELISA についての大筋を記しましたが、施行上の手技については次項「ELISA の実技」を参照して下さい。また更に ELISA についての詳細は、別項「もっと ELISA」をお読み下さい。

II. ELISA の実技



A. シバヤギ製キット操作法の手ほどき

キットの使用法で最も基礎的な部分を解説したものです。

注意：この操作法は原則としてシバヤギ製品にのみ適用されます。

1. プレート、標準液、試料溶液、試薬溶液は室温に戻してから添加、分注

低温の状態ですぐに測定操作を始めるとウェル間の温度の不均一を招き、温度の不均一は抗原抗体反応、酵素活性、発色反応などに影響を及ぼし、またピペッティングの液量が不正確、不均一となり、測定のバラツキを大きくする原因となります。

測定試料が冷凍保存されているときは、流水に浸けると早く解凍出来ます。解凍後 Vortex などでよく攪拌、均質化して下さい。一般にタンパク溶液を凍結融解すると、タンパク部分が底部に濃縮されることが多いからです。

2. 試薬溶液の調製法

シバヤギ製キットに含まれている試薬溶液は、そのまま使用するものと、希釈して使用するものがあります。

○ そのまま使用するもの



緩衝液

発色液

反応停止液

○希釈して使用するもの



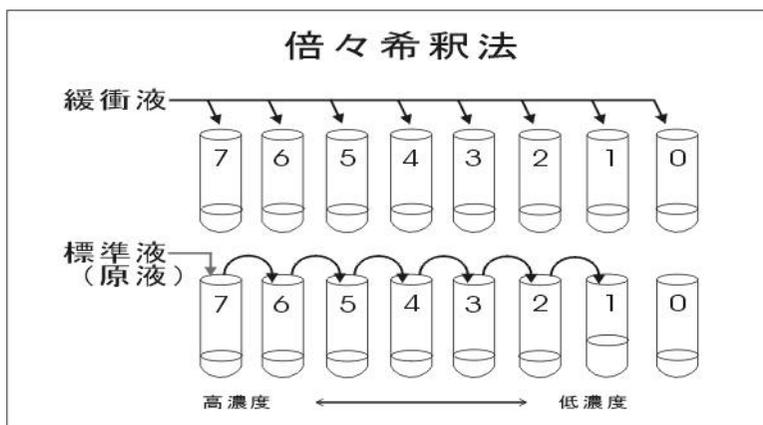
濃縮洗浄液、標識（酵素、ビオチン）抗体溶液
ペルオキシダーゼ - アビジン結合物溶液、標準溶液

●標準液の調製法

キットにより、次の2種類の方法のいずれかで標準液を調製するようになっております。

- a) 倍々希釈（Serial dilution）
- b) 比例配分希釈（Proportional dilution）

a) 倍々希釈による調製



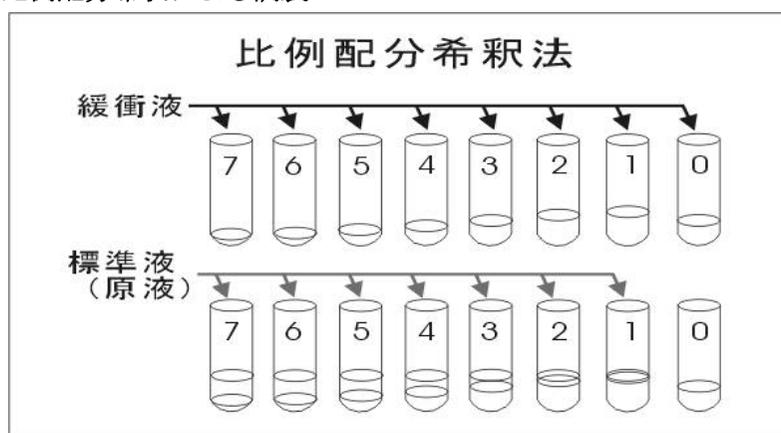
先ず標準液の種類に対応する本数（仮に7点ならばゼロ点をいれて8本）のマイクロチューブ(12×75mm)を用意し、濃度の薄いほうから 0、1、2・・・7（前述の例では）と番号を

つけておきます。

それらのチューブに緩衝液を指定された分量加えます。特に最も濃度の高いチューブ(No. 7)に入れる緩衝液の分量は他のチューブと違うことが多いので注意して下さい。

最も濃度の高い標準液用のチューブに、添付された標準液原液を指定量加え、必要なら栓をしてよく混合します (Vortex で 1 秒間を 3 回位)。次にそのチューブから指定量の混合液をとり、次ぎのチューブに加え、混合します。以下同様につづけて No. 1 まで段階的濃度の標準液を作っていきます。No. 0 は緩衝液だけです。

b) 比例配分希釈による調製



先ず標準液の種類に対応する本数 (仮に 7 点ならばゼロ点をいれて 8 本) のマイクロチューブ(12×75mm)を用意し、濃度の薄いほうから 0、1、2・・・7 (前述の例では) と番号をつけておきます。

それらのチューブに緩衝液を指定された分量加えます。倍々希釈の場合と違ってチューブ毎に緩衝液の量は異なるので注意して下さい。

添付された標準液の原液を各標準品濃度に対する指定量ずつ、それぞれのチューブに加え、栓をして良く混合します。No. 0 は緩衝液だけです。最高濃度の標準液として原液そのものを使うこともあります。

標準品の希釈はアッセイの検量線が上手く描けるかどうか、また測定値の正確さを左右する重要なステップです。特に初心者の方は取扱説明書に関わらず、間違いの無いような希釈法、例えば倍々希釈を採用されるようお勧めします。

●標識（酵素、ビオチン）抗体溶液、及びペルオキシダーゼーアビジン結合物溶液の希釈について

標識抗体溶液はごく少量小さな容器に分注してお届けしております。容器に入っている試薬の量は、[キットの内容]に記されている量よりも多くなっており、記されている容量をビペットで充分取ることができます。

これを次のようにして希釈します。

先ず、計算量の緩衝液を別な容器(A)に取り分けます。

抗体の入っている小容器から「キットの内容」の項に指定されている容量だけ（例えば 20 μ l）を取り、容器(A)の緩衝液に加え、混合します。

●濃縮洗浄液の希釈について

添付の濃縮洗浄液(100ml)を精製水 900ml に加えて洗浄液を調製して下さい。これをノズルのついた洗浄ビンに入れて使用するか、自動洗浄器の容器に入れて使用して下さい。

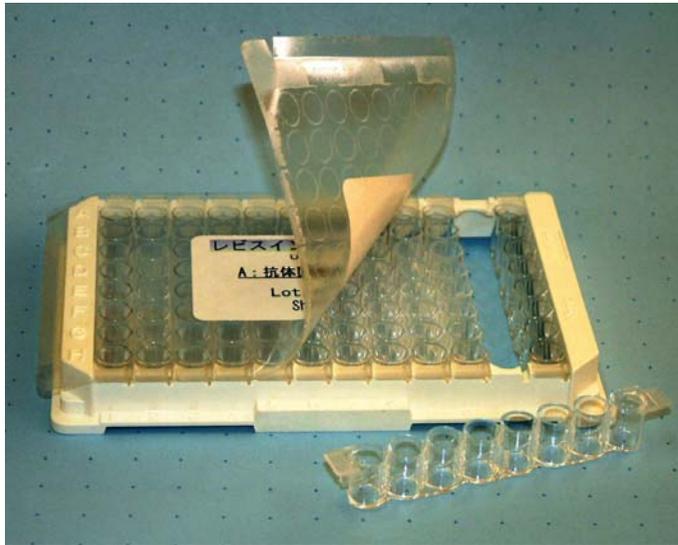
洗浄ビンは 500ml のものが手頃です。

3. 抗体固相化プレートの構造と使用法について



ELISA キットで使用する 96 ウェルプレートは、この写真のような形をしております。

8 個のウェルが一続きとなっているストリップが 12 個、プレート枠にはめ込まれております。その表面には乾燥を防ぐためにシールが貼り付けられています。



このシールは使用直前まではがさないで下さい。乾燥は抗体の変性を招き力価が低下する恐れがあります。シールはプレートが常温に戻ってから剥がして下さい。まだ冷えているうちに剥がすと、糊がまだ硬くて部分的にシールが切れて残ったりすることがあります。

例えばウェルの半分しか使用しない場合には、カッターでシールをその部分だけ切り取り、ストリップを取り出し、もしあれば別なプレート枠（前に使用したキットの枠を棄てないで保存して置けば便利です）にはめ込んで使用することも出来ます。

ただし、この場合、試薬類の有効期限内に残りを使って下さい。試薬類は調製後直ちに使い切ることを原則とします。

ヒント！

ストリップの端のところに細いマジックペンで番号を付けて置くと、洗浄の際に誤ってバラしてしまっても再構成できます。

4. プレートの洗浄法

抗体固相化プレートは使用直前と各反応の終了後に洗浄します。

洗浄の具体的な方法を説明します。

使用直前の洗浄: プレートを片手で持って第一回目の洗浄液を洗浄瓶から各ウェルに満たします。次に流しの上で一気に逆さまにします。逆さまの状態ですべてのウェルの反応液を流しの中に振り落とす。3回位、手が滑ってプレートを落とさないように注意。

第二回目の洗浄液をウェルに加え、同様に廃棄します。更に第3回目の洗浄を行います。

反応液の廃棄と洗浄：反応が終了した 96 ウェルプレート中の反応液を前述のような方法で廃棄します。廃棄が終わったら、乾燥に注意して洗浄に移ります。

プレートを片手で持って第一回目の洗浄液を洗浄瓶から各ウェルに満たします。この場合キャリーオーバーを防ぐ為に**溢れさせないように**ウェルに慎重に満たして下さい。この際、**連続添加型ピペット（後出）**で洗浄液 250 μ l をウェルに分注するのもお勧めです（8 連ピペットはウェルの底を引っ搔く可能性があるので使用禁止）。第一回目だけが大事です。

プレートをちょっとゆすってから流しの上で一気に逆さまにします。逆さまの状態ですべてのウェルの洗浄液を流しの中に振り落とす。（3 回位振る。手が滑ってプレートを落とさないように注意）

第二回目の洗浄液をウェルに加えますが、これからは溢れてもかまいません、同様に廃棄します。更に第 3 回目の洗浄を行います。



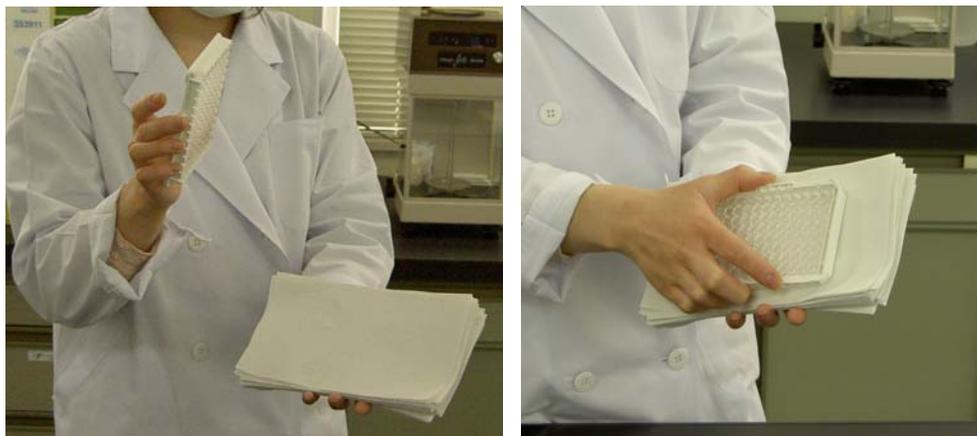
自動ウォッシャーも市販されています。これを使用するのも便利です。

注意：洗浄液噴射の勢いを強すぎぬように調整して使用して下さい。噴射、または吸引の勢いが強すぎると固相化された抗体が引き剥がされる恐れがあります。バラツキが大きい時や発色させた時の吸光度が全体的に低い場合にはその可能性があります。



洗浄液の完全除去

洗浄液を廃棄後、何枚か厚く重ねたペーパータオル上にウェルプレートパンパンと何度か叩きつけて、ウェル底面についている洗浄液を落とします。洗浄液が残っていない事を確認して下さい。洗浄液がウェル中に多く残りますとバラツキの原因となります。



自動ウォッシャーを使用した場合でも洗浄液の完全除去まではしてくれませんがこの操作は必要です。

キットによっては非常に撥水性の強い材質のウェルプレートを使っているものがあります。このような場合には取扱説明書に明記してありますが、上のように叩かなくても下向きにペーパータオルに押し付けるだけで除去できます。

5. 標準液と試料の採取と加え方

シバヤギの測定キットでは使用する標準液および試料液の量は 5、ないしは 10 μ l となっている場合や、前以て希釈した試料を 50 μ l 加えるようになっている場合があります。

また標準液、試料ごとに異なる溶液を採取添加することになるので、チップ交換式のピペットを使用しなければなりません。このためバラツキを最小にするために十分な注意が必要です。従ってピペットの選択は重要です。添加量にマッチしたピペットを選んで下さい。

ピペットの許容される誤差について

ISO 8655-5 にはピペットについての国際規格として、許される誤差限界が規定されています。

例えば使用範囲 10-100 μ l の可変シングルチャンネルピストンピペットでは

Maximum systematic error (系統誤差) : $\pm 0.8\mu$ l

Maximum random error (確率誤差) : $\pm 0.3\mu$ l

註) 系統誤差 (セットした液量との差) : 10 回測定の平均値で比べる

確率誤差 (バラツキ) : 10 測定の標準偏差

従って仮に 10-100 μ l の可変シングルチャンネルピペットで 10 μ l を測定すると 3%の確率誤差が許容されることとなります。一方、測定範囲が 0.5-10 μ l の可変容量ピペット例えばエッ

ペンドルフの 4910 では、10 μ l の設定で確率誤差は 0.8% に抑えられています。

マルチチャンネルピストンピペット (8 連、12 連) での許容される誤差はシングルチャンネルで規定された値の 2 倍となっているので注意して下さい。このようなマルチチャンネルピペットは標準液や試料のピペッティングには使わないようにしましょう。



操作法としては二つの方法があります。それを説明しましょう。

a. 「プレウェットing」法

- 新しいチップをセットした後、採取する標準液または試料を第 1 ストップの範囲で 2、3 回吸い上げ放出する「プレウェットing」を行った後、溶液を満たします。
- チップの先端を容器の内壁に軽くタッチし先端の外側についた溶液を除去します (タッチ&ゴー)。
- ウェルに溶液を排出します。このときプッシュボタンを最後まで押してブローアウトします (ブローアウトは必ずしも必要ではありません)。
- チップの先端をウェルの内壁にタッチしチップの外側にまわり出た溶液を除去しつつピペットを抜き出します (タッチ&ゴー)。次の溶液が 2 重測定などで同じものならば、チップはそのまま使用できます。そうでない場合はチップを交換します。

b. 「共洗い」法

- 新しいチップをセットし、第 1 ストップまでプッシュボタンを押し下げ、採取する溶液を静かに吸い上げます。
- チップの先端を容器の内壁に軽くタッチし先端の外側についた溶液を除去します。
- 緩衝液などがすでに入っているウェルにチップの先端を入れて溶液を放出し、2、3 度プッシュボタンを上下して「共洗い」します。最後にブローアウトします。
- チップの先端をウェルの内壁にタッチしチップの外側にまわり出た溶液を除去しながらピペットを抜き出します (タッチ&ゴー)。そしてチップを交換します。

以上のいずれかの方法で標準液または試料を採取・添加して下さい。必ずどちらか一方に統

一して下さい。統一しないとバラツキが大きくなる可能性があります。

凍結保存された試料溶液は必ずよく攪拌してから試料を採取して下さい。融解した試料は底部に溶質が濃縮されている可能性があります。

試料が血清・血漿の場合には「共洗い」法を推奨します。粘性が高いからです。

採取する液量が比較的多い場合（例えば 50–100 μ l）は「プレウェッティング」法が良いでしょう。

以上の方法はエッペンドルフの取扱説明書に準拠しております。他社のピペットをお使いになる時はその取扱説明書をご参照下さい。エッペンドルフ社では、下記のような場合括弧内の程度の相対誤差が生じるとしております。

タッチ&ゴーをしない(<3%)、プレウェットをしない(<2%)、深さと角度 (<1.0%)、一定のペースでピペッティングが出来ない(<1.5%)、ピペットのリーク（フィットしていないチップ）（0.5-50%）、など。

6. 試薬溶液の加え方

全てのウェルに共通した試薬溶液を加える際には、連続添加（マルチデリバリー）の出来るピペット（例えば、Eppendorf multipipette plus）が適しているので、それを使用する方が望ましいのです。



マルチペットの使い方

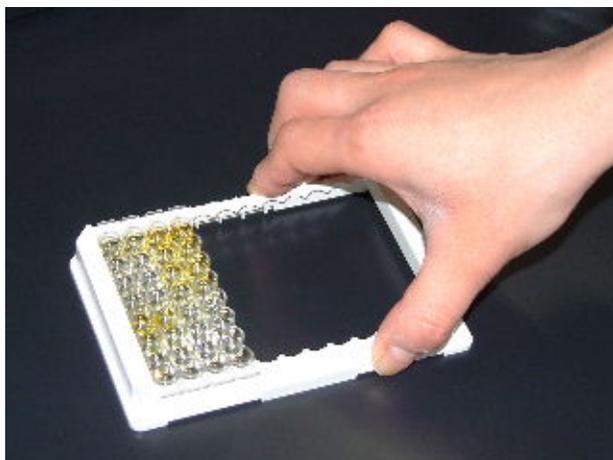
- 試薬溶液を充たした後、空気を抜き、最初の 1、2 回は試薬溶液の容器に戻して下さい。
- ウェルに分注するにはウェルの壁にチップの先端を軽くタッチして注入して下さい。ただし、ウェルの中にある液に浸けないで下さい。
- 力を入れ過ぎないで下さい（溶液が跳ねてしまいます）。

7. 攪拌操作

試薬を加えた後攪拌操作が必要になります。



出来れば、マイクロプレート・ミキサー（マイクロプレート・シェーカーとも言う）のような器械（6～13万円くらい）にプレートセットし、800rpmで10秒を3回程度攪拌するのが目安です。



もしどうしても攪拌器が無い場合は、プレートを表面の滑らかな実験台の上に置き、手でプレートを実験台に軽く押し付けたまま「の」の字を描く様にやや速く水平円運動を行って攪拌して下さい。

8. プレート・リーダーと吸光度測定



ELISA の最終段階として、酵素活性の測定があります。シバヤギのキットについては、HRP (horse radish peroxidase) の活性を発色基質 TMB (tetramethyl benzidine) を用いて発色させ、450nm での吸光度 (副波長 620nm での吸収との差を使用している) で表現して、検量線から試料中の測定対象物質の濃度を計算します。

発色後の吸光度測定には、マイクロプレート・リーダーを用います。プレート・リーダーには波長を自由に変えられるプリズム型と一定の波長のみが可能なフィルター型があり、後者の方が安価です。価格は多彩です。ランプ、プレート読み取り部分のメンテナンス、使用波長の確認、フィルターの清掃などが必要です。

吸光度と比色定量

一般的に比色定量では Lambert-Beer の法則が利用されています。

Lambert-Beer's law

$$\text{吸光度} = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon l c$$

ϵ : モル吸光係数(mol-cm)、 l : 吸収層、 c : 濃度

つまり、透過率の逆数の対数 (吸光度、**absorbance** と呼ばれる) は呈色物質の濃度に比例するということです。

一般に比色計では吸光度(**absorbance**)と透過率が示されるようになっております。

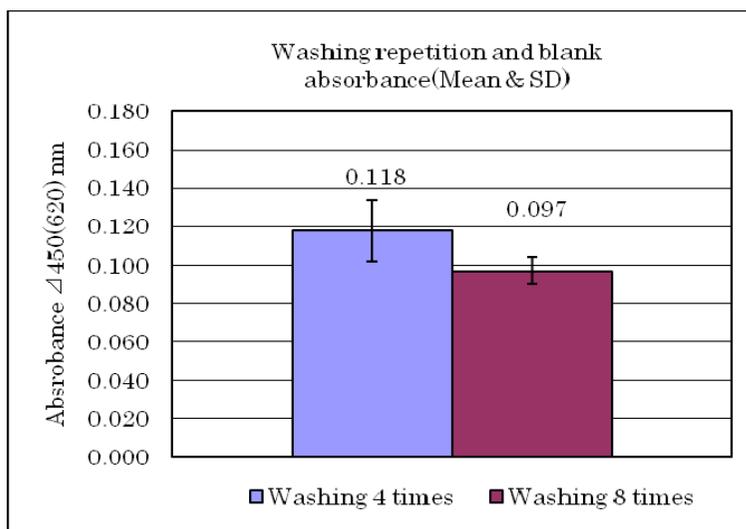
例えば入射光の 50%が吸収される場合には吸光度は、 $100/50=2$ 、ですから、 $\log 2=0.301$ となります。透過率 10%では吸光度 1.0、1%の透過率では 2.0 となります。透過率と吸光度の関係を表示してみましょう。

透過率%	99.9	99.5	99	90	80
吸光度	0.00043	0.00218	0.00436	0.0457	0.0969
透過率%	50	10	5	1	0.1
吸光度	0.301	1.000	1.3010	2.000	3.000

吸光度 3.0 はなんと 0.1%の透過率に相当します。この辺は吸光度測定の限界を超えていると考えるべきでしょう。このような吸光度が出る場合には、もっと低い吸光度を与えるように反応系を調整すべきです。例えば検体の希釈など。またブランク（測定物質濃度ゼロ）の吸光度が 0.1 を超えるようなら反応系またはプレート・リーダーは正常とはいえません。ブランクの吸光度が高い場合には、特に酵素標識抗体や酵素標識アビジンを反応させた後の洗浄は取扱説明書に示された洗浄回数を倍に増やし、洗浄液を緩やかに添加して行うことをお勧めします。その 1 例をお眼に掛けましょう。

Mouse insulin ELISA KIT(U-type)

洗浄回数を緩やかな
洗浄液の添加と共に
回数を倍にした時、
吸光度平均値の差：
 $p < 0.065$
分散比有意性： $p < 0.1$
ブランクの吸光度
は確実に低下する。
更にバラツキが有
効に小さくなること
が危険率 10%以下で
期待される。



9. 1 試料 1 ウェルではなぜいけないのか？

○アッセイの施行法から考えると

1 ウェルでの測定結果をサポートする側面的データが無いこと。もし測定操作で誤りやピペッティングの誤差があったとしても比較検討することが出来ない。強いて言えば同一実験群の他の試料とかけ離れた結果でなければ一応測定操作に間違いは無かっただろうと推定することになるのですが、本当にそれで良いのかという疑問が残ります。

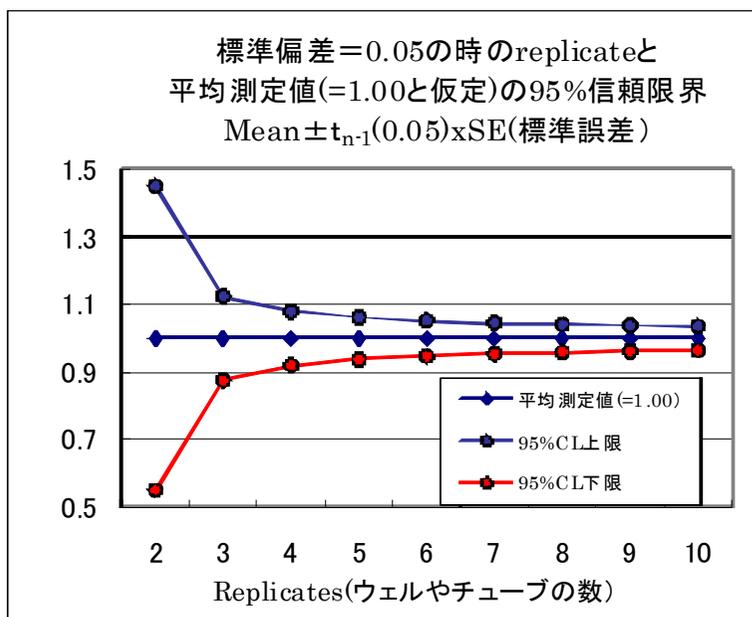
2重、3重測定ならばそれぞれの測定値がまとまっていれば測定操作に間違いがなかったと判定できます。それでは2重測定でも二つの測定値がかけ離れているときはどうするかと言うことなのですが、2重測定の場合にはどちらが異常なのか正しいのか判らないのです。強いて言うならば、同一実験群に属する他の試料との比較で考えることとなります。3重測定ならば他の二つからかけ離れている測定値は棄却することもできます。厳密に言えば棄却検定をした方が良いのですが試料数が少ないときには棄却することは難しくなります。特に2重測定では棄却検定のしようがありません。あまり変な値でなければ棄却しないで平均値を求める方が無難でしょう。

○統計学的に考えると

1ウェルの場合には自由度がゼロになります。従って統計学的には信頼度はゼロです。2重、3重測定ならば平均値と標準誤差が計算できますから、測定値の95%信頼限界が判定できます。平均値の分布の形を示す標準誤差が試料数の平方根に反比例することを思い出して下さい。従ってレプリケートの数が多ければ平均値の信頼限界は狭くなり信用度は上がります。一方、標本の分布の形を示す標準偏差は試料数に関係なくほぼ一定なのですが、その信頼度は試料数に依存します。

右のグラフをご覧ください。

このグラフは平均測定値を1、標準偏差を0.05（つまり相対標準偏差或いは変動係数を5%と仮定した時、測定の繰り返し、即ちウェルの数と求められた平均値の95%信頼区間を示したものです。シングルアッセイは論外ですが、2重アッセイでの平均



値の信頼区間は上下約50%となります。3重測定で区間は上下10%強です。通常2重測定が行われておりますが、私としましては3重測定を推奨している理由がお分かりでしょう。

10. キット使用上の全般的注意事項

- ・本キット内の試薬を研究用以外の目的に使用しないで下さい。
- ・本試薬は正確な値が得られるように調製してありますので、ロットの異なる試薬と組み合わせて使用しないで下さい。また、同じロットでも保存した調製品と合わせて使用することは避けて下さい。
- ・分注及び希釈操作は測定精度に影響しますので、正確に行ってください。
- ・プレートの乾燥は固相抗体の変性をもたらしますので、乾燥させないよう注意して下さい。
- ・各反応時間は試薬分注開始時から測定して下さい。
- ・96 ウェル全てに分注する時間がかかった場合は各ウェルの反応時間が均等になるよう考慮して下さい。
- ・測定毎に検量線を作成して下さい。
- ・検体の希釈には必ずキット添付の緩衝液を使用して下さい。
- ・本キットの保存条件は厳守して下さい。
- ・反応停止液は、1M 硫酸ですので、手や粘膜に付けないように注意して下さい。
- ・発色剤は、手や粘膜に付けないように注意して下さい。
- ・発色剤、反応停止液を取り扱う際は、金属との接触は避けて下さい。
- ・検体（血清・血漿等）は感染の危険性を考慮し取り扱って下さい。
- ・抗体固相化プレートは、8 ウェル×12 列のストリップタイプですのでプレートシールをカッター等で切断し1列ずつ使用することも可能です。
- ・試薬調製作業中は、会話、飲食、喫煙は避けて下さい。



B. ピペットの種類と注意事項

ピペットの種類

昔から使われているマニュアルピペットには、メスピペット、ホールピペット、オストワルドピペット、ラムダピペット（カルルスベルグピペット、コンストリクションピペット）、ザーリーピペット、駒込ピペット、パスツールピペットなど非常に様々な種類があります。40年ほど前から使用されるようになったのが半自動、全自動ピペットです。ここでは最も一般的に用いられている半自動ピペットについて種類、特質、使用にあたっての留意事項を述べることにします。

半自動ピペットは大きく分けて3種に分類されます。

プランジャー往復－空気介在型



もっとも一般的に用いられている、円錐形のプラスチック・チップを使用するタイプで、溶液とピペット本体が接触せず、本体が汚れない、チップを交換することで別な溶液が直ちに計り採れる、という利点があります。

欠点： 溶液と本体の間に空気相が介在するため、空気の影響を受けます。

弾力： 吸入・排出の速度が影響します。

溶液の粘度が影響します。チップの内側への粘着により排出量が減少します。（空気が粘着した溶液をすり抜けて外部に出てしまう。）

膨張： 溶液の温度が室温より高いと空気相が膨張し吸入量が減少します。

収縮： 溶液の温度が室温より低いと空気相が収縮し吸入量が増加します。

このため、プランジャー1段押しのタイプでは溶液がチップ内に残ります。この場合、プランジャー2段押しのタイプでは余分に吸い込んだ溶液が全て排出されるため、余分に計り入れることとなります。

対策： 吸入排出を余り速く行わず、また分注の際の速度を一定になどです。

このタイプのピペット (Single-stroke dispenser) の許容される誤差について

ISO 8655-5 にはこのタイプのピペットについての国際規格として、許される誤差限界が次のように規定されています。（実技の 31 ページでも述べましたが重要なことなので再録）

名目容量 (μl)	1	2	5	10	20	50	100
系統誤差 (μl)	0.05	0.08	0.125	0.12	0.2	0.5	0.8
同 (%)	5.0	4.0	2.5	1.2	1.0	1.0	0.8
確率誤差 (μl)	0.05	0.04	0.075	0.08	0.1	0.2	0.3

同	C.V.(%)	5.0	2.0	1.5	0.8	0.5	0.4	0.3
---	---------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

名目容量(Nominal volume)とはそのピペットの最大容量のことです。

例えば使用範囲 10-100 μ l の可変シングルチャンネルピストンピペットでは

Maximum systematic error (系統誤差) : $\pm 0.8\mu$ l

Maximum random error (確率誤差) : $\pm 0.3\mu$ l

註) 系統誤差 (セットした液量との差) : 10 回測定 of 平均値で比べる

確率誤差 (バラツキ) : 10 測定 of 標準偏差

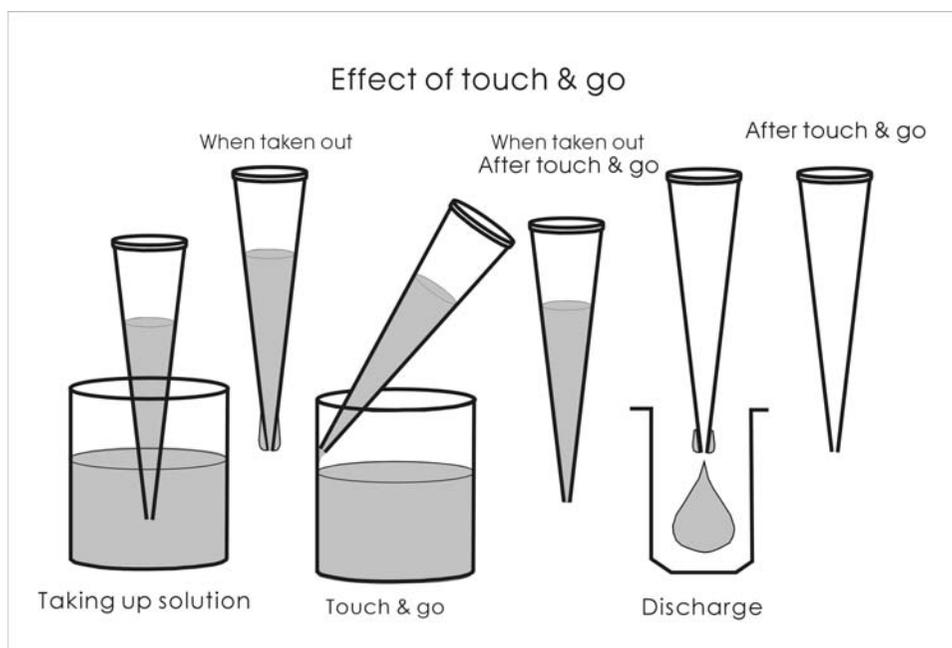
従って仮に 10-100 μ l の可変シングルチャンネルピペットで 10 μ l を測定すると 3% の確率誤差が許容されることとなります。一方、測定範囲が 0.5-10 μ l の可変容量ピペットでは、10 μ l の設定で確率誤差は 0.8% に抑えられています。

マルチチャンネルピストンピペット (8 連, 12 連) での許容される誤差はシングルチャンネルで規定された値の 2 倍となっているので注意して下さい。

マルチチャンネルピペットは標準液や試料のピペッティングには使わないようにしましょう。

その他の注意事項

チップの外側に付いた溶液に注意して下さい。吸入が終わったら容器の壁にチップの先端を軽く触れる「タッチ・アンド・ゴー」を行って下さい。排出の場合も同様にして下さい。



プランジャー2 段押しタイプでは、絶対に 2 段目まで押し込んで吸入してはいけません。余分な溶液が大量に吸い込まれます。必ず 1 段目で吸入することです。

プランジャー漸進型



注射器型のチップを使うようになっている、エッペンドルフのマルチペットプラスのようなタイプです。溶液をチップに吸い込んでから排出レバーを押すとプランジャーが少しずつ前進し、一定量の溶液が排出されます。多数の試験管やウェルに同一溶液を分注するのに用いられます。

欠点：このピペットの精度は、プランジャーを前進させる距離が一定であることと、チップの内径が一定であることという製造上の精度に依存していることです。

従って製造会社やピペットごとに製造精度が異なる場合があります。

この場合も、排出量を少なくセットするとバラツキは大きくなります。

ISO 8655-5 ではマルチデリバリーdispenser の最大許容誤差を次のように定めております。

名目容量 (μl)	100	200	500	1000	2000	5000	10000
系統誤差 (μl)	1.0	2.0	5.0	10	16	30	50
同 (%)	1.0	1.0	1.0	1.0	0.8	0.6	0.5
確率誤差 (μl)	1.0	2.0	3.0	4.0	8.0	15	30
同 C.V. (%)	1.0	1.0	0.6	0.4	0.4	0.3	0.3

名目容量(Nominal volume)とはそのピペットの最大容量のことです。

註) 系統誤差 (セットした液量との差) : 10 回測定の平均値で比べる

確率誤差 (バラツキ) : 10 測定の標準偏差

名目容量についての最大許容誤差はそのピペットのどの設定容量にも通用します。

例えばエッペンドルフのマルチペットプラスの場合、2.5 ml のシリンジを使うと名目容量は 500μl になります。従ってこれ以下のどの量に設定しても許される系統誤差は 5μl、確率誤差は 3μl です。例えば 50 回分注するために 50μl に設定すると最大許容誤差は系統誤差で 10%、確率誤差は 6%となってしまうのです。

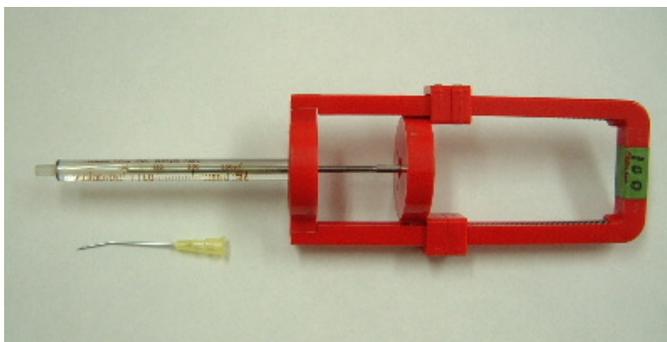
注意事項

プランジャーと溶液の間の空気は必ず除いて下さい。吸入した後、特に最初の一回はプラン

ジャーの進行が一定であるか疑わしいので、最初の 1、2 回は溶液のビンへ戻します。その後一度チップの先端をビンの壁にタッチしてから分注を始めて下さい。

タッチ・アンド・ゴーを行って下さい。特に注射器型のチップは先端が太く回りに溶液が付着しやすいのです。心配だったらチップの先に先端の細い円錐形チップを付けると良いでしょう。

プランジャー往復－空気不介在型



Hamilton シリンジのような注射器タイプで、プランジャーが一定の距離を往復して一定量の溶液を吸入・排出するピペットです。人の手で目盛に合わせるのではなく、上の写真のような装置で自動的にプランジャーが止まるような仕掛けが必要です。モーターでプランジャーを上下させる装置もあります。

欠点：アダプターの適当なものが手に入りにくい。

このタイプは最も精度が高く、100 μ l で CV 0.15%程度。

ピペットの繰り返し精度（確率誤差）のテスト

100 μ l での精度検定は、直径 8-12mm の小試験管を 20 本ほど用意し（ISO の規定では 10 本）、感度 0.1mg の天秤で重量を測定、記録しておき、ピペットで蒸留水を分注して再度重量を測定し、分注された水の重量を算出します。そのデータから平均値と標準偏差を求め、標準偏差が平均値の何%にあたるか、すなわち CV（変動係数）を計算します。

5-10 μ l での精度検定は、更に感度の良い天秤、感度 10 μ g のセミマイクロ或いは 1 μ g のマイクロ天秤が必要です。

測定した時の温度から水の比重を求め、それを使って volume を計算することにより、系統誤差を求めることができますが、ELISA では系統誤差は必ずしも気にすることはありません。何故なら、標準品も試料も同じピペットで添加するからです。別なピペットで添加する場合は論外です。

その他ピペット操作で注意したいこと

●キャリーオーバー

測定対象物質が高濃度に入っている試料をピペットで採取したとします。チップを換えずに次の試料を採取するとチップの中に残存している高濃度の試料が次の試料に混ざりこみ、測定結果を高くしてしまうことがあります。これを防ぐには、

チップを交換する。

チップを共洗いする。

という手があります。

チップの共洗いとは、高濃度の試料を採取した後、最初に次の試料を採取した分を捨て、もう一度採取して使用することです。

●検量線を作るための標準液は必ず濃度の低いほうから並べること。

もしもキャリーオーバーが生じても影響は少ない筈です。

●タッチ・アンド・ゴーは一回だけで良いので、何回もしつこく行くとチップ内の溶液が振り出されかねません。

●新しいチップを使うとき

チップを交換したあと一度吸い上げた液をいったん戻してから再び吸い上げます。

チップはかなりの撥水性を持っていますが、それでもある程度はチップの内側の表面に広がり、付着していると考えられ、その分だけ排出される液量が少なくなっていることになります。一度排出してもう一度吸い上げることでこの液量が補正できます。

排出するときは何度もプランジャーを押している人もいますが、不要であるし好ましくありません。吸い上げた分だけ出せば良いのです。

●計り採る液量に注意する

計り採る液量が少なくなればなるほど、繰り返しのバラツキは大きくなります。プランジャーの移動精度やピペットチップの外側に付着している液の影響が大きくなって来ためです。反応条件が許すかぎり、計り採る液量は 50 μ l を最小限界と考えたほうが良いでしょう。5 μ l や 10 μ l を量る場合は、微量専用の、例えば 0.5~10 μ l の範囲が量れるようなピペットを使用すべきです。

●コンタミネーションを防ぐ

試薬を分注するとき、保存ビンに直接ピペットを入れて液を採取しないことです。ピペットには何がついているかわからないと考えることにしましょう。必ず必要量より少々多

い液量を小さな容器に保存ビンから取り出して量り採る様にして下さい。残った液は保存ビンには戻さないことが賢明です。



C. ピペットの精度と測定精度との関係 —ELISA が有利な理由—

イムノアッセイに競合的結合原理に基づくもの(competitive assays)、と非競合的(サンドイッチ)結合原理に基づくもの(non-competitive assays)とがあります。

前者の例としては、RIA (radioimmunoassay) や競合的 EIA (Enzyme immunoassay) などがあり、後者を代表するものとしては、IRMA (immuno-radiometric assay)、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) などが 있습니다。

イムノアッセイの経験者が不思議に感じることは、競合的結合原理によるものよりもサンドイッチ結合によるものの方が測定精度が良いのです。なぜでしょう？ その主原因としてピペッティングが測定に果たす影響を考察して見るとわかります。

RIA のような競合的結合原理による測定系では、標識抗原、抗血清、及び試料がいずれも非常な低濃度で作用しあうので、それぞれのピペッティングの影響が積み重なって結果的にバラツキが大きくなり、測定精度が低下するのです。一般的に RIA の測定精度は、数パーセント程度です。1%を下回ることはありません。また RIA の場合には放射能の測定誤差が加わります。

放射能のバラツキはすなわち放射性同位元素の壊変のバラツキに由来するもので、N cpm の放射能を 1 分間測定するとその標準偏差は N の平方根になります。例えば 10,000 cpm を 1 分間測定する場合には変動係数で表せば 1%になります。

ELISA のような非競合的なサンドイッチ結合による測定法の場合にはどうでしょう。

まず、当然のことですが試料のピペッティングの誤差はダイレクトに測定値に影響します。例えば 1%間違えれば測定値には 1%影響します。これは競合的測定の場合と同じです。ところが抗体については、キャプチャー抗体にしても標識抗体にしても大過剰に加えます。こうなると少々のバラツキは問題になりません。もともと大過剰なのでから反応には影響しにくい筈です。この後は ELISA では酵素活性の測定、IRMA では放射能の測定となります。放射能の測定についてのバラツキは前述の通りで、避けられません。一方、ELISA では酵素活性のバラツキが考えられます。酵素活性の測定に使う色原性基質やカップラーなど、これも大過剰に加えますのでピペッティングの変動の影響は少ないでしょう。ただし washing については洗浄器の水勢の強さや洗浄液の捨て残りなどに注意すべきです。

このように考えると、ELISA で変動係数が 1%以下になる可能性が出て来てもおかしくないでしょう。

従ってピペッティング自体の影響は、非競合的測定系のほうが有利であるということになる

のです。



D. 使用済み試薬等の処理方法

廃棄基準につきましては、県や市等の条例、研究所の規定等に従って処理して下さい。

もしも条例、規定等が未定の際には下記をご参照下さい。

[洗浄液]

界面活性剤とリン酸緩衝液です。多量の水道水と共に流して下さい。

未使用残液も同様に廃棄して下さい。

容器は水道水で洗い、プラスチック廃棄物として廃棄して下さい。

[緩衝液で希釈した標準品、HRP 標識抗体、ビオチン標識抗体、HRP-アビジン溶液]

多量の水道水と共に流して下さい。未使用残液も同様に廃棄して下さい。

容器は水道水で洗い、プラスチック廃棄物として廃棄して下さい。

[発色液の残液：TMB]

未使用残液は有機溶媒として産業（医療）廃棄物処理業者に委託して下さい。または、紙に吸収させて可燃処理して下さい。

容器は水道水で洗い、プラスチック廃棄物として廃棄して下さい。

[反応停止液の残液：1M H₂SO₄]

未使用残液は酸性溶液として産業（医療）廃棄物処理業者に委託して下さい。

または、以下のような中和剤を使用して中和し、その後大量の水とともに流して下さい。容器は多量の水道水で洗い、プラスチック廃棄物として廃棄して下さい。

中和の際は必ず眼鏡やゴーグルを使用して眼を保護して下さい。

万一はねた溶液が目に入った時は、直ちに大量の水道水で洗い、医師の手当てを受けて下さい。

推奨法：（苛性ソーダと重曹の 2 段階中和法）

0.5M NaOH 溶液と 0.5M NaHCO₃ を用意する。

使用法：残液を V ml とすると、0.5M NaOH を 3.5×V ml、少量ずつに分けて加える。その後重曹の 0.5M 溶液を Vml 少量ずつに分けて加える。炭酸ガスの発生は少量で済む。

重曹のみで中和しても良いのですが、1M H₂SO₄ 10ml を重曹で中和すると約 450ml (880mg) の炭酸ガスが発生する計算になります。炭酸ガスに厳しい折から、気になる方は上記の方法ではいかがでしょう。

注意事項：入れすぎても pH9 台にしかならないので便利。

熱と炭酸ガスの発生に注意しながら行う。中和後は多量の水と共に流しに捨てる。

[使用済みプレートとウェル中の発色液 (TMB+反応停止液)]

瓶内部のチューブをカットした噴射瓶またはアスピレーターでウェル中の液体を回収して下さい。アスピレーターで回収する場合には、そのまま水流で流さず、中間にトラップのためのボトルを挿入して下さい。回収した液体は非塩素系（水溶性）有機物として産業（医療）廃棄物処理業者に委託して下さい。

または回収した溶液を反応停止液の場合と同様に中和して廃棄して下さい。

この際、硫酸の濃度は $0.5M$ となっていますので、 $NaOH$ の使用量は回収液の 1.8 倍量、 $NaHCO_3$ の使用量は回収液の 0.5 倍量として下さい。

[使用済み 96 well plate]

上記のようにウェル中の反応液を除去した後水道水で洗浄し、産業（医療）廃棄物処理業者に委託して下さい。

または、96 ウェルの溶液を除去し、水道水で洗浄、滅菌後、一般廃棄物として処理して下さい。滅菌方法はオートクレーブまたは 0.1% 以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい

[検体付着した消耗品(検体保管容器、チップ)]

産業（医療）廃棄物処理業者に委託して下さい。または感染性があるものとして、 1% ホルマリン、 2% グルタルアルデヒドまたは 0.1% 以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。

III. もつと ELISA



A. 誤差について

ELISA を使って行くための様々な問題、特に分析法バリデーションを中心にこれから解説することになりますが、その予備的知識として誤差についてまず説明して置きたいと思います。分析法では、誤差を次のように分類しております。

1. 偶然誤差あるいは確率誤差(accidental deviation, random error)

この意味するところは別な言葉でいえば variation (変動, バラツキ) のことです。これは精密さに関連します。標準偏差 (standard deviation, SD)、あるいは相対標準偏差 (relative standard deviation, RSD)、別称変動係数 (coefficient of variation, CV) で表現される誤差です。

註) RSD と CV は全く同じもので、SD/平均値×100 (%) です。

2. 系統誤差(systematic error)

系統誤差とは真の値との隔たりのことで別名 bias (偏り, バイアス) です。正確さ或いは真度(accuracy)に関連します。測定平均値そのものが問題になります。

両種の誤差による 4 種類の判定が可能になります。

	系統誤差が小さい	系統誤差が大きい
偶然誤差が小さい	精密で、かつ正確	精密であるが不正確
偶然誤差が大きい	正確ではあるが不精密	不精密で、かつ不正確

3. ひどい誤り (mistake, gross error)

あってはならない誤りで、例えば試薬の取り違い、希釈倍率の誤り、目盛りの読み違い、操作順の取り違い、測定器の故障、試薬の変性、ピペットの故障などにより生じたものでまともには取り扱われない過誤です。

以下 ELISA に関して偶然 (確率) 誤差と系統誤差を考えてみましょう。

ELISA の各過程について偶然誤差 (バラツキ) の生じる要因を考える

● ウェルプレート

温度の不均一、構造的不均一

● 試料

試料の濃度不均一 (凍結融解で起こる溶質の不均一分布)

試料の希釈の不均一 (攪拌不全による溶液中での濃度の偏り)

● 試料・標準品添加と結合反応

試料 (標準品) のピペッティング (ピペット選択、使用者の手技)

温度のバラツキ（エッジ現象）、時間的バラツキ（測定者の手技）

●試料添加後の最初の Washing：キャリーオーバー効果

●その後の Washing：洗浄液残りによる影響

●酵素標識抗体（ビオチン標識抗体）添加と反応

温度のバラツキ、時間的バラツキ

標識抗体の非特異的吸着—blank 値増加、低濃度領域での測定感度悪化と
バラツキに関連

●発色液添加と反応

温度のバラツキ、時間的バラツキ

●吸光度測定

Microplate のウェル間の吸光度のバラツキ（ウェル底部の傷、底部の壁の厚さなどによる）

吸光度測定の精度（複数光度計の不均一）

といったことになると思います。

系統誤差：偏りについて—なぜ偏った測定値が出るのか

●標準品に関して

純度不良、重量測定の偏り（例えば水分吸収）、希釈の偏り、吸着現象、構造上の差異（リコンビナント）、など。

●測定試料に関して

採取方法（溶血、乳び）、保存方法（変性）、分解酵素の存在、結合蛋白の存在、測定対象物質の構造多様性、測定に用いる酵素の活性を阻害する物質の添加、標準液とは別ピペットで試料を添加、など。

●抗体に関して

抗体が標準品と試料中の測定対象物質を等しく認識しない。

特異性が不十分で他の物質をも測り込んでしまう。

●測定系、測定法に関して

○検量線作成系と試料の反応系に乖離が生じている。例えば

検量線系のウェルが端にあるために起こるエッジ効果（エッジ現象）、試料の構成成分による抗原抗体反応の速度、反応平衡への影響、沈降反応への影響。

○吸光度測定装置の測定に偏差（例えば光検出器に偏差）がある。

○呈色の時間的減衰。

○検量線回帰式がうまくフィットしていない（真度がずれている）。

などになるでしょう。



B. 求められる分析法バリデーション項目

ICH (International Conference of Harmonization、日米 EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議) で検討され実施項目とされている分析能パラメータがあり、厚生省の医薬審第 338 号で厚生省医薬安全局審査管理課長から各都道府県衛生主管部宛に通達され、「承認申請される新医薬品については、分析法バリデーションに関するテキスト (実施項目) を参考にした分析法バリデーションに関する資料を当該承認申請書に添付すること」とされています。第 14、15 改正日本薬局方の参考情報にも記されています。その内容は次のようなものです。

1) 分析法 (Analytical procedure) (定義)

2) 特異性 (Specificity)

種々の共存物の存在下で分析対象物を正確に測定できるか

3) 真度 (Accuracy, Trueness)

真の値 (認証、合意された) と実測値との一致の程度

4) 精度 (Precision)

均質な検体から多数回採取した複数の試料の測定値間の一致の程度

4.1) 併行精度 (Repeatability)

短時間の間に同一条件下で測定する場合の精度 (= intra-assay precision)

4.2) 室内再現精度 (Intermediate precision)

同一施設内で試験日、実施者、器具、機器等を変えて測定する場合の精度

4.3) 室間再現精度 (Reproducibility)

異なった施設間で測定する場合の精度

5) 検出限界 (Detection Limit)

分析対象物の検出可能な最低の量をいう。定量出来る必要は無い

6) 定量限界 (Quantitation Limit)

適切な精度と真度で定量できる分析対象物の最小の量

7) 直線性 (Linearity)

一定の範囲内で試料中の分析対象物の量と直線関係にある測定値を与える能力

(イムノアッセイの場合には厳密には成立しない)

8) 範囲 (Range、測定範囲)

適切な真度、精度、直線性を与える試料等の分析対象物の上限および下限の間隔

9) 頑健性 (Robustness)

少しくらい分析法の条件が変わっても測定値が影響を受けにくい能力

以下それぞれの項で該当項目について順次解説して行くことにします。



C. ELISA での検量線と測定値の計算

イムノアッセイのキットを用いた場合の検量線の描き方やそれを用いた試料の測定値の計算などについて、よく質問を受けます。検量線は測定原理によって変わります。競合的結合原理(competitive binding)を用いる測定の場合には検量線についてかなり近似的な理論的解析がなされており、X 軸、Y 軸に何をプロットするか、で様々な検量線を作ることが出来、またどのような回帰式を用いるかが選択されます。シバヤギ製品のほとんどは非競合的測定法(non-competitive assay)に属する ELISA ですが、その検量線をどう描くかという質問が多いのです。ここでは実例を挙げながら極めて初歩的な解説を試みましょう。

1. ELISA の指標

指標として酵素活性、蛍光強度等が用いられます。

酵素 → 色原性基質 → 色原 → 呈色

酵素 → 蛍光色原性基質 → 蛍光性物質 → (励起光) → 蛍光

となり、呈色の場合には吸光度、蛍光の場合には蛍光強度が指標とされます。

吸光度と比色定量

比色定量は Lambert-Beer's law に基づいています。

$$\text{吸光度} = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon l c$$

ϵ : モル吸光係数 (mol-cm) l : 吸収層 c : 濃度

つまり、透過率の逆数の対数(吸光度、absorbance と呼ばれる)は呈色物質の濃度に比例するということです。

一般に比色計では吸光度(absorbance)と透過率が示されるようになっています。

例えば入射光の 50%が吸収される場合には $100/50=2$ $\log_2=0.301$ 、透過率 10%では吸光度 1.0、1%の透過率では 2.0 となります。従って吸光度が 2.5 以上では精度を確保するのはなかなか困難です。ELISA の測定範囲の上限はこの辺に設定されています。

蛍光強度

$$F = \phi I_0(1 - 10^{-\epsilon c l})$$

I_0 : 励起光強度 ϕ : 量子収量 ϵ : 分子吸光係数 l : 吸収層 c : 濃度

希薄溶液では $F = 2.3 \epsilon c l k \phi I_0$ k : 計測器定数

となり、放射能の場合と同様酵素によって変換されて生じた物質の濃度と直接関連する数値です。従って酵素活性を直接示していると考えて良いでしょう。

2. ELISA では測定値をどう計算するか

a. マニュアル計算

検量線を描く

ノーマル・スケールの方眼紙を用いて縦軸に吸光度、蛍光強度、横軸に標準品濃度そのものをとることもあります。(低濃度の標準点の間隔が狭くなります)

片対数方眼紙を用いて検量線を描く場合：縦軸に吸光度、蛍光強度、横軸に標準品濃度の対数をとります。(低濃度の標準点の Y 軸方向の間隔が狭いままで)

両対数方眼紙を用いて縦軸に吸光度、蛍光強度の対数を、横軸に標準品濃度の対数をとります。プロットした標準点を自在定規を使ってつなぎ、検量線を作成します。X 軸、Y 軸方向ともにほぼ等間隔となります。

試料濃度を計算する

各試料の absorbance や蛍光強度から Y → X で読み取り、試料についての濃度を求めます。

●マニュアル計算についての注意事項

①ノーマル・スケールの場合

広い範囲で検量線を描くと、低濃度領域の標準点の間隔が狭くなり、判定することが難しくなります。自分の試料の吸光度が低濃度領域になる場合は、高濃度の部分を切り捨て、低濃度領域のスケールを拡大すると良いでしょう。

②片対数スケールの場合

高濃度領域は良いのですが、検量線の勾配が低濃度領域で緩いため、Y 値に対する肉眼的な判定が難しくなります。従って低濃度領域ではマニュアル計算での使用は勧められません。

③両対数スケールの場合

低濃度、高濃度いずれに関しても平等に判定が可能です。マニュアル計算にはこの方法を推奨します。

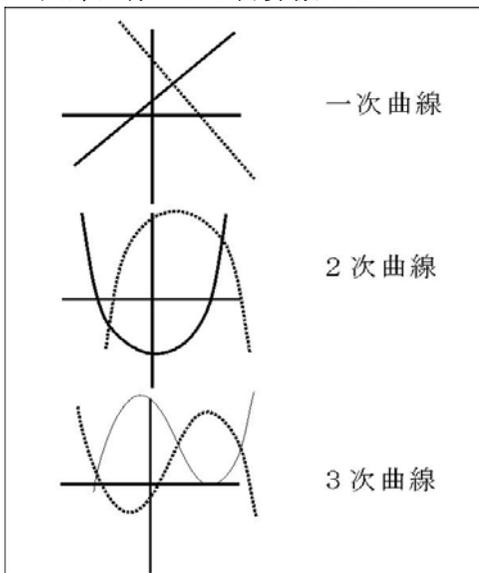
以下に示す計算機処理の場合には、どんなスケールを採っても、回帰曲線が標準点とよくフィットしていれば、問題はありません。回帰曲線が良くフィットするような変換法が望ましく、その為には、曲線の曲がりの緩やかになるような方法が有利です。

Blank の吸光度をそれぞれの標準点の吸光度から差し引いた値を使って検量線を描くのもフィットネスを良好にする方法となります。低濃度での曲線の勾配が緩いときには有効です(曲線の頂点が標準点の間に入ってしまうことがあるためです)。

また、一般的に、試料が低濃度領域にある場合、高濃度部分を除外して回帰曲線を計算する

ほうがより良くフィットします。ただし、この場合、2次曲線ならば標準点は3点以上、3次曲線ならば4点以上が計算上必要です（係数の数を考えて下さい）。

b. 回帰曲線による計算機処理



検量線のデータから、回帰曲線をまず求めます。

モデル関数

一次関数（一次回帰直線）：Logit 変換の場合に実用的です。

二次関数（二次回帰曲線）：曲線が1方向に曲がっている場合に有効です。

三次関数（三次回帰曲線）：変曲点のあるシグモイド、逆シグモイド型に対応できます。

勿論変曲点の無い放物線の場合にも使えます。

4 パラメータロジスティックモデル：シグモイド、逆シグモイド曲線に適合します。

現在プレート・リーダーにプログラムが導入されている場合があります、それを用いれば改めて数値を入力する手間が省けます。

1次回帰

$$Y = aX + b \quad \text{パラメータ} = 2$$

2次回帰

$$Y = aX^2 + bX + c \quad \text{パラメータ} = 3$$

3次回帰

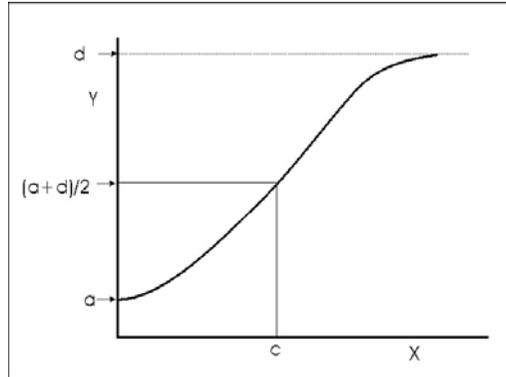
$$Y = aX^3 + bX^2 + cX + d \quad \text{パラメータ} = 4$$

Four parameter logistic model

$$Y = \frac{a-d}{1+(x/c)^b} + d \quad \text{または} \quad Y = d - \frac{d-a}{1+(x/c)^b}$$

（右上りの曲線の場合にはこのほうが分り易い）

$X = 0$ の時 $Y = a$
 $X = \text{infinity}$ のとき $Y = d$
 $X = c$ の時 $Y = (a + d)/2$ (a と d の中点)とします。



b : 曲線の形を調整
 式からお分かりのように、曲線の形によってはよくフィットしない場合があります。いずれにしても、用いる回帰曲線がどの程度標準点にフィットしているかを標準点の Y 値から X 値を計算して調べておく必要があります。

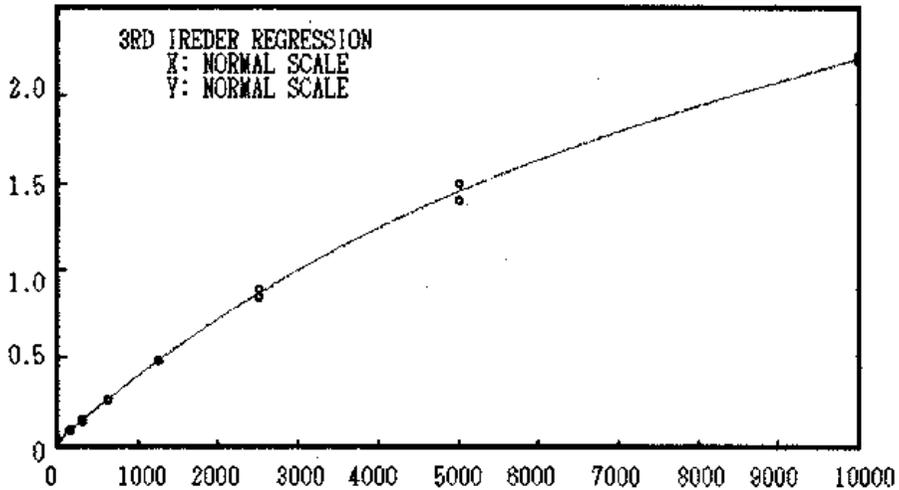
c. 回帰と計算の具体例

ELISA においては Y 軸に吸光度、蛍光強度等を取り、X 軸に X 、や $\text{Log } X$ をとると、測定範囲を広くとれば高濃度領域でも曲線の勾配が減少してきてシグモイドタイプとなります。部分的には（低-中濃度領域では）放物線様となります。X 軸、Y 軸にどのようなスケールを用いれば良いかは一長一短がありますが、以下にその実際をシバヤギのラットインスリン ELISA キット T タイプを例として示してみます。勿論キットが変われば曲線の形は変わってくるのですべてのキットがこのようになる訳ではありませんが、傾向は同じです。検量線用の生データは下の表になります。

標準品濃度 pg/ml	Absorbance (450-620nm)	
0	0.031	0.031
156	0.086	0.087
313	0.142	0.145
625	0.258	0.263
1250	0.483	0.483
2500	0.850	0.890
5000	1.401	1.449
10000	2.199	2.221

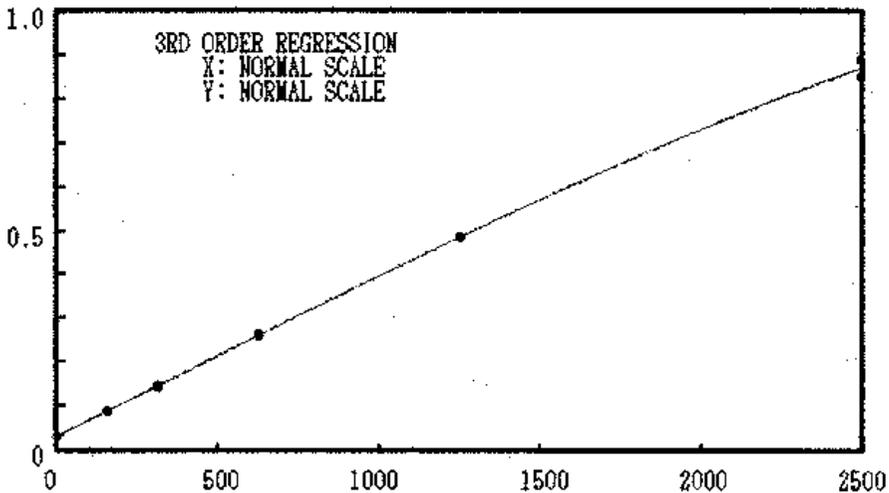
標準品濃度が倍々となっています。これは測定範囲が広いと、測定精度が濃度に対して一定、つまり相対誤差が一定となる傾向があるため、測定範囲が広い場合にはこのような濃度設定のほうが良いのです。注意：対数スケールの場合には当然ゼロ点は除外するか、ゼロ点の吸光度を全体から差し引いて計算して下さい。

X軸とY軸を共にノーマル・スケールにすると



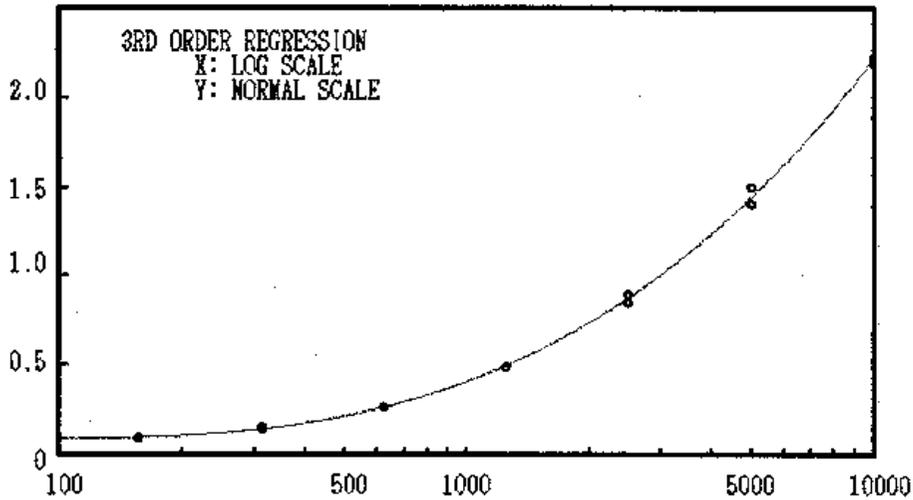
この場合回帰曲線は3次多項式を使いました。よくフィットした曲線になっています。ここには示ませんが、2次回帰でもかなりよくフィットします。

この場合問題は各標準点の距離が一定にならず、低濃度領域では過度に近接するので、方程式から求める場合にはかまわないとしても、マニュアル計算で測定濃度を計算するには向いていません。試料中の測定対象物の濃度範囲が低濃度領域に集まっている場合には、下の図のように高濃度部分を切り捨てて低濃度部分だけの検量線を描くことをお勧めします。



156-2500pg/mlの範囲にして検量線を作製してみると、上のような検量線が出来ます。この範囲では直線に近いカーブとなり、3次式では勿論非常によくフィットします。マニュアルでの読み取りも比較的楽に出来そうです。

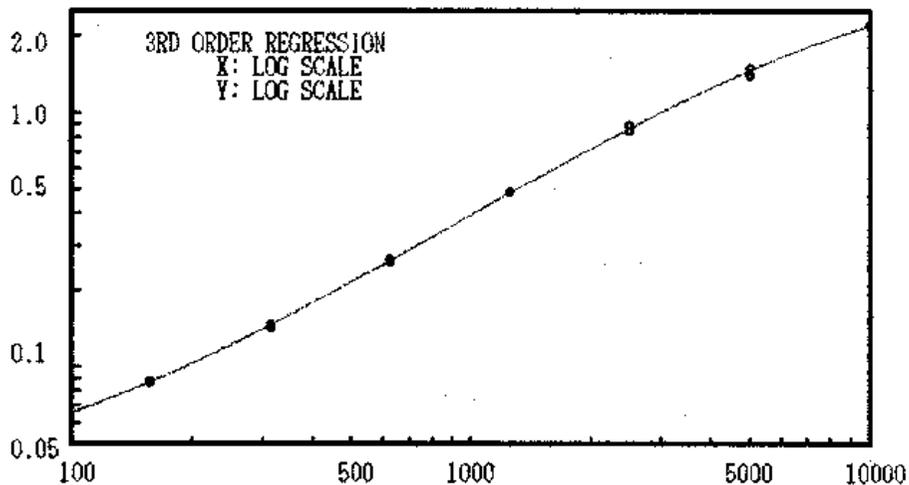
X軸を対数スケールにし、Y軸はノーマル・スケールにすると



つまり片対数方眼紙を使用することになります。
一般的にはこのようなスケールのとり方で表示されています。
当然各標準点の間隔は等しくなりますが、しかし、低濃度領域の勾配が緩やかになってしま
う。このような曲線を回帰させようとする、フィッティングは一般的に良好にはなりません。
筆者としては、このタイプのスケールのとり方はお勧めしません。

X軸とY軸を共に対数スケールとすると

両対数方眼紙を使用するのです。



ほとんど直線的といって良いくらい、なだらかなカーブとなり、この場合3次曲線が良く
フィッティングしています。筆者としてはこのプロットをマニュアル計算、コンピュータ
計算共にお勧めします。

気に入った検量線が出来たら、Yの値を入力してXを求めて下さい。

試料を前もって希釈している場合には希釈倍率を測定値に掛けて試料の測定値とします。

筆者（若林）が作製してシバヤギから無料提供している BASIC プログラムでは検量線の描画を X 軸、Y 軸を自由に設定して行い、1 次、2 次、3 次回帰曲線からよくフィットしているものを選んで試料の濃度計算を行うことが出来ます。

シバヤギではこのプログラムを顧客の皆様に限りご提供いたしております。

ただし、プログラムが BASIC ですの、WINDOWS で BASIC を作動させるための中間ソフトが必要です。このソフトは「BASIC/98 for Windows」Ver. 5 という名前で有限会社 電脳組から売り出されています。パソコン専門店またはパソコンソフトを取り扱っている電機量販店で注文すれば簡単に、安く入手できます。このソフトを入手したら、シバヤギに連絡いただければ回帰・計算プログラム、および使用法解説をお送りします。

BASIC はいやだと言う方には EXCEL を使用する方法をご提案します。

d. EXCEL による ELISA 計算

以下の二通りの方法をご提案しております。

その 1 対数変換したデータで X, Y を入れ替えた検量線を使って計算する方法

その 2 対数変換したデータで X, Y を入れ替えずにゴールシークの機能を使って検量線を描き計算する方法。

EXCEL は表計算ソフトとしては非常に有用です。

ただ我々が日常使用する ELISA での測定で、検量線を描き、それを用いて測定試料の計算をするには余り向いていません。検量線の回帰式 $Y = f(X)$ で Y の値から X を求めることは「ゴールシーク」の機能を用いれば可能ですが、数値をひとつひとつ計算して行くため、能率のとは言えません。その逆に X から Y を求めることは簡単に出来ます。このことから、まず ELISA の測定結果の計算を X と Y を逆転することから行う方法をご提案します。

計算するためのテンプレートは、シバヤギのメール会員に登録され、パスワードを取得したお客様に公開され、ホームページからダウンロードすることが出来ます。以下にテンプレートの作り方と使用法をお示しします。

その 1 対数変換したデータで X, Y を入れ替えた検量線を使って計算する方法 検量線のテンプレート

まず次ページのような表を作ります。

セル B2 には =Ln(A2), E2 には =(C2+D2)/2, F2 には =E2-\$E\$9, G2 には =Ln(F2), H2 には =\$K\$11*G2^3+\$K\$12*G2^2+\$K\$13*G2+\$K\$14, I2 には =EXP(H2), J2 には =I2/A2*100 を書き入れます。そして B2 から J2 をフィルハンドルを用いて B8 から J8 までドラッグしてコピーします。すると次ページのような警告が入ります。これで一応完成です。第 1 行目、および J11 から J14 には表に書いてあるように記入して下さい。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Conc.	Ln(conc)	Abs 1	Abs 2	Mean	Δ blank	Ln(Δ blank)	CalLn(conc)	Fitness	真 度	
2		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
3		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
4		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
5		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
6		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
7		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
8		#NUM!			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
9	Blank				0						
10											
11										a (X ³)	
12										b (X ²)	
13										c (X)	
14										d (const)	

使用法

検量線用アッセイデータから、先ず G 列までを作ります。

この表の A 列に標準品濃度（濃いほうから）、C 列と D 列に対応する二重測定の実験の吸光度を記入して下さい。すると G 列までの表が完成しますので、

この表に基づいて以下のように X、Y を入れ替えたグラフを作成して下さい。

逆グラフと近似方程式を求める (EXCEL 2003 までを使用される場合)

- 1) ツールバーから「グラフ・ウィザード」をクリック。
- 2) 「散布図」を選ぶ。
- 3) プロットのみ（線では結ばない）を選択し（デフォルトになっている）、次へ
- 4) データ範囲としては Ln(conc)の列（この例では B2-B8）を指定（ゼロの部分は除く）する。
「データ系列」は「列」をチェックする。
- 5) 「系列」タグをクリックし、X のデータ範囲を選択。
- 6) X のデータ範囲として Ln(Blank)の列（この例では G2-G8）を指定する。「次へ」
- 7) (この項は実行しなくてもよい)「タイトルとラベル」タグでグラフのタイトルや、X 軸、Y 軸の名称を記入し、「凡例」のタグをクリックして、「凡例を表示する」のチェックを外す。
- 8) 「次へ」を省略して「完了」のボタンを押すとデータシートにグラフが描かれる。これで選択した標準品濃度をカバーするグラフが描ける。

EXCEL 2007 を使用される場合

- 1) データ範囲 (B2-B8 と G2-G8) を指定し、「挿入タグ」をクリック。「散布図」をクリック。
- 2) リストの最初の線でつながない散布図をクリック。→横軸が濃度、縦軸が吸光度の散布図が得られる。
- 3) グラフの上をクリックしてグラフツールとし、「デザイン」タグをクリックし、「データの選択」をクリックする。開いたウィンドウで凡例項目の「編集」をクリック。「系列 X の値」のボタンを押して吸光度対数の範囲 (G2-G8) を指定。「系列 Y の値」のボタンを押して、濃度の範囲 (B2-B8) を指定し、「OK」で X 軸と Y 軸が入れ替わる。更に「OK」で散布図が完成。
- 4) ツールはまだグラフツールになっているので、そのまま「レイアウト」タグをクリック。「近似曲線」を選び最下段の「その他の近似曲線オプション」を選択。「多項式近似」を選び次数を 3 とする。下の方にある「グラフに数式を表示する」と「グラフに R² 値を表示する」にチェックを入れる。ダイアログウィンドウを閉じるとグラフが完成する。

以後の計算

グラフに示された式が $y = ax^3+bx^2+cx+d$ であれば、K11, K12, K13, K14 のセルに、X³, X², X, の係数及び定数項、a, b, c, d を書き入れます。

H 列に計算された対数濃度が示され、真度まで計算が終わります。I 列と A 列を比較して適合性を調べると良いでしょう。Fitness の指標として真度がパーセンテージで J 列に示されています。

三重測定の場合はそれに見合った修正を行って下さい。

試料計算のテンプレート

次ページのような表を作ります。行の数は試料の数に対応させて下さい。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	No.	Abs 1	Abs 2	ΔBk1	ΔBk2	Ln(1)	Ln(2)	AsVal. 1	AsVal 2	Mean 1	SD	CV		
2	1			0	0	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!		
3	2												Blank	
4	3													
5	4												a	
6	5												b	
7	6												c	
8	7												d	

セル D2 に =B2-\$N\$3, と書き入れ、D2 のフィルハンドルを E2 にドラッグします。F2 に =LN(D2)と書き入れ F2 のフィルハンドルを G2 にドラッグします。H2 に =EXP(\$N\$5*F2^3+\$N\$6*F2^2+\$N\$7*F2+\$N\$8)と書き入れ、H2 のフィルハンドルを I2 にドラッグします。

J2 には =(H2+I2)/2 と書き入れ、K2 には =STDEV(H2:I2), L2 には =K2/J2*100 と書き入れて下さい。

アッセイ後、セル N3 に検量線からの Blank の吸光度の平均値を書き入れます。そして セル N5, 6, 7, 8 に検量線の方程式の係数と定数項を書き入れます (検量線シートの K11~14 をコピーして下さい)。

これで最初の試料の吸光度 1、2 を B2, C2 に書き入れればこの行が完成します。

2 番目以降の試料の吸光度を書きこみ、D2 から N2 迄のフィルハンドルを最後の試料までドラッグすると計算は終了します。

既製のテンプレートがシバヤギのウェブサイトからダウンロード出来ます (会員用)。ダウンロードしたらコピーしてお使い下さい。

以上は 2 重測定の例ですが、3 重測定のためのテンプレートも用意してあります。

その2 対数変換したデータで X、Y をそのままに検量線を使って計算する方法 (Goal seek 法)

検量線のテンプレート作製

まず次ページのような表を作ります。 検量線用アッセイデータから、G 列までを作るのはその1と同様です(標準品濃度は Blank をふくめて8段階として説明しています)。

セル B2 には =Ln(A2), E2 には =(C2+D2)/2, F2 には =E2-\$E\$9, G2 には =Ln(F2),
を書き入れます。これは「その1」と全く同じです。

H2 には =(\$K\$10*I2^3)+(\$K\$11*I2^2)+(\$K\$12*I2)+\$K\$13 を書き込みます。

I2 には 1 を書き込み、J2 には =EXP(I2), K2 には =J2/A2*100 を書き込み、

B2 から K2 までドラッグしてフィルハンドルを K8 までドラッグします。これでテンプレートが完成し、注意事項を含む表が完成します。

使用法

- 1) この表の A 列に標準品濃度(濃いほうから)、C 列と D 列に対応する二重測定の実験の吸光度を記入する。C9, D9 には blank の吸光度を書き入れる。すると G 列までが完成する。

この表に基づいてグラフを作成する。

グラフと近似方程式を求める (EXCEL 2003 までを使用する場合)

- 1) ツールバーから「グラフ・ウィザード」をクリック。4プロットのための散布図(デフォルトになっている)を選ぶ。
- 2) データ範囲としては Ln(conc)の列(この例では B2-B8)を指定(ゼロの部分は除く)する。「データ系列」は「列」をチェックする。
- 3) 「系列」タグをクリック、Y のデータ範囲(G2-G 8)を選択。
- 4) X のデータ範囲として Ln(conc)の列(この例では B2-B8)を指定する。「次へ」
- 5) (この項は特に必要はない) 「タイトルとラベル」タグでグラフのタイトルや、X 軸、Y 軸の名称を記入し、「凡例」のタグをクリックして、「凡例を表示する」のチェックを外す。
- 6) 「完了」のボタンを押すとデータシートにグラフが描かれる。
これで選択した標準品濃度をカバーするグラフが描ける。
X 軸、Y 軸の目盛り線は何処にあってもかまわないが気になれば直す。
- 7) グラフ上のデータの点をひとつ右クリックして「近似曲線の追加」を選び、3 次多項式を選び、オプションをクリックして方程式と R² を表示させるようにす。こうして 3 次の近似方程式がグラフに表示される。

近似方程式 $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$ の係数と定数項 a, b, c, d を K11 から K14 に書き込む。

EXCEL 2007 を使用する場合

- 1) データ範囲 (B2-B8 と G2-G8) を指定し、「挿入タグ」をクリック。「散布図」をクリック。
- 2) リストの最初の線でつながらない散布図をクリック。→横軸が濃度、縦軸が吸光度の散布図が得られる。
- 3) ツールはまだグラフツールになっているので、そのまま「レイアウト」タグをクリック。「近似曲線」を選び最下段の「その他の近似曲線オプション」を選択。「多項式近似」を選び次数を 3 とする。

下の方にある「グラフに数式を表示する」と「グラフに R-2 値を表示する」にチェックを入れる。

ダイアログボックスを閉じるとグラフが完成する。

近似方程式 $y = ax^3+bx^2+cx^2+d$ の係数と定数項 a, b, c, d を K11 から K14 に書き込む。

これでゴールシークを使う準備が整いました。

標準点吸光度から濃度の計算

ゴールシークを起動する。ゴールシークは EXCEL2003 まではツールをクリックすれば見付かります。

EXCEL2007 の場合はデータタブをクリックして What if をクリックすれば見付かります。

ゴールシークの欄をクリックすると、ダイアログボックスで 3 箇所の書き込みが求められる。最初は数式の入っているセル、これには H2 を指定する。

目標値の欄には G2 の数値を書き込む(直接書き込む必要がある。セルを指定してもだめ)。

ここで Enter キーは使わないこと。 エラーになる。

マウスで「変化させるセル」へ行き、I2 を指定する。

OK ボタンを押せば計算が始まり。答えが I2 の数字と入れ替わってに記入される。そこで OK を押す。これでこの行に関しては真度まで計算が終わる。

次にゴールシークを起動して、次の行、H3 の指定、G3 の数値入力、I3 の指定を行えばこの行の計算が行われる。

以下同様に H8 まで行って下さい。

ゴールシークのダイアログボックスへの入力には集中力が必要、間違えやすいのでご注意！

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Conc.	Ln(conc)	Abs 1	Abs 2	Mean	Δ blank	Ln(Δ blank) (目標値)	数式書込み セル	Ln(calconc) 変化セル	Calconc	真度 (Trueness)
2		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
3		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
4		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
5		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
6		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
7		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
8		#NUM!			0	0	#NUM!	0	1	2.718282	#DIV/0!
9	Blank				0						
10										a (X ³)	
11										b (X ²)	
12										c (X)	
13										d 定数項	

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1	No.	Abs 1	Abs 2	ΔBk 1	ΔBk 2	Ln(1) (目標値 1)	Ln(2) (目標値 2)	数式 1	数式 2	Cal. Ln 1 変化 1	Cal. Ln 2 変化 2	AsVal 1	AsVal 2	Mean	SD	CV		
2	1			0	0	#NUM!	#NUM!	0	0	1	1	2.7183	2.7183	2.71828	0	0	Blank	
3	2			0	0	#NUM!	#NUM!	0	0	1	1	2.7183	2.7183	2.71828	0	0		
4	3			0	0	#NUM!	#NUM!	0	0	1	1	2.7183	2.7183	2.71828	0	0		
5	4																a	
6	5																b	
7	6																c	
8																	d	
8																		

試料計算テンプレートの作製

D2には =B2-\$R\$2 を書き入れ、B2のフィルハンドルをE2にドラッグしてコピーします。F2には =LN(D2)を書き入れF2のフィルハンドルをG2にドラッグしてコピーします。H2には =\$R\$5*J2^3+\$R\$6*J2^2+\$R\$7*J2+\$R\$8 を書き入れI2にコピーします。J2とK2には1を書き入れる。L2には =EXP(J2) を書き入れM2にコピーします。

N2には =(L2+M2)/2、O2には =STDEV(L2:M2)、P2には =O2/N2*100 を書き入れます。

計算の実行

まず、R2 に検量線シートから Blank の吸光度の平均値 (E9 にある数字) を書き入れます。

次に検量線シートの近似方程式の係数と定数項をコピーしてこのシートの R5 から R8 に貼り付けます。

この後、D2 から P2 を試料の数だけコピーし、全ての試料の吸光度 Ab1 と Ab2 を入力するとゴールシークを使用する前のステップが完成します。H, I, L, M, N 列に表れる数値はそのままにしておきます (ゴールシークの計算が終わると全て正しい値に変わります)。

ゴールシークを起動し H2, F2, J2 の組み合わせから J2 に入る解を求める。次に I2, G2, K2 から解を求めます。以下順次ゴールシークを起動しては解を求めて行きます。

測定値の平均と標準偏差、CV は自動的に計算されて行きます。試料数は自由です。

3. 検量線の吟味

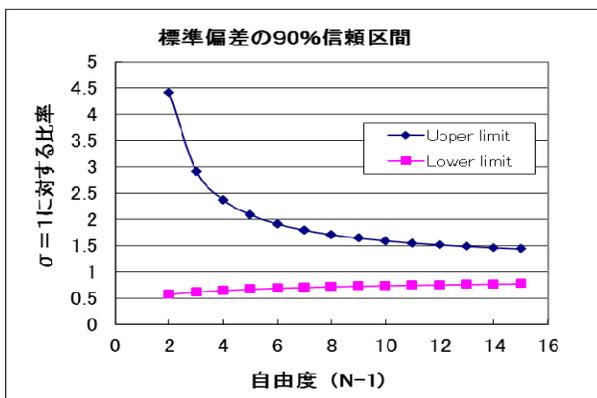
a. 検量線についての偶然誤差と系統誤差

検量線を描いて測定値を計算するという事は、検量線の偶然誤差は試料の偶然誤差に上乘せられるということの意味です。ただ検量線は多くの標準点から計算されるためバラツキはかなり小さく抑えられるので、通常あまり問題にしません。ただ検量線を吟味するには心に留めておくべきでしょう。検量線の系統誤差は試料の系統誤差に共通するものと共通しないものがあります。共通するものとしては：試薬の要因、ピペットの要因、洗浄の要因、発色の要因など、共通しないものとしては：標準品の純度、標準液の組成などです。後者は試料の測定値の正確さ、ICH 合意事項でいえば真度 (Accuracy, Trueness) を左右する重大な要因となります。このことについてはアッセイ系の真度の項で説明します。

b. 検出限界 (Detection Limit) と定量限界 (Quantitation Limit) について

検出限界とは分析対象物の検出可能な最低の量をいいます。いわゆる「測定感度

(sensitivity)」呼ばれたこともあります。これははっきりと存在が検出できれば良く、定量出来る必要は無いのです。ELISA で言えば、以前はブランクの吸光度+2SD を与えるような測定対象物質の量或いは濃度とされることが多かったのです。母集団の標準偏差を σ とすれば確かに平均値 $\pm 2\sigma$ 範囲は母集団の



約 95%を含む領域になりますが、限られた試料数から求められる SD は右の図で示されるように信頼性が充分ではありません。この図は $\sigma = 1$ の時、標本数の自由度と得られる標準偏差の 95%信頼区間を示しています。

$$\sigma \text{ の下限} : \sqrt{\frac{n-1}{X_H^2}}s \qquad \sigma \text{ の上限} : \sqrt{\frac{n-1}{X_L^2}}s$$

X^2 (カイ自乗) は自由度 $n-1$ に対応する $p=0.025(H)$ 及び $p=0.975(L)$ の値
 s は標本から得られた標準偏差
 σ は真の標準偏差

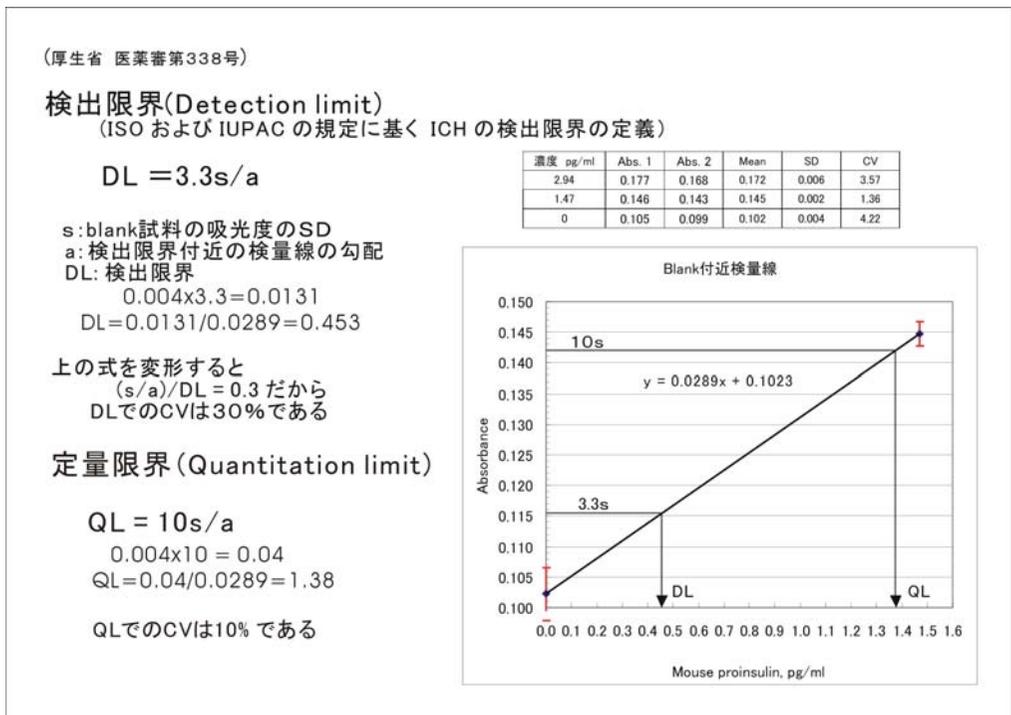
そこで ISO および IUPAC の定義に基づく ICH の検出限界の合意は、

$$DL = 3.3s/a$$

s : blank 試料の吸光度の SD

a : 検出限界付近の検量線の勾配

ということになっています。定義の式を変形してみるとわかりますが DLでの CVは 30% に相当します。例としてシバヤギのマウスプロインスリン ELISA キットのブランク近傍検量線で DL と次項で述べる QL をお示ししましょう。



一方、**定量限界(Quantitation Limit)** という定義も定められています。これは、適切な精度と真度で定量できる分析対象物の最小の量と言うことで、

$QL = 10s/a$ と定義されています。QLでの CVは 10%に相当します。

c. プロゾーンについて

ELISA の測定系で標準品濃度をどんどん増やして行くと標準品濃度に対して吸光度の増加する割合、つまり検量線の勾配は徐々に減少しプラトーに達してしまいます。言い換えれば固相化抗体に結合する抗原の割合が減少して行くことを意味します。検量線の勾配減少は精度係数（確率誤差／勾配）の増大となって測定値の信頼性は失われます。このような領域はプロゾーンと言われ、測定範囲の限界を示すものです。通常のキットでは、最大標準品濃度がプロゾーンに掛かる手前に設定されていますので、表面には現れません。またそのような領域では吸光度は3以上つまり99.9%以上になってしまうので分光光度計の限界に近くなってしまいます。吸光度は2.5以下になるようにELISAは設計されています。

d. 範囲 (Range) について

ICH の合意事項では、範囲(Range)とは「適切な真度、精度、直線性を与える試料等の分析対象物の上限および下限の間隔」と定義されています。言い換えれば測定可能範囲を指しています。ELISA キットの製造者の側から言えば検量線の端から端まで、つまり測定が保障される範囲にほかなりません。

実は或るひとつの試料をいくつかのウェルで測定した場合得られた測定値の「最大値－最小値」のことも range と呼ばれるので、混同しないように気を付けて下さい。（ついでながら、2重測定の場合標準偏差は $\text{range}/\sqrt{2}$ です。これを覚えておくと楽に計算できます）

e. 検量線の評価目安

どのような検量線が良いのか、*Pharm Res 20: 1885-1900, 2003* の論文では APPS Ligand Binding Assay Bioanalytical Focus Group の推奨として以下のような条件が述べられています。ひとつの目安になるでしょう。

○2重測定の吸光度の乖離が小さいこと。

或る2重測定の標準点の吸光度が A1 と A2 であったとすると。

A1 と A2 の平均値に対する $|A1 - A2|$ の 1/2 の割合(%)が 15% 以下であること。

○6濃度以上の標準点で6回の検量線を作った時、

逆回帰濃度（検量線の回帰曲線から計算した各標準点の濃度）について、

各点の真度（この場合の真度は標準点の逆回帰濃度／名目濃度×100）が 80－120

（75－125）%であること。註）名目濃度とは各標準液の作製濃度

全ての標準点での真度（n=6）の平均値が 85－115（80－120）%であること。

註）カッコ内は最小定量限界 (QL) での数値

逆回帰濃度の変動係数(CV)が 15% 以下であること(n=6)。

○選択性(Selectivity)：低濃度における限界識別能

測定試料(n=6)に最小定量限界濃度の標準品を加えたときの回収率が 75%以上であること。

f. 検量線の再現性

各標準点の吸光度はアッセイ毎に大きく変わらずほぼ一定しているか。

検量線の形はほぼ一定しているか。

各標準点での回帰曲線の真度は一定しているか。

ELISA キットをルーチンに使用する場合にはこのような点を毎回チェックしておくといいでしょう。

4. ELISA の吸光度のバラツキは測定値にどう反映するか

ELISA は最終的に酵素によって変換された色原性基質の呈色を吸光度(absorbance)として表現します。そして検量線は縦軸に吸光度、横軸に測定物質の標準品濃度をとって描かれます。

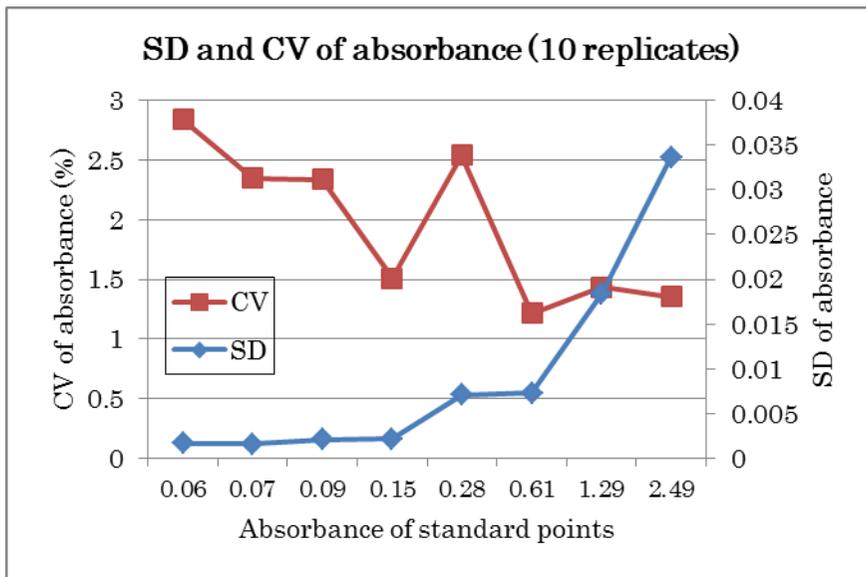
ではそれぞれの標準点に対応する吸光度はどの程度バラツクものなのでしょうか。勿論それはアッセイ系の性能と実施者の腕前に大きく依存するのですが、シバヤギでのいくつかの実例を基にその傾向を観察して見ましょう。

そして次に、吸光度におけるバラつきが測定値にどの程度のバラツキとして反映するものかを調べてみましょう。

先ずあるキットでそれぞれの標準品濃度を 10 重測定した結果をお目にかけます。この位の多重測定をすると標準偏差はかなり信用できるでしょう。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean	SD	CV%
2.398	2.484	2.492	2.464	2.511	2.513	2.486	2.505	2.500	2.492	2.4845	0.0336	1.3545
1.286	1.271	1.272	1.263	1.279	1.300	1.299	1.306	1.285	1.323	1.2884	0.0184	1.4349
0.610	0.604	0.609	0.612	0.610	0.602	0.597	0.606	0.602	0.624	0.6076	0.0073	1.2173
0.275	0.292	0.283	0.286	0.284	0.284	0.271	0.290	0.273	0.287	0.2825	0.0071	2.5375
0.147	0.147	0.144	0.152	0.146	0.149	0.146	0.146	0.149	0.148	0.1474	0.0022	1.5068
0.086	0.088	0.091	0.091	0.092	0.092	0.088	0.089	0.089	0.092	0.0898	0.0021	2.3358
0.070	0.071	0.070	0.075	0.069	0.071	0.071	0.070	0.070	0.072	0.0709	0.0016	2.3460
0.060	0.064	0.060	0.061	0.060	0.060	0.061	0.061	0.061	0.057	0.0605	0.0017	2.8362

前の表を分かり易いようにグラフにしてみました。



このキットでは吸光度は最高でほぼ 2.5 です。吸光度のバラツキつまり標準偏差は吸光度が小さくなると明らかに減少します。一方、吸光度の平均値に対する標準偏差の割合を見ると吸光度の減少とともに大きくなって行く傾向が見えますが最小と最大との比はほぼ 2 倍です。つまり絶対誤差は吸光度に従って大きく変化しますが相対誤差はそれほど変わらないと見て良いでしょう。

吸光度のバラツキと測定値のバラツキ

次にこの測定系を使ってもし吸光度が 2% 多かったら測定値はどの程度変わるかを計算してみました。

STD.	吸光度	計算値	吸光度+2%	計算値	Δ%
0.1	0.063	0.1004	0.06426	0.1047	4.28
0.25	0.105	0.2496	0.1071	0.2572	3.04
0.5	0.199	0.5018	0.2034	0.5124	2.11
1	0.426	0.9977	0.4345	1.0159	1.82
2.5	1.173	2.5119	1.1965	2.5612	1.96
5	2.206	4.9683	2.25	5.0902	2.49
10	3.558	10.0479	3.629	10.4286	3.79

Δ%で示した数値が元の吸光度から 2%吸光度がずれたと考えたときの測定値の変化です。

即ち標準品濃度 0.5~5ng/ml の範囲内では吸光度の変化が測定値の変化に大体対応してい

ると見て良いでしょう。0.5ng/ml より薄い濃度や 5ng/ml より濃い濃度では吸光度の変動は相対的に測定値にそれ以上の大きな影響を与えると考えられます。

とは言うものの、ラジオイムノアッセイなどの競合的測定法よりは低濃度での測定制度のバラつきははるかに小さいということが出来ます。これは両対数スケールでプロットした際の検量線の勾配が低濃度領域でも RIA ほど小さくならないからなのです。

低濃度でのバラつきの増加は、光度計の測定のバラつきやウェルプレートの光学的均一性(厚さとか傷)の問題が原因となっている可能性があります。

そこで緩衝液だけをウェルに入れて 48 個分吸光度を測定してみました。

測定結果は次の通りです。

0.006	0.006	0.005	0.004	0.004	0.004	0.003	0.004	0.004	0.004	0.002	0.003
0.004	0.003	0.001	0.003	0.002	0.003	0.003	0.004	0.002	0.002	0.003	0.002
0.005	0.004	0.003	0.004	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001
0.005	0.005	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	0.002	0.004

小数点以下 3 桁がこの器械の測定限界ですので、それ以上の細かい情報は得られません。

Mean	SD	CV(%)
0.00325	0.00112	34.5

吸光度自体は勿論非常に少なく、平均 0.00325、透過率に直すと 99.25%になります。0.00112 という SD の値は Blank や最低濃度標準液のバラツキの半分程度に相当し、Blank や低濃度領域での CV の大きさにかかなり寄与していることとなります。

5. 結合量と検量線のシミュレーション

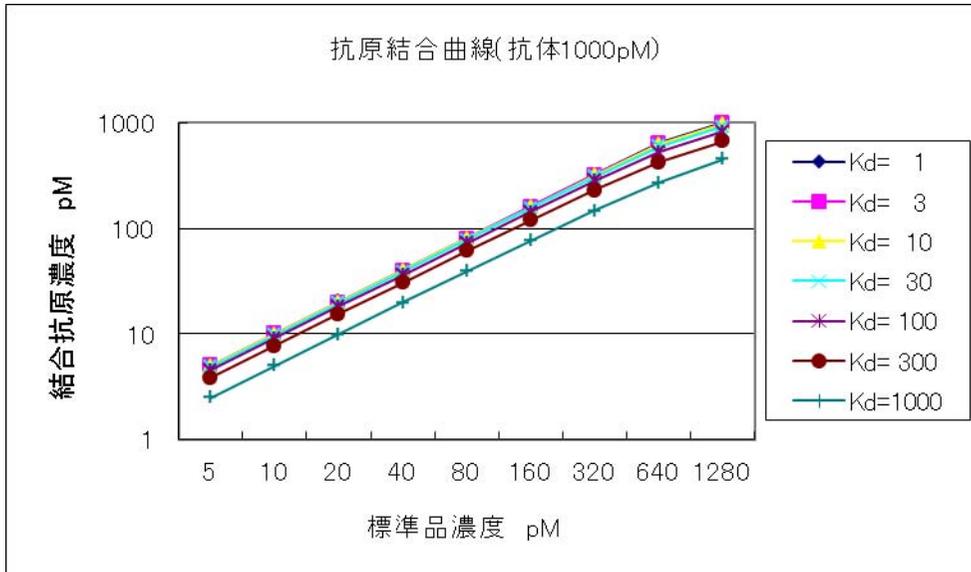
検量線の項で気付かれたことと思いますが、両対数変換での検量線を観察すると緩やかなシグモイドカーブとなっていることがわかります。この場合ノーマルスケールや、片対数 (X 軸のみ) 変換では判りません。なぜ直線にはならないのでしょうか。

抗原抗体反応の結合定数を求める数式から、抗原と抗体の初濃度をそれぞれ H と R として、反応の結果の結合量を b とすれば (単位は M)

$$Kd=(H-b)x(R-b)/b$$

$$b^2-(Kd+H+R)b+RH=0$$

$$b = \frac{Kd + H + R - \sqrt{(Kd + H + R)^2 - 4HR}}{2}$$

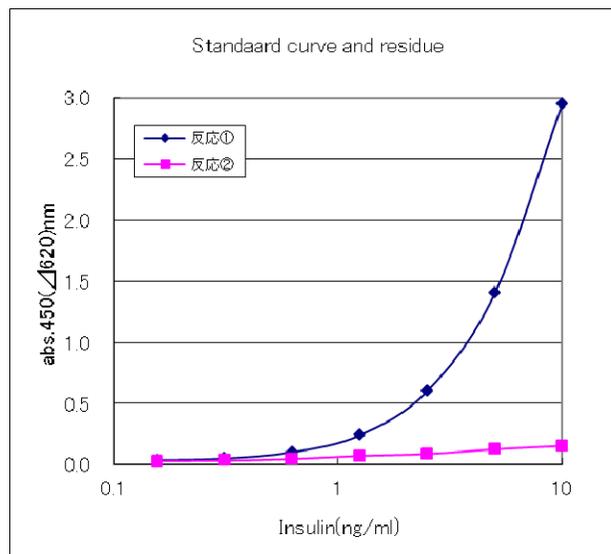


上のグラフは固相化抗体 1000pM に対して抗原を 5-1280pM 加えた時、解離乗数 K_d の値によって結合量がどう変わるかを前頁の数式から計算したものです。これらの結合曲線は実際の検量線とは異なり、低濃度領域が直線になっていることがわかります。

では ELISA では各標準点で実際にどのくらい添加抗原が固相化抗体にキャプチャーされているのでしょうか。

或る量の抗原を添加した時、それが実際にどの程度固相化抗体と結合したのかを調べるには、

一定量の標準品を抗体固相化ウェルに反応させた後、反応液を他の抗体固相化ウェルに移すことによって「反応し残りの抗原量」を測定すれば判明します。



レビスインスリンキットラット T を用いて試してみました。実験計画は、

反応①:通常通り反応

反応②:反応①の Biotin,STD 2hr 反応後の各 STD を 100 μ l/ウェルずつ別のウェル移し、

反応させ、その後は通常通りの測定過程を行う。
 と言うことです。

その結果は前頁右のグラフのようになりました。X 軸を対数にとってありますが、反応①は検量線そのものです。この検量線を利用して反応②のつまり反応①での反応し残り量を計算します。

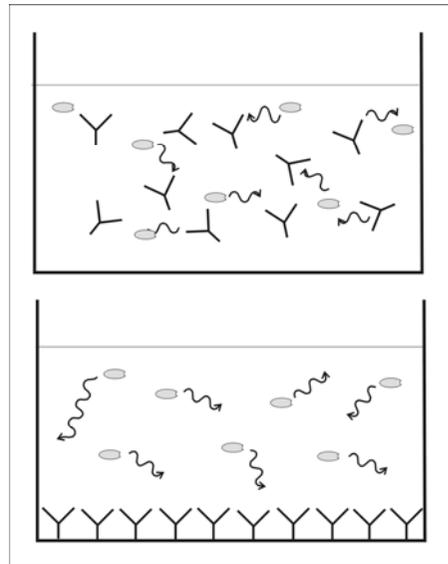
添加量 ng/ml	残渣量 ng/ml	残渣(%)	結合率(%)	結合量 ng/ml
10	0.9672	9.7	90.3	9.03
5	0.8273	16.55	83.45	4.17
2.5	0.5880	23.52	76.48	1.912
1.25	0.4844	38.75	61.25	0.7656
0.625	0.2868	45.89	54.11	0.3381
0.3125	0.1444	46.21	53.79	0.1681
0.156	0.0860	55.13	44.87	0.07

その結果を表にしました。つまり添加濃度が下がるに連れて結合率が低下して行きます。最低濃度に於いては最高濃度の場合の半分しか結合していないのです。抗原濃度と結合率をプロットしてみますと結合率は抗原濃度の対数に比例していると考えられます。

原因は、濃度が低い場合には平衡に達するのに時間が掛かる。特に大過剰に加えられている抗体はウェル底面に固相化されているために自由に溶液中を動き回れない(イラスト参照)と言うことなのではないかと思われます。

固相化された抗体に抗原が結合して、その全てに酵素標識された抗体(またはアビジン)が結合したとすれば、結合抗原の量と酵素作用の結果である吸光度とは比例していなければなりません。実際に計算してみるとやはり結合抗原量の対数に比例して酵素活性は変化していました。ここでも固相化と言う障害が立ちはだかっているわけです。

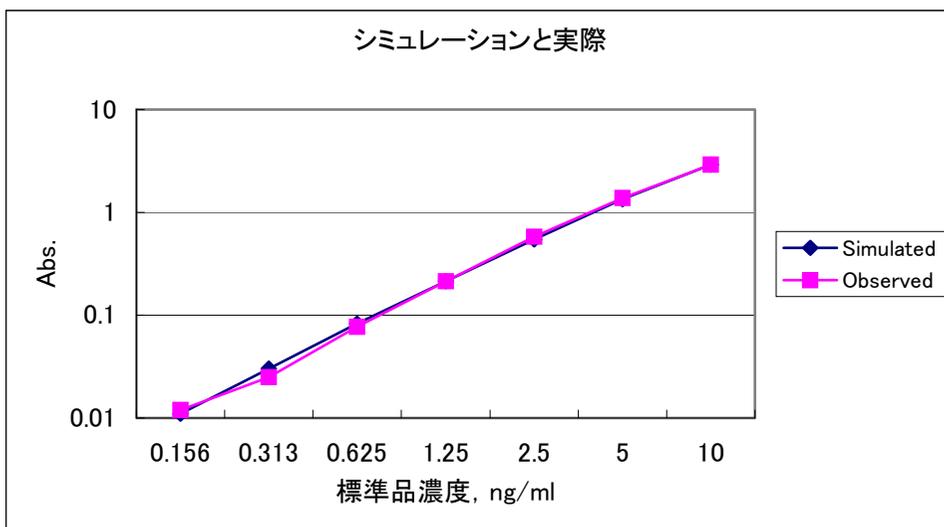
添加抗原量と吸光度との検量線をシミュレートするには抗原抗体反応式から得られた値に結合効率低下因子1を掛けて結合量を補正し、更に単位吸光度 x 吸光度率(結合効率低下因子2)を



掛け合わせなければなりません。

実際にラットインスリン T キットについて、固相化抗体 10000pM と解離定数 1000pM の組み合わせでの添加抗原 0.156~10ng/ml 即ち 27~1724pM の範囲で結合量を計算し、それに結合光率低下因子 1 と添加抗原量 10ng/ml と 5ng/ml の吸光率 (pM あたりに換算したもの) を乗じ、更に結合効率低下因子 2 を乗じて計算した検量線と実際の検量線を重ねて見たのが下の図です。

一応納得できるシミュレーションになっていると思われます。



このような固相化という手段に結び付く結合率低下要因が、ELISA の高感度化の妨げになっていることは確かです。



D. 精度 (precision) に関するパラメータと計算

ICH の合意事項の順序とはかなり入れ違いがありますが、キット使用者の側から見て通常実行することの多い確率誤差関連のバリデーションを先に述べたいと思います。

ICH では精度 (precision、均質な検体から多数回採取した複数の試料の測定値間の一致の程度) に関して 3 種類の区別をしております。

即ち併行精度 (Repeatability)、室内再現精度 (Intermediate precision)、室間再現精度 (Reproducibility) です。最後の室間再現性については臨床検査においては重要なことですが、研究室、個人を対象とするこの解説書では詳しくは述べないことにします。

1. 併行精度 (repeatability)と室内再現精度(intermediate precision)の計算

併行精度は、短時間の間に同一条件下で測定する場合の精度、とされ、intra-assay precisionと同義であるとされています。これまでは単に測定精度、precision、あるいは同時再現性とされてきたものに相当します。

室内再現精度とは、同一施設内で試験日、実施者、器具、機器等を変えて測定する場合の再現性の精度で、これまで使われてきた再現性(reproducibility)あるいは日差再現性に相当します。室間再現性として”reproducibility”が使われてしまっているため、混同しないようご注意ください。

いずれの場合にも変動係数(Coefficient of variation、CV)で表現されます。即ち、

$$\text{変動係数(CV)} = (\text{標準偏差(SD)} / \text{平均値}) \times 100 (\%)$$

CVのことを別称、相対標準偏差(Relative standard deviation、RSD)ともいいます。

これら変動係数は、併行精度の場合は intra-assay coefficient of variation、within-assay coefficient of variation、室内再現精度の場合は inter-assay coefficient of variation、between-assay coefficient of variation と呼ばれています。

その計算例を以下に示しましょう。

一般的な求め方

例えば、3種類の試料について日を変えて4重測定を4回繰り返した結果が下のようなものであるとします。併行精度のみを求めるなら1回だけで良いのですが、ここでは両方を求めることにします。測定値は仮に ng/ml とします。

Day 1

	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
Sample 1	2.51	2.32	2.38	2.45
Sample 2	12.16	12.92	13.54	13.12
Sample 3	89.31	98.28	93.21	92.63

Day 2

	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
Sample 1	2.71	2.54	2.62	2.58

Sample 2	13.14	12.95	13.85	13.33
Sample 3	92.30	95.63	99.23	93.42

Day 3

	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
Sample 1	2.16	2.28	2.38	2.33
Sample 2	11.25	11.36	12.15	11.85
Sample 3	87.98	88.56	89.01	91.05

Day 4

	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
Sample 1	2.48	2.53	2.38	2.33
Sample 2	12.20	12.88	13.65	13.11
Sample 3	91.32	98.04	95.31	90.01

$$\text{和} = \sum Xi, \quad \text{自乗和} = \sum X^2, \quad \text{標準偏差} = \sqrt{\frac{\sum Xi^2 - (\sum xi)^2/n}{n-1}}$$

これから上の数式に基づき計算を進めて下記のような表を完成させます。

Day 1

	和	自乗和	平均値	標準偏差	変動係数(%)
Sample 1	9.66	23.3494	2.42	0.0860	3.56
Sample 2	51.74	670.258	12.94	0.5776	4.47
Sample 3	373.43	34903.66	93.36	3.7042	3.97

Day 2

	和	自乗和	平均値	標準偏差	変動係数(%)
Sample 1	10.45	27.3165	2.61	0.0727	2.78
Sample 2	53.27	709.8735	13.32	0.3874	2.91
Sample 3	380.58	36238.28	95.15	3.0546	3.21

Day 3

	和	自乗和	平均値	標準偏差	変動係数(%)
Sample 1	9.11	20.7717	2.28	0.09430	4.12
Sample 2	46.61	543.6571	11.65	0.4219	3.62
Sample 3	356.60	31796.24	89.15	1.3350	1.50

Day 4

	和	自乗和	平均値	標準偏差	変動係数(%)
Sample 1	9.72	23.6446	2.43	0.09128	3.76
Sample 2	51.84	672.9290	12.96	0.6007	4.64
Sample 3	374.68	35136.98	93.67	3.6835	3.93

●併行精度については、例えば Day 1 の測定値についての変動係数を使えば、試料 1 については、3.56%、試料 2 については 4.47%、試料 3 については 3.97% ということになりますが、せっかく 4 回繰り返しているから、全ての日の平均をとって、例えば、試料 1 については、 $(3.56+2.78+4.12+3.76)/4 = 3.56\%$ としたほうが信頼性の点からは良いでしょう。先に測定値のバラツキの項で述べたように検量線上の位置によって併行精度は変わります。従って、測定値の大きく異なる試料での CV の平均値を採るというのは考えものです。試料毎の CV を記録するか、「このような濃度範囲では何%」と言うような表現のほうがより正確でしょう。

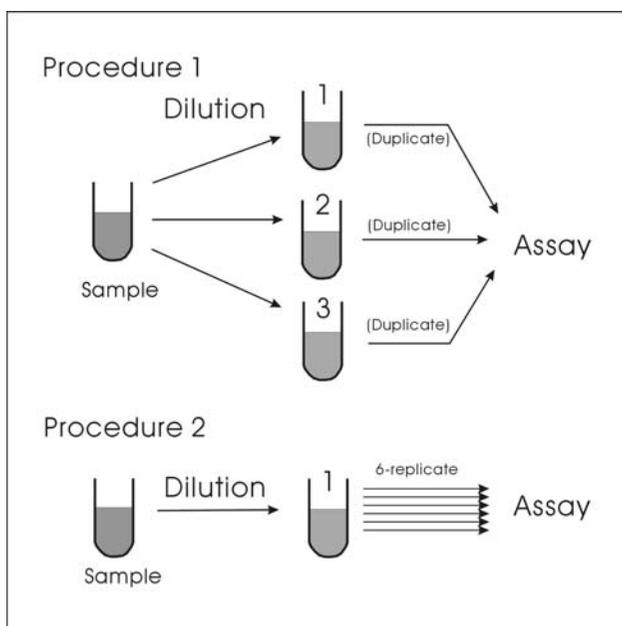
●室内再現精度については、それぞれの試料についての各日の平均値を使い、次のような表を完成させます。

	Day1	Day2	Day3	Day4	和	自乗和	平均	SD	CV
Sml 1	2.42	2.61	2.28	2.43	9.74	23.7718	2.43	0.135	5.56
Sml 2	12.94	13.32	11.65	12.96	50.87	648.550	12.71	0.732	5.76
Sml 3	93.36	95.15	89.15	93.67	371.33	34491.4	92.83	2.576	2.78

こうして得られた変動係数 5.56, 5.76, 2.78 (%)で再現性を表現します。

室内再現性を高い信頼度で得るためには、各アッセイでそれぞれの試料についての繰り返し (replicates) を多くすることが必要です。

●併行精度を検討するのに使用



される別な方法についてのコメント

キットの測定精度を検討するのに次のような方法が使用されることがあります。即ち、試料を希釈してアッセイする場合ですが、ひとつの試料から例えば3回ピペットで一定量を採集し、それぞれを同一倍希釈して希釈試料を3つ作り、それぞれを2重測定して3つの平均とバラツキを求めるのです。通常試料は2重測定で行うことが多いので、1回のアッセイで同じ試料を3回測定してその変動を調べることは実際に即して有意義であるように見えます。

しかし著者の考えはかなり違います。前頁の図の Procedure1 を参照して下さい。ひとつの試料から3回一定量を採り分けてそれぞれに希釈をした時、ピペッティングにバラツキが出ます。また希釈に伴うバラツキも出ます。そしてアッセイの段階では本来のキットの性能によるバラツキも出ます。さらに測定者の技量によるバラツキも出ます。つまりこの方法では余計なバラツキ要因が多すぎるのです。更にキット本来の特質によるバラツキは二重測定のためにそれぞれの CV の信頼度は低下しています。

従ってこの方法は測定者の技量即ちピペットの扱い方、希釈の習熟度などの参考にはなりませんが、肝心のキットの性能については甚だあいまいな情報しか与えません。一方、Procedure 2 のように1回だけ希釈するのなら希釈された資料にはバラツキはありません。それを6重測定すれば、キットの性能に測定者の技量が少々影響するだけです。両者を併用してそのバラツキを比較すれば測定者の技能検定に役立つでしょう。希釈なしの場合には Procedure 1 はナンセンスと言わざるを得ません。

2. 室間再現精度 (reproducibility)

室間再現性精度とは異なった施設間で測定する場合の精度をいいます。

通常ひとつの測定室で測定を行っている限り、これに関するデータは得られません。共同プロジェクトを立ち上げ、いくつかの測定室が協力して行う必要があります。実際に日本アイソトープ協会の放射性医薬品部門では定期的にキットと試料を揃えて全国の臨床検査室に配り測定を依頼し、その結果をまとめています。

室間再現精度の検討は一方では測定室や測定者の技能検定(proficiency test,PT)にも応用されます。つまり定期的に、均一な材料から取り出した試料を多くの実験室(測定者)に配り、分析の結果を中央の計画実施機関に報告してもらいます。そこでの検討結果は、全てのデータとともにフィードバックされるのです。これによって反省が行われ、次の分析にどう反映されるかが試されることになります。

技能判定の基準のひとつに Z score があります。

$$Z = (x - x_a) / \sigma$$

x : 一つの実験室で得られた測定値

x_a : いくつかのエキスパート実験室での測定値の平均値

σ : 実験結果の標準偏差の目標値

判定は Z スコアの絶対値が 2 よりも小さい場合は満足できる結果を出したとされ、
 $2 < |Z| < 3$ の場合には信頼性が低い、 $|Z| > 3$ の場合には容認できないとされるので
す。



E. 真度 (accuracy、trueness) を評価する試験法の実際

ICH 合意によれば、真度とは真の値 (認証、合意された値) と実測値との一致の程度とされます。真度は以前「正確さ、正確度」(Accuracy) と呼ばれて来ました。

アッセイ系の真度、つまりアッセイ系が正しい値を示すものであること証明するには、いくつかの試験法があります。希釈試験、添加回収試験、他の測定系との比較試験などです。

1. 希釈試験 (特に血液成分の影響の有無) (dilution linearity test)

血清(血漿)をアッセイバッファーで倍々希釈して測定し、横軸に希釈度の逆数を取り、縦軸に測定値をとった時 (希釈曲線)、原点を通る直線となることが必要です。

直線にならない場合 : まず血液成分の影響を疑い、測定対象物質を含まない血清 (フリー血清) で希釈をして、希釈曲線を描いてみる。それでも直線にならないときには、検量線を作るための系にフリー血清を加えてみます。

希釈曲線を描く代わりに検量線に重ねてみて平行性を確かめる方法もあります。(平行性の検討)

[測定値×希釈度]がどの希釈度でも同じになっていなければならない。

というのが希釈試験の要求している条件なのです。

希釈直線性試験の例

Sample1、Sample2 について、それぞれ倍々希釈を行い、2 重測定した結果です。

Sample 1

Dilution Factor	mean.	SD	CV(%)
1	7.926	0.158	1.992
0.5	3.939	0.115	2.912
0.25	1.925	0.044	2.28
0.125	0.955	0.022	2.343

Sample 2

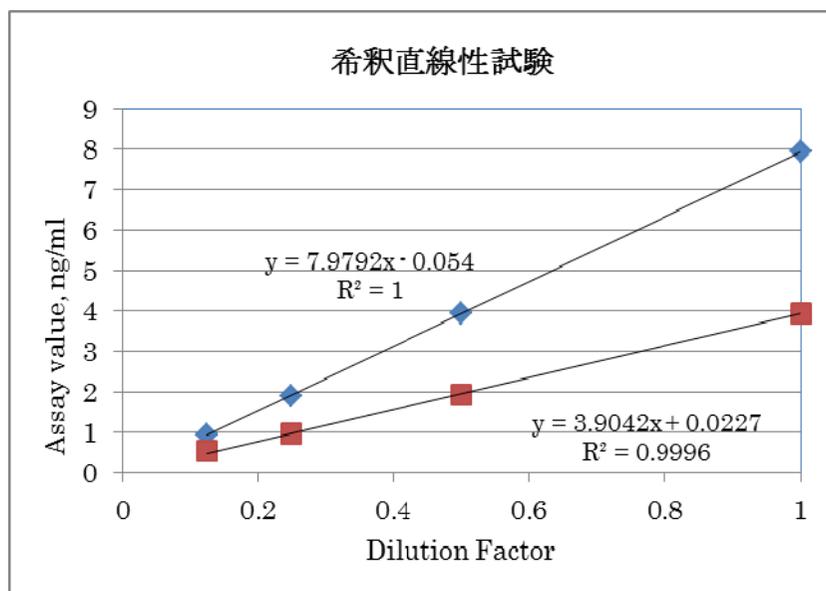
Dilution Factor	mean.	SD	CV(%)
1	3.938	0.103	2.604
0.5	1.96	0.036	1.826
0.25	0.965	0.024	2.476
0.125	0.548	0.009	1.595

上の結果をグラフにしてみましょう。

横軸に Dilution factor をとり、縦軸に測定値をプロットしたものです。

図から分かるように、それぞれの Sample について測定値をつなぐと、ほぼ原点を通る直線になっています。

つまり、希釈直線性試験は成功しているということになります。



2. 添加回収試験 (recovery test, spike recovery test)

測定試料にある量の標準品(spike)を加えて測定し、測定値から原試料の測定値を差し引いた時、加えた標準品の量が回収されるか否かを検討します。

誤差(バラツキ)の範囲内で100%回収されていることが必要です。

二つの Sample に標準品を何段階かの濃度で加え、測定した結果を示しましょう。加える標準品の量は、何も加えていない sample にもともと含まれている量をまたぐように加えることが好ましいのです。Sample に含まれている量に対して多すぎたり、少なすぎたりすると、測

定のばらつきに影響されて正しい結果を得ることが困難になります。

$B \ll A$: BがAのバラツキの範囲に呑み込まれてしまいます。

$B \gg A$: AがBのバラツキの範囲に呑み込まれ、回収率が不当に高くなってしまいます。

以下に2種類血清試料に4段階の spike を加え、3重測定した例を示します。単位は ng/ml です。

Sample 1

添加量	実測値	回収量	回収率(%)
0	1.01	-	-
0.19	1.19	0.18	95
0.39	1.38	0.37	95
0.79	1.76	0.75	95
1.97	2.99	1.98	101

Sample 2

添加量	実測値	回収量	回収率(%)
0	4.24	-	-
1.69	5.89	1.65	98
3.39	7.50	3.26	96
5.08	9.10	4.86	96
6.88	10.6	6.37	94

Sample1、2に関して添加した標準品は測定精度の範囲内ではほぼ100%の回収率と考えられます。

3. 他のアッセイ系との相関性試験

すでに確立されている測定法が他にあるとき、同一試料（試料数を多く、出来るだけ含量の範囲を広くとって）をその測定系と検討中の測定系で測り、横軸に確立されている測定系の測定値、縦軸に検討中の測定系での測定値をとって二つの測定系の相関グラフつまり散布図を作り検討します。

この時、相関係数が出来る限り1に近いこと。

回帰直線の勾配がバラツキの範囲内で1に近いこと。

が必要です。

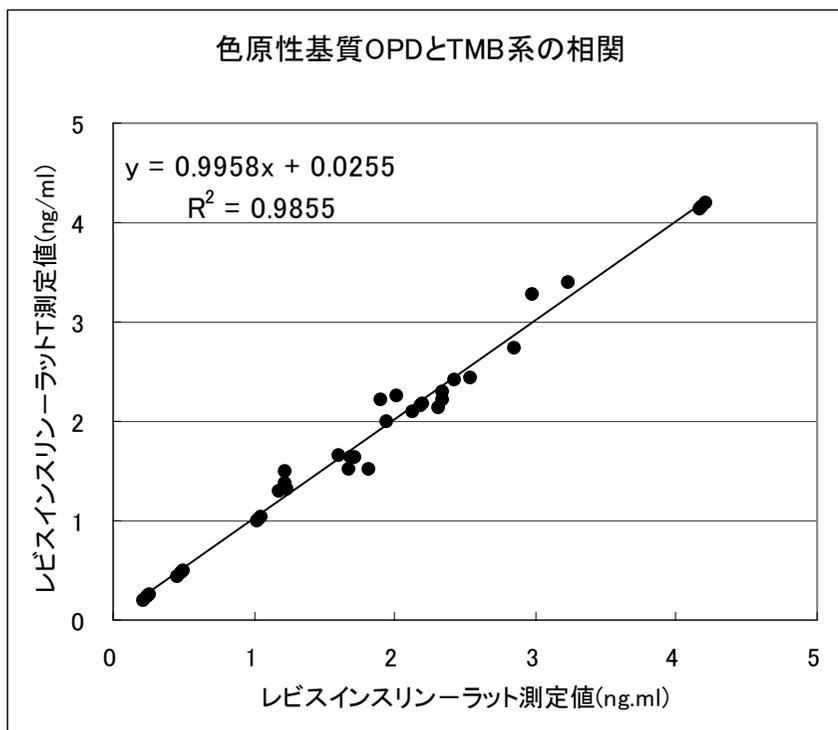
両測定系の測定精度が良ければ相関係数は1に近くなる筈。バラツキの範囲内ということ、統計学的有意差が出ないことを意味します。相関係数を計算するプログラムで、回帰直線

の勾配の標準誤差が得られるようなプログラムを使うことをお勧めします。

回帰直線の勾配が 1 にならない場合、高い測定値を与える測定系の標準品の純度が良くないことを示唆します。この場合低い測定値を与える測定系の標準品を共通に使用して比較してみてください。それでも 1 にならないければ、抗体の特異性が疑われます。

例として二つのラットインスリン測定系の比較を示します。

ひとつは色原性基質として OPD を使用したキット、もうひとつは TMB を使用した、いずれもシバヤギのキットで、同じ試料を測定した相関図です。



相関係数の自乗は 0.9855 なのでデータの 98.5%がこの回帰直線で説明できることを示し、従って相関係数は 0.9927 という 1 に近い値です。

回帰直線の勾配は 0.9958 と 1 と有意差の無い値で、Y 切片は 0.0255 とこれもまた非常に小さい数値を示しております。

このことから、OPD 系と TMB 系は同一の正確さを示していると考えられます。



F. 測定試料の安定性

測定試料の安定性、測定の対象となる物質が試料、例えば血清の中でどの程度長期間その抗体との結合性を保っていられるのかはアッセイを行う上で非常に重要です。血液中にはペプチ

ドやタンパク質を分解する酵素が含まれていて、それに対する抵抗性は、物質によって様々です。

従って、或る測定系を確立しようとしたら、実際に測定対象となる試料でその物質の安定性を温度、期間を変えて確かめてみる必要があり、その結果に基づいて試料の保存方法を定めなければなりません。試料としては管理血清(quality control serum, QC)を用いるのが良いでしょう。管理血清とは高低、或いは高中低の濃度の測定対象物質を含む、プールされ、小分けされ、超低温で保存された血清でアッセイ毎にそれらを他の試料と共に測定しそれぞれのアッセイの成否を判定するものです。安定性をチェックする目安としては、

室温安定性	2 時間
冷蔵庫内安定性	24 時間
凍結融解安定性	3 回
長期安定性	-20°C または -80°C

LQC (低濃度管理血清)、 HQC (高濃度管理血清) を用いる。三重測定。

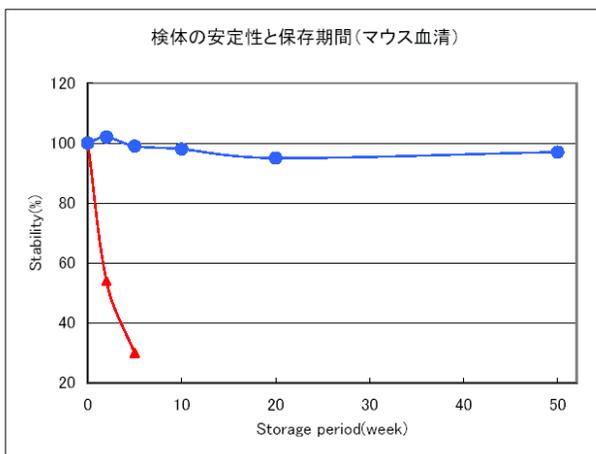
右のグラフは血清を 4°C の冷蔵庫と -20°C の冷凍庫で保存し、インスリンを測定した例です。インスリンは -20°C では 50 週間安定であるのに対して 4°C の冷蔵庫では早く免疫学的活性を失ってしまうことが判ります。

ただ -20°C の保存は温度が変化し易く、冷凍された溶液の安定性にも不安があり、-20°C で凍らせるとタンパク濃度の不均一が起りやすい

ので、もっと低温、例えば -35°C 以下が望ましいし、凍らせる際も液体窒素とかドライアイスアセトンなどで snap-freeze してから冷凍庫に入れることを推奨します。

保存薬品の添加

通常試料を保存するために血清などに添加される物質は、殺菌剤と分解阻害剤です。



▲ : 冷蔵 (4°C)
● : 冷凍 (-20°C)

*使用キット: レビスインスリン-マウス
検体: Balb/cマウス血清(3個体)

2002.9

殺菌剤としては、昔はマーゾニン（別名チメロサル、マーサイオレート）がよく使われておりましたが、水銀を含むために近年は使用されなくなりました。アジ化ナトリウム(sodium azide, NaN_3)がそれに代わって使われておりますが、この物質はあいにくと ELISA でよく使われるペルオキシダーゼの阻害剤なのです。抗原抗体反応には影響しませんから、試料を固相化抗体と反応させた後、洗浄をしっかりとやれば洗い流されてしまい後の酵素反応には影響は無い筈なのですが、やはり不安は残ります。使わないほうが無難でしょう。

血中に存在しているプロテアーゼのために測定しようとする物質が分解されてしまうことがあります。これを防ぐためにプロテアーゼ阻害物質を加える場合があります。物質ごとにプロテアーゼに対する抵抗性は異なります。どの程度壊されやすいか、また阻害物質はどの程度の効果があるのか、ご自身でテストの上、使用して下さい。

例えばインスリンの場合、試料採取後直ちに測定できず、冷蔵庫などに保管する場合、分解酵素阻害剤としてアプロチニン(Aprotinin) を最終濃度 100~500KIU/ml となるように加えて下さい。

アプロチニン（別名トラジロール）とはセリンプロテアーゼの一種カリクレインを阻害することで知られている分子量 6500 の塩基性ポリペプチドです。カリクレインの他にトリプシン、キモトリプシン、プラスミンも阻害します。アプロチニンはこれらタンパク分解酵素と 1 : 1 のモル比で結合して活性を阻害します。

弊社での使用例

アプロチニン(50,000KIU) （和光純薬取扱 Cat.No.010-11834）

⇒生理食塩水 5ml に溶解(10,000KIU/ml)

⇒1/100 量を(v/v)を採血時に血液に添加する。

（最終濃度 100KIU/ml）⇒血清（血漿）分離(1,800g、30分、4℃)⇒血清（血漿）回収。
なお、高濃度のアプロチニンを微量検体に添加する際にその分だけ希釈される事がデメリットとなることもありますので注意が必要です。

アプロチニン(Trasylol)の単位の表記について

販売している会社によってアプロチニンの単位が異なる場合があります。

KIU(kallikrein inhibitor unit) 、 TIU (trypsin inhitor unit)

BAPNA unit ($\text{N}\alpha$ -benzoyl DL-arginine-p-nitroanilide unit)

BAEE unit (Benzoyl-L-arginine ethylester unit)

などが使われています。これら相互の関係ですが、

1TIU : 2 trypsin units を 50%減少させる量です。

1trypsin unit とは pH 7.8、 25℃で 1分間に 1 μ mole の BAPNA を加水分解する trypsin

量です。

KIU と TIU については、

トリプシンの活性 32.5FIP 単位を阻害する量を 1KIU

FIP unit: 1 分間に BAEE 1 μ mole を加水分解する酵素量。

1TIU \approx 900KIU (J. Gen. Physiol. 19, 991, 1996)

229,100 KIU = 254 TIU

UIP(Peptidase inhibitor unit) : 8UIP = 1KIU

などとされています。

GLP-1(Glucagon-like peptide-1)と DPP-IV (Dipeptidyl peptidase) インヒビター

GLP-1 は活性型として GLP-1 (7-36)amide と GLP-1(7-37)が知られています。

GLP-1(7-36)amide は分泌後肝細胞、末梢組織、循環血中で aminopeptidase の一つ dipeptidyl peptidase IV(DPP IV, DFP, diisopropyl fluorophosphonate, によって失活するセリン酵素) によって N 末端の 2 個のアミノ酸を失い、GLP-1(9-36)amide となります。また GLP-1(7-37) は GLP-1(9-37)になります。このため血中の活性型 GLP-1 の測定には DPP-IV のインヒビターを試料に加える必要があります。



G. 測定系の頑健性 (robustness)

頑健性とは「少くとも分析法の条件が変わっても測定値が影響を受けにくい能力」と定義されていますが、キットを製造する側にとっては、キットが正常に働く条件範囲を十分検討して使用者の質問やクレームに対応できるようにすべきでしょう。

測定試料は血清や血漿のみとは限りません。培養液、インキュベーションメディアウム、組織抽出液などもあります。ですから、

試料：pH 範囲、タンパク濃度の許容範囲、塩類濃度の許容範囲、有機溶媒例えばエーテル、

アルコールなどのコンタミネーション濃度限界、保存条件

攪拌：回転数の下限上限、反応中での攪拌の有無と条件

反応条件：反応の進み方と温度時間との関係、温度範囲、インキュベーション時間の範囲

洗浄：洗浄液の強さの限界、洗浄回数範囲

吸光度測定：褪色と時間の関係および測定時間の許容範囲、測定波長の許容範囲

ブランク：非特異的吸着と反応の諸条件との関連、洗浄条件との関連

などを公表するか、少なくとも内部データとして保持しているべきです。

一方、使用者側でも、自分たちのルーチン試料の性質 (pH、タンパク濃度、塩類濃度など)

を調べ、どの程度均一性があるのか、もしあまり均一性がないならそれらの範囲内でアッセイがうまく働くのかを前もって調べておくべきでしょう。また試料の保存条件についてもテストして内部規定を定めて置く必要があります。



H. 精度管理 — 管理図による毎回のアッセイの評価

漫然とアッセイを繰り返していると、ひどい目に遭うことがあります。

同じ系統の動物なのにある時の測定で無処置群での測定値が前回と違っている、どうしたのだろう。というような質問を受けたりします。今回に限って何が起きたのか。そもそも今回が悪いのか前回は悪いのかなどという疑問も出ます。日頃のアッセイをチェックして置かなくては解析のしようがありません。そこで精度管理が必要になって来るのです。アッセイの様々なデータを記録し、バリデーションの手法も使ってまとめ、信頼できるアッセイが実行されたのかどうかを判定するのです。といっても ELISA キットの使用者にとって、あまり負担になっても困ります。最小限のポイントだけを抑えるようにしましょう。

検量線の管理

検量線の再現性：各標準点の吸光度はいつも同じ程度か。

測定範囲は一定しているか

検出限界とか定量限界を毎回求めるのはブランクのウェル数が少ないので正確に見極めることは無理でしょう。

管理血清(QC)によるアッセイ評価を行うことは重要です。毎回の測定値から室内再現精度を求めることができます。

管理血清の種類： 2～3段階 LQC, (MQC), HQC (低、中、高)

管理血清の作製：

- ① 通常の血清+標準品で作製する。
- ② 通常の血清及び生理状態を変えて作った高(中)低血清を使用する。

管理血清は凍結融解を繰り返さないように、小分けし超低温庫に保存して毎回1セットずつを測定します。

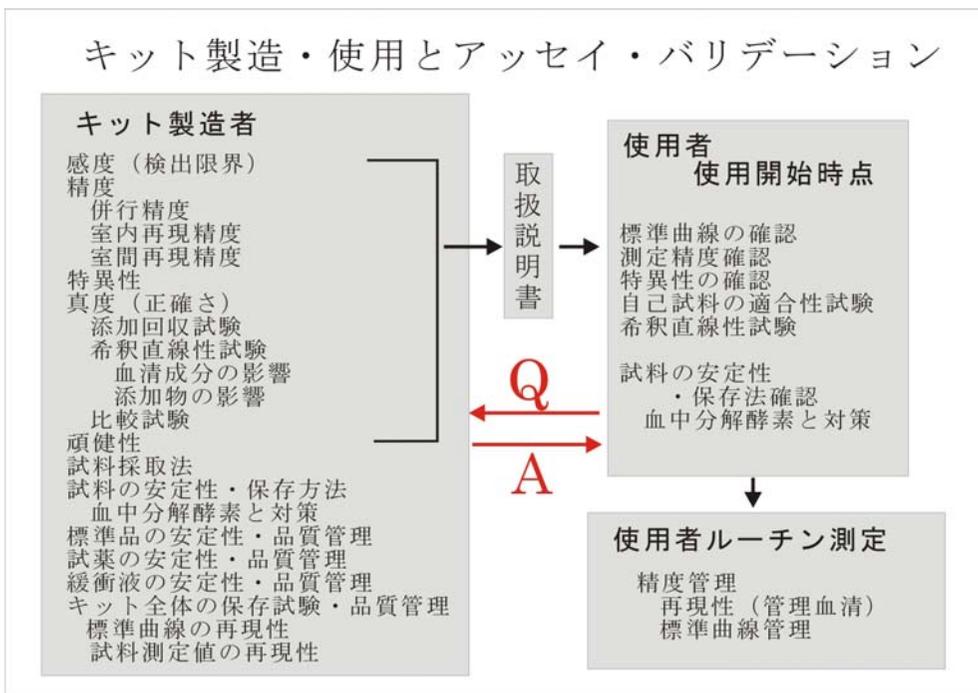
管理図：過去の何回かの測定から、全平均と全SDを計算し、全平均値と1SD、2SDをライン表示し、それに最新の検討すべきアッセイの測定平均値をプロットし、その位置を検討します。少なくとも $\pm 2SD$ の範囲に入っていなければなりません。

キットの製造側と使用者側で行うべきアッセイバリデーションと品質管理

次の図はそれぞれの立場で行うべきアッセイバリデーションと品質管理を総括したものです。

当然のことながら ELISA キットを製造する場合にはすべての点に関してアッセイバリデーションを行い、キットの性能を把握して置かねばなりません。しかしそれをすべて公表すべきかどうかは、取扱説明書があまりにも煩雑なものになってしまう嫌があります。そこで、使用者がアッセイを行う助けになる範囲での情報を取扱説明書に記して公開すべきでしょう。勿論その他の情報は使用者の要求に応じて提供されねばなりません。

使用者側では、キットの使用開始時点でその特性について検討し、自分たちの測定試料に適合しているかどうかを調べて置く必要があります。その結果使用できることが分かれば、ルーチンとしての測定を行います。ルーチン測定を行う場合には **gross error** が起こらぬよう精度管理を必ず実行すべきです。





I. ELISA の performance を改善する

偶然（確率）誤差、系統誤差を出来るだけ小さくしてアッセイパフォーマンスを向上させるポイントをまとめてみました。

- 試料の繰り返しの数（Replicate）と測定平均値の信頼性について
- エッジ現象（効果）（Edge effect）とその対策
- 試料中の血液成分の影響と対策
- 血液試料の pH について
- ピペットとピペッティングで注意すること
- 試料とキットの適合性テストについて
- Blank の非特異的吸着による吸光度の増大を洗浄法の改善で低下させる
- ELISA 施行上の留意事項のまとめ
- 技能検定で腕を磨く

1. 試料の繰り返しの数と測定平均値の信頼性について

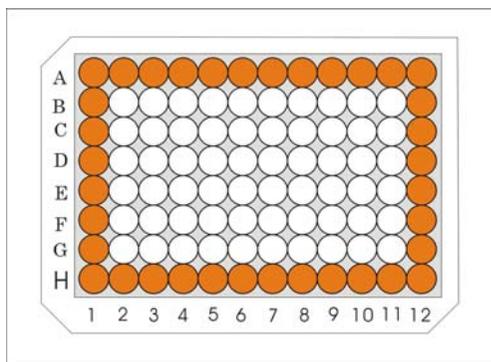
既に II. ELISA 実技、「1 試料 1 ウェルではなぜいけないか」(p.36)で述べたとおりです。その項を参照して下さい。

2. Edge 現象とその対策

ELISA での困った現象の一つにエッジ現象（エッジ効果）があります。エッジ現象とはウェルプレートの外周部に位置するウェルが、外部から熱的な（冷、暖）影響を受け、他のウェルと比べて反応が遅延したり、余分に行ったり、溶媒の蒸発による非特異的吸着などのためにして吸光度が変化してしまうことです。

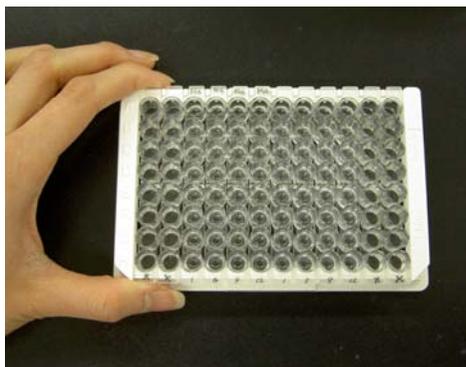
熱的な要因を列挙すれば、

- ウェルプレートや試薬類が充分室温化されていない（冷蔵庫から出してすぐ使用）
- 室温になっていても外部熱源（人体も含む）からの輻射、伝導で熱が伝わる
- エアコンの冷風/温風があたる（ただの気流でも 0.3m/秒以上は蒸発の危険）
- 陽の当たる窓際で測定
- 冬季の朝測定室が冷え切っていると室温化に時間がかかることに気付かない

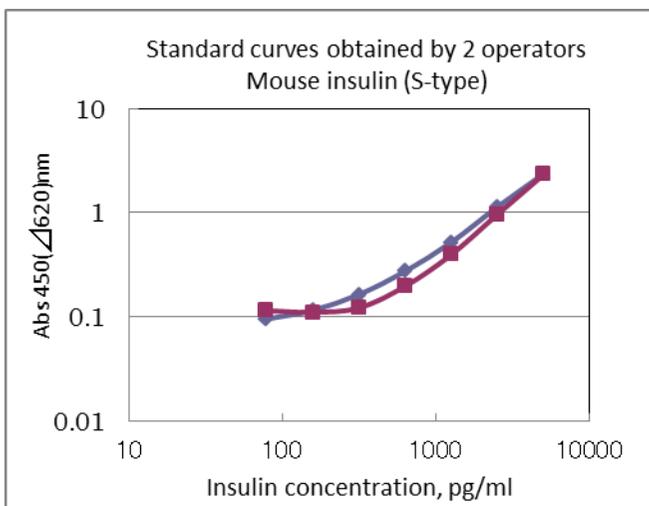


といったようなことが考えられます。

特に初心者に起こり得るエッジ現象の原因として、ピペティングを行う際に、ウェルプレートを利き手の反対側の手で保持してしまうことがあげられます。つまりピペティングの際ウェルプレートがずれ動くことを気にして図のA1の角に人差し指、そしてH1、H2の角を親指で押さえてプレートをホールドする、あるいはもっとしっかりプレート左

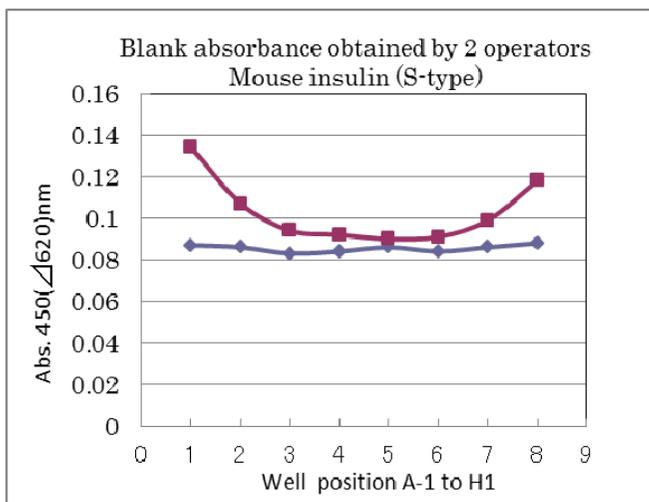


側と下側を人差し指と親指の腹で囲ってしまうなどします。このホールディングは特に色原性基質例えば TMB 溶液を加える際に行われると、溶液を入れ終わるまで指の周辺が加温され続ける（特に初心者ではピペティングに時間が掛かる）ことになるのでエッジ現象のもとになる可能性があるのです。通常プレートの左端は検量線用に用いられるので、ブランクの吸光度が低濃度標準液のそれよりも高くなる可能性を生じます。



弊社での実例を示しますと、

右のグラフは ELISA を初めて行う新入社員とベテラン社員が同一のキットで同時に測定を行った時の検量線です。このときのブランクの吸光度はベテランでは 0.081 新入社員では 0.127。新入社員のブランク吸光度は標準品濃度 1, 2, 3 よりも高く、検量線は使



用に耐えないものとなっていました。

同時に行ったブランクのみを列1で行ったテストでは右に示すグラフのように、ベテランでは場所に依らず一定の吸光度が得られたのですが、新入社員の場合は両端に行くほど吸光度が高くなり、明らかなエッジ現象が見られています。

エッジ現象対策

◎キットの全構成試薬（固相化プレート、試薬類等全て）を1時間半以上室温に置いて、手で室温になったのを確認後、使用して下さい（扇風機の風を当てると室温化が速くなる）。

◎エアコン、ストーブの風が当たらぬよう、また輻射熱源（測定者自身も熱源であることをお忘れなく）をすぐ傍に置かないよう注意して下さい。特に発色液を加える間測定者はプレートに密着しないよう適度に距離を置いて操作するのが望ましいでしょう。Hの行は測定者の身体に一番近いので要注意です。

◎発色液の添加はスムーズに手早く行なって下さい。時間がかかるほどエッジ現象は現れやすいのです。

またブランクはA行に置き、B行からH行へと濃度を上げて行く方が良いでしょう。

◎右利きの方はウェルプレートの右側の列(11,12)を検量線用を使用し、左利きの方は左側の列(1,2)を検量線用を使用するようにすれば指の熱が少なくとも検量線系には影響しないはずです。

今まで通りの配置で行いたいならば、

◎ピペッティングの際、ウェルが滑らないように指1本を軽くウェルの横に当てる程度にして熱の伝導を防いで下さい。

◎もっと良いのは、滑り止めシート（百元ショップで玄関マットなどの下に敷く滑り止めとして販売している）をウェルプレートよりもやや大きめに裁断し、それをウェルプレートの下に敷いてプレートに手をふれずにピペッティング出来るようにします。

シートには様々な色のものがありますが、

この場合実験台甲板の色が通常黒であるため、黒いシートを使用した方が今までのプレートの感覚と違和感がなくて良いようです。

◎反応中必ずプレートカバーやパラフィルムでウェルを覆い気流の影響を避けましょう。プラスチックの弁当箱のようなものをウェルプレートにかぶせて置くのも周りの熱源や気流の影響を防ぐ方法です。



3. 試料中の血清成分の影響と対策

通常アッセイでは検量線の系ではタンパク濃度が低い状態で反応が行われる一方、試料としての血清や血漿には高濃度のタンパク質が含まれています。高濃度のタンパク溶液は、固相化抗体への結合反応を妨害する可能性があります。

既製のキットでは一応その影響を検討してありますが、自分で確かめる場合には、希釈直線性（検量線との並行性）を検討して下さい。

つまりどのような希釈を行っても測定値が変わらないことを証明します。この場合の希釈はアッセイバッファーで行います、希釈して行くと直線性が失われる、つまり測定値に希釈率を掛けたものが一定にならない場合。血液成分の影響が予想されます。

この場合の

対策としては、血清成分を加えた標準液で血清(血漿)検体との乖離を防ぐことです。

4. 血液試料の pH について

血液試料、即ち血漿や血清は、その調製後時間とともに炭酸ガスが逃げ出すことにより直後の中性状態から塩基性へと変化します。マウスの血液で観察したデータを示しましょう。

マウス：BALB/c, 6 週齢, ♂, 絶食なし

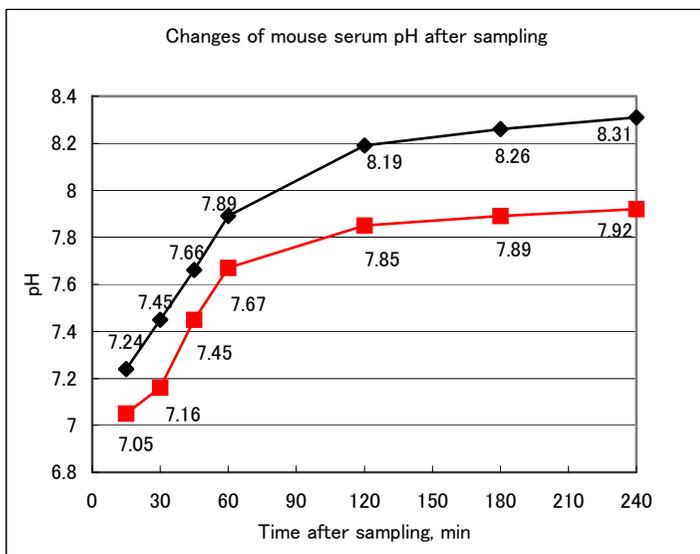
検体：血清, 心臓採血, 保存：2~8℃, 静置, PP バイアル

血漿, anticoagulant として, EDTA-2Na, 保存：2~8℃, 静置, PP バイアル

測定機器：Twin PH (HORIBA) Model: B-111

という条件下での経時的な pH の変化です。

● 血清の場合



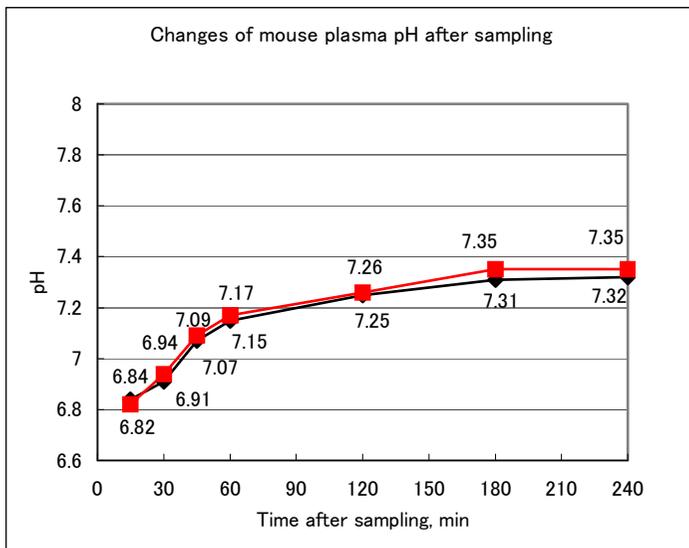
採取直後では生理的な血液の pH を示していますが、採取後 1 時間の間に炭酸ガスの逃散とともに pH は著しく上昇し、2 時間後には更に上がって 8 前後になります。動物の個体差もあるようです。

今回の保存温度は 2~8℃という冷蔵庫温度ですが、温度が高いと更に

pH の上昇は激しくなります。

また炭酸ガスは凍らせると溶解度が低下しますので、冷凍保存しても解凍した時には塩基性になっています。

● 血漿の場合



左図は EDTA-2Na で得られた血漿の場合です。

EDTA そのものは強い酸性を示しますが、2ナトリウム塩は弱酸性で抗凝固剤として用いられています。これによって得られた血漿は 15 分後で 6.8 程度のやや酸性を示します。

1 時間後ではほぼ 7.2, 4 時間後でも 7.3 台を維持しています。

EDTA-2Na の使用濃度は最終濃度として 1mg/ml ですから、0.1% となり、血漿調製直後の pH は 6.8 でやや酸性となるくらいですから、緩衝作用がある程度働いて炭酸ガス逃散による pH の上昇を食い止めていると考えられます。

同じ血漿でもヘパリンを用いた場合は異なるでしょう。ヘパリンは硫酸根を持つ高分子で、通常は Na 塩として使われていますが、Na の割合が標品によって異なる可能性があり、Merck Index によれば 1% 水溶液の pH は 6.0~7.5 であるとされています。ヘパリンは最終濃度 10µg/ml (1.2U/ml) で使用されるので濃度は 0.001% ですから、血漿 pH への影響は殆ど無いと考えられます。従って調整後の pH の時間的変化は血清の場合に近いと思われます。

中性を外れた塩基性条件下では抗原抗体反応は抑制されますので、ELISA などで血清試料などをいきなり抗体固相化ウェルに入れて常温で数時間反応させると pH の上昇がますます進み、測定不能になったり、正確な測定値を得られなくなることを考慮すべきで、やや強い緩衝液による或る程度の希釈を行ったものを試料とするのが安全でしょう。重炭酸塩緩衝液を用いた培養液なども同じ事が言えるでしょう。

5. ピペットとピペッティングで注意すること

ピペットについては EISA 実技の項で詳しく述べてありますので、ここではバラツキを少な

くするためにエアーکشジョンタイプ ピペット使用上の注意点のみを列挙します。

- 使用液量にマッチしたピペットの選択
- 使用するピペットのメーカーが推奨するチップを使用する
- 液温を完全に室温に戻す
- 液体の粘度と密度，揮発性に注意。粘度の高い液体は共洗ひ法
- 使用法をサンプルや状況に応じて選び混用しない

プレウェッティング法， 共洗ひ法

- ピペッティングは一定のペースで行う。ピペット操作のむらをなくすよう習熟
- チップを入れる深さと角度のコントロール

深さが変わるとチップ外部に付着する量が変わる

角度が変わるとチップに入る量が変わる

- タッチ&ゴー(touch and go)を実行する (前出)
- 定期的にピペッティングのテストとピペットのメンテナンス

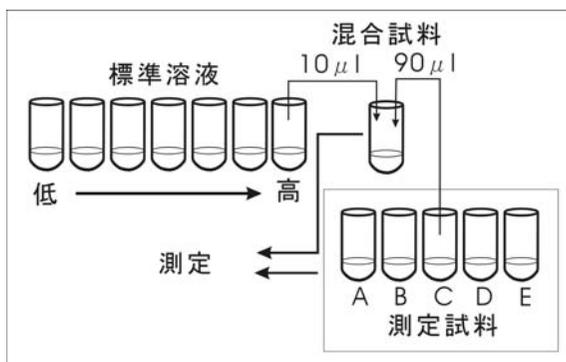
6. 試料とキットの適合性テストについて

これから測定されようとしていてる試料が測定キットの試料としての条件を満たしているかどうかを調べることは、万一期待された測定結果が出なかった場合の原因究明に役立ちます。一般的に測定試料は様々です。例えば、採血時の麻酔の有無、麻酔薬の種類、血漿を採取する場合使用した抗凝固剤、試料が常温、低温で放置されていた間に起きた炭酸ガスの消失と pH の上昇、保存料として加えられた薬物、保存中に起きた血液成分の濃縮、変性などなどの要因が測定試料には加わっています。このような要因のためにあなたの測定試料が使用しようとしているキットの反応系に影響していないかどうか。できればアッセイ毎に精度管理の一つとして調べたいものです。

実行方法：使用者による簡易添加回収試験

まず標準溶液の系列を作ります。適当に選んだ代表的試料、例えば対照群の試料の一つ、から 90 μ l を小試験管に採り分けます (採った試料の番号を記録しておくこと。仮に No. C とする)。

次に標準溶液の最高濃度の液を 10 μ l 採って小試験管内の試料に加



え、よく攪拌混合します。この標準品入りの試料を他の試料と共に測定して下さい。

この測定値を試料 No. C の測定結果と比較します。

仮に No. C の測定値が Ang/ml であったとすれば、標準品入り試料の測定値は、測定精度の範囲内で、 $A \times 0.9 + (\text{最高標準溶液濃度} \times 0.1)\text{ng/ml}$ になっている筈です。

要するに簡単な添加回収試験を行っている訳です。

あなたの測定試料でこの計算値に近い値が得られれば、キットの測定系が試料に対して十分に機能していることが証明されます。

註) $90\mu\text{l}$ がピペットの都合で採取できない場合は $100\mu\text{l}$ 取っても結構です。それに標準液 $10\mu\text{l}$ を加えた場合、期待測定値は、 $A \times 0.91 + (\text{最高標準溶液濃度} \times 0.09)$ になります。試料が少なく $90\mu\text{l}$ は無理だという場合には、 $(50\mu\text{l} + 5\mu\text{l})$ の組み合わせでも良いでしょう。もっとも少量の組み合わせではピペットの精度の問題があって測定値の信頼性が疑問になりますし、標準液の量を増やすと試料の希釈が無視できなくなるでしょう。

7. Blank の非特異的吸着による吸光度の増大を洗浄法の改善で低下させる

ブランクの吸光度は酵素標識抗体やビオチン標識抗体の非特異的吸着に由来します。洗浄回数と方法を改善することでブランクの吸光度とバラツキを抑制する試みについては「ELISA の実技」の項で実例によりお示ししましたので参照して下さい。

要は洗浄回数を増やすことですが、強く洗浄するのは固相化抗体をはがしてしまう恐れがあり好ましくありません。優しく、繰り返しを増やすことが大切です。

8. ELISA 施行上の留意事項のまとめ

以下に ELISA で良い結果を出すために重要な一般的留意事項をまとめてみました。反省点にもなると思いますので、お心に留め置いて下さい。

● 検体の採取と保管

溶血、乳び、保存温度に注意
必要ならアプロチニン添加
要注意(事前チェック): エーテル麻酔、ヘパリン、
使用を避ける: アジ化ナトリウム、フッ素イオン
融解後攪拌を忘れないこと

● ピペットの検定と使用法

適正ピペットの選択、選択時検定、
使用法の選択と習熟
8連、12連のマルチチャンネルピペットは
標準溶液、試料の添加には使用しないこと。

● ウェルの洗浄

キャリー・オーバーの防止
標準品・検体添加後のウェル洗浄
洗浄水流の調整(自動洗浄器)
洗浄回数を増やして穏やかな洗浄
洗浄液完全除去

● エッジ効果の防止

「ウェルプレート、検体、試薬溶液」
の室温化
エアコン気流、輻射熱源の存在

● 標準品・検体の十分な反応

規定反応時間の厳守

● 十分な攪拌

● ウェルの底部引掻き防止

● 二重測定以上 三重測定推奨

(シングル測定不可)

9. 技能検定で腕を磨く

ELISA の手技は一見易しそうで、それがまた ELISA の「売り」でもあるのですが、それでもこの冊子をご覧になってお気づきになったように、**proficiency** が要求される手技でもあるのです。分析法バリデーションでの室間再現精度の検討は一方では測定室や測定者の技能検定 (**proficiency test**, **PT**)にも応用されます。つまり定期的に、均一な材料から取り出した試料を測定者に配り、分析の結果を計画実施管理者に報告してもらいます。そこでの検討結果は、全てのデータと共に各測定者にフィードバックされるのです。これによって反省が行われ、次の分析にどう反映されるかが試されることになります。

技能判定の基準のひとつに **Z score** があります。

$$Z = (x - x_a) / \sigma$$

x : 一人の測定者で得られた測定値

x_a : いく人かのエキスパートの測定値の平均値

σ : 実験結果の標準偏差の目標値

判定は **Z** スコアの絶対値が 2 よりも小さい場合は満足できる結果を出したとされ、 $2 < |Z| < 3$ の場合には信頼性が低い、 $|Z| > 3$ の場合には容認できないとされるのです。

IV. 付 録

付録 1：血液試料の採取法

血清試料の採取法

採血後 30～60 分血液を放置し、完全に凝固した後、そっとクロットを管壁からはがして（先の丸い細いガラス棒などが適しています）から冷却遠心機で分離します。この際あまり強力に回転させると赤血球が壊れ、溶血しますので注意。シバヤギでは設定温度 4～8℃、1,200g（回転半径 12cm、回転数 3,000rpm）、30 分で行っております。遠心分離の際の遠心力（g 値）の計算法は、

$$\text{回転半径} \times \text{角速度}^2 / 980$$

ただし回転半径は cm で表し、角速度は $6.28 \times$ （毎秒の回転数）です。

例えば上記の回転半径 12cm、3,000rpm では、 $12 \times (6.28 \times 50)^2 / 980 = 1207$ なので 1,207g、約 1,200g となります。

（註 $6.28 = 2\pi$ 、 $g = 980 \text{cm/sec}^2$ です。）

血漿試料の採取法

あらかじめ採血用注射筒、注射針、採血チューブ、砕氷を入れたアイスボックスを用意しておきます。血漿(plasma)を得たい場合はヘパリン或いは EDTA-2Na で処理した注射筒と注射針で採血します。ヘパリン処理は、注射針を注射筒に装着し、1,000 単位ヘパリンの原液を少量吸入し、空中でプランジャーを数回出し入れして余分なヘパリン液を除去します。EDTA-2Na の場合には最終濃度が 1mg/ml になるように加えます。

採取する血液量が少ない場合にはヘパリン処理したヘマトクリット管や採血管を使うほうが正確でしょう。

シバヤギでは、ヘパリンの最終濃度は $10\mu\text{g/ml} = 1.2$ 単位/ml で使用しております。

参考：ホルモン実験ハンドブック I 飼育と手技 日本比較内分泌学会編 ISBN 4-7622-4661-1 定価 2400 円（本体 2330 円）

付録 2：ペプチド溶液、試薬溶液の調製に関してあれこれ

ペプチド、タンパク質の保存・秤量と溶液の調製

ペプチドの中には水との親和性が強く、極端な場合には潮解性を示すものもあります。つまり放置すると空中の水分を吸収してべとべとになったり溶けてしまったりすることもあります。TRH などはその良い例です。一般的にはそれほどのことはありませんが、蛋白やペプチドは或る程度の吸水性があると考えておく方が良いでしょう。重量を測る場合には十分に水分を取り去ってから速やかに行う必要があります。

逆に中性では水に溶けにくいものもあります。例えば成長ホルモンやプロラクチンなど。

○保存法： 空気中の酸素による酸化が心配な場合は、保存瓶の中の空気を窒素で置換し、保存瓶をシリカゲルを入れた小容器で冷凍保存します。具体的には次のようにします。

1. 先ず、減圧用デシケータを用意します。デシケータ内部の棚の上に濾紙、またはペーパータオルを敷き、ペプチドや蛋白の入った容器の蓋を緩めて入れます（適当なホルダーなどに立てて。蓋は緩めるだけ）。
2. 次に真空ポンプにつないで十分に空気を抜きます。この際、デシケータのコックはほんの少し開くだけにして徐々に空気を抜きます。抜いたらコックを閉めます。
3. ゴム風船を用意し、窒素ボンベから窒素を風船に満たします。
4. その風船を減圧デシケータにつないで、デシケータのコックを慎重にほんの少し開きます。この際風船の大きさの変化を見ながら、少しずつ時間を充分掛けて窒素をデシケータに送り込みます。勢が強すぎるとペプチドのパウダーを舞い上がらせてしまいます。風船がそれ以上小さくならないようなら窒素の充填は終わりです。風船が小さすぎたら、一旦コックを閉めて再び風船に窒素を充填しなおし、更にデシケータに移します。
5. 充填が終わったら、デシケータの蓋をずらしてペプチドの容器を取り出し、蓋をしっかり締め、ビニールテープなどでシールします。
6. シリカゲルが入った小容器にペプチドの容器を入れ、蓋を締めてビニールテープなどでシールし、フリーザーに保管します。酸化が心配でなければ、気相を窒素で置き換えずに密封してシリカゲル入りの小容器に入れてフリーザーで保存します。溶液状態での保存は、希釈されたペプチドに溶液中の溶存酸素の作用が出る恐れがあります。安定度が確認されないうちはお勧めできません。溶液として保存する際は吸着を防止するため保護タンパク質の添加などが必要です。安定性が確認できた場合には溶液状態で -80°C （少なくとも -35°C 以下）での保存が良いでしょう。 -20°C の場合には溶質が底部に濃縮される可能性があります。これは溶液がゆっくりと凍って行くために起こるもので、フリーザーに入れる前にドライア

イス・アセトンなどの冷媒でいわゆるスナップ・フリーズすると良いでしょう。

○秤量と溶解

秤量するための前処置：出来る限り水分を取るために、強力な乾燥剤の入ったデシケータにペプチド容器の蓋を取って一晩静置してから、迅速に秤量します。天秤の箱の中には乾燥剤を入れて置きます（構造により出来ない場合もありますが）。

少量を正確に測るには天秤の種類を選ぶ必要があります。天秤には、マクロ天秤（0.1mgまで読めるもの）、セミマイクロ天秤（10 μ gまで読めるもの）及びマイクロ天秤（1 μ gまで読めるもの）があります。最後の桁はあまり信用できません。天秤は感度が良いものほど、室内の空気の動き、特にエアコンによる空気の流れに影響されますから、少なくとも皿の部分は箱に入ったようになっています。最近の電子天秤はむきだしのこともあります。透明な箱に入れて使用の方が良いでしょう。

秤量の仕方と溶液の調製：きれいに拭拭し乾燥した1-1.5cm角のアルミホイルを用意します。アルミホイルは手で触らぬこと。ピンセットとはさみで作ります。そのひとつの角を少し上に折っておきます。ここをピンセットでつまんで扱うためです。例えば或るペプチド（タンパク質）**約 1mg を正確に量る**場合、天秤はセミマイクロ天秤かマイクロ天秤を使います。マクロ天秤では1mgの場合10%以上の誤差を覚悟しなければなりません。天秤の皿をきれいに掃除して先ほどのアルミホイル片を載せ重量を記録し、目分量で約1mgをスパテルでその上に載せ、重量を測ります。載せた前後の重量を記録します。このときペプチドの量をスパテルで加減して1mgにするなんてことは絶対止めて下さい。載せたままの重量が良いのです。このことを「約1mgを正確に測る」と言うのです。

重量に対応する容量より少な目の溶媒をキリの良い量だけ小ビーカーあるいは小試験管に入れ、アルミ箔ごとペプチドをビーカーに入れてしまいます。その後足りない溶媒を計りとりてビーカーに加えるのです。重さで調節せず液量で調節するわけです。溶液が出来上がったところでアルミ箔を取り出します。アルミ箔を溶媒に入れなくて、アルミ箔の上の試料をビーカーなどに払い落とし、もう一度アルミ箔の秤量を行って試料を載せたときの重量との差をとる方法もあります。試料の吸湿性によりどうするかを考えるべきです。

以上はペプチドがよく溶媒に溶けることを前提としております。溶けるかどうか不明の場合は、ピペットに既知量溶媒を吸い上げておき、空のビーカーの底にペプチドの載ったアルミホイルを置いて、ピペットから一滴溶媒を落とします。ペプチドが溶けることを確認したら、残りの液をピペットから加え、その後必要量の溶媒を追加します。この操作は特にタンパクの場合重要です。溶解を確認しないで大量の溶媒を加えるといわゆる「だま」が出来て溶液になっていないことがあります。

○ペプチドやタンパク質が溶けない場合

上のような場合に溶けないで固まりになって、或いはパウダーのままではいる時 0.01N 程度の NaOH 溶液を少量（液量を決めて）溶けないタンパク質やペプチドの塊に加えてみます。たいてい溶けるはずですが、次に本来の中性溶媒を一挙に加えて薄めてしまいます。はじめから溶けにくいことが判っている時には、0.1M 程度の重曹（重炭酸ナトリウム）の溶液を作って置き、その一定量を加えて溶解させます。重炭酸ナトリウムはせいぜい pH 9 程度なので、NaOH のような強塩基性による変性を起こす可能性は少ないのです。たいていの場合溶かすことが出来ます。この溶液に目的の緩衝液を必要量加えて溶液を調製します。

緩衝液などの調製

○結晶水にご注意！

ある濃度の溶液を作るときに、例えば磷酸 2 ナトリウムの 0.1M 溶液を作るときに、 Na_2HPO_4 の分子量を計算して、それによって秤量してはいけません。先ず試薬ビンのラベルを見ることです。そこに $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ と書いてあることが多いからです。この場合結晶水を 12 分子含んでいるということですから、そこで、ラベルに記してある結晶水を含んだ分子量に基づいて秤量するのです。

○古い重曹は重曹ではない

重曹すなわち重炭酸ナトリウム、 NaHCO_3 は長く置いておくと空気中の炭酸ガスを吸収して一部炭酸ナトリウム Na_2CO_3 になっていることが多いのです。ビンの底にちょっと残っているだけの重曹はやめた方が無難です。いくつかの重曹を基盤にした生理的塩類溶液例えば Krebs-Henseleit 溶液などはリン酸塩のほかに重曹と塩化カルシウムを使っておりますが、重曹が一部炭酸ナトリウムになっていると、混合したとたん白濁します。新鮮な重曹ではこんなことにはなりません。このとき「失敗した！」と捨てないで、5%の炭酸ガス (5% CO_2 -95% O_2) のボンベを探し、この混合気体をぶくぶくと緩衝液にバブリングしてやると、あら不思議、白濁は見事に消えて透明な溶液になります。

ついでながら、苛性ソーダも変身するのですよ。

必要な試薬を溶かし終わった緩衝液は pH を測定しない限り作り終わったことになりません。必ず pH をチェックして下さい。

pH メータについて

○電極のゴム栓を外せ！

pH メータとは元来薄いガラス膜を基本にしたガラス電極と KCl を含む校正電極との電位差が pH に比例することを利用したもので、2本の電極を使うのが基本ですが、その2本を1本にまとめ、更に温度の影響を補正するための温度センサーを組み込んだ完全一本電極が使われています。電極を良く見ると2重になっており内側がガラス電極、外側が KCl 電極です。pH を計る際は電極の上部にあるゴム栓を必ず開放しましょう。このゴム栓のついている開口部は KCl の補充液の注入口だけの役目ではないのです。ここがオープンになることによって外気の圧力で KCl が KCl 電極下部についているセラミック（ガラス球のすぐ上にある白い小さな点）を通して少しずつ外に出しているのです。これで正確に pH が測定できるのです。例えばグリシンの溶液にゴム栓をしたままの電極を入れておいて pH がどうなるかを観察してみてください。最初は7を示しますがそのうち6.5くらいまで下がってしまいます。両性電解質がセラミックの中に浸透して KCl 電極を狂わせてしまうのです。ご注意ください！

○pH 基準緩衝液をけちるな！

pH メータを使う前には必ず備え付けの基準緩衝液でキャリブレーションすることになっています。面倒くさくてやらないという方は論外。研究者失格です。それでは、あなたの基準緩衝液はいつビンから出しましたか？ 1週間前？それとも1ヶ月前？キャリブレーションするために電極を突っ込む基準緩衝液の容器は密栓できますか？

pH メータを使う前のキャリブレーションでは、先ず容器に入っている基準緩衝液は捨ててしましましょう。新しくビンから必要量を注ぎ入れましょう。

基準緩衝液、特に塩基性の緩衝液は空気中の炭酸ガスを吸って pH が低くなってゆきます。ケチらずに毎回交換することです。塩基性基準緩衝液は保存ビンが 1/3 以下になったら新品を購入しましょう。

もっと詳しく知りたい人のために

激素庵ホームページ (<http://gekiso-an.kir.jp/>)

⇒「イムノアッセイ詳説」

Principles of Competitive Protein-Binding Assays

W. D. Odell & P. Franchimon 編

J. B Lippincott Company. (1971)

生化学実験講座 16 ホルモン 上

日本生化学会編

東京化学同人 (1977)

内分泌学

吉村、川上、井村、東条編

南山堂 (1978)

内分泌実験講座 5 ホルモン測定法(上)

井村、宮井編

講談社 (1982)

Principles of Competitive Protein-Binding Assays(改訂版)

W. .D. Odell & P. Franchimon 編

John Wiley & Sons, Inc. (1983)

酵素免疫測定法

蛋白質核酸酵素 別冊 No.31 (1987)

Chemical Analysis. Vol. 117

Application of Fluorescence in Immunoassays

Ilkka A. Hemmila

John Wiley & Sons, Inc. (1991)

Principle and Practice of Immunoassay

C. P. Price and D. J. Newman 編

Stockton Press (1991)

データのとり方とまとめ方—分析化学のための統計学とケモメトリックス

J. N. Miller and J.C.Miller (宗森 信、佐藤寿邦 訳)、共立出版

厚生省 医薬審第 338 号分析法バリデーションに関するテキスト (実施方法) について

平成 9 年 10 月

ICH Harmonized Tripartite Guideline

Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)

Current Step 4 version, Parent Guideline dated 27 October 1994

(Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 12996 incorporated in November 2005)

第 15 改正日本薬局方第 2 部、参考情報、25 分析法バリデーション、1647、(2006)

Recommendations for the bioanalytical method of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules.

DeSilva B, Smith W, Weiner R, et al.

Pharm Res. 20: 1885-1900 (2003)

日英術語対照表

日本語	英語
4-パラメータモデル	four parameter logistic model
NIH 単位	NIH-U
アーマ	immunoradiometric assay, IRMA
安定性	stability
異種抗体測定系	hetero-antibody assay
異種動物測定系	heterologous assay
エッジ効果(現象)	edge effect (edge phenomenon)
回帰曲線	regression curve
活性(値)	activity
カットオフ値	cut-off value
頑健性	robustness
管理血清	quality control serum, QC
希釈試験	dilution test, dilution linearity test
吸光度	absorbance
競合的結合タンパク測定法	competitive protein-binding assay, CPBA
競合的測定法	competitive assay
均一系測定	homogeneous assay
偶然誤差、確率誤差	accidental deviation, random error
グラム分子	mole, mol (記号)
繰り返しの数 (1 試料あたりのウェル、チューブ数)	Replicate
系統誤差	systematic error
検出限界	detection limit
検量線(標準曲線)	standard curve
抗原決定基	antigenic determinant
高濃度管理血清	HQC
国際単位	international unit (IU)

誤差	error
固相化抗体	coated antibody, capture antibody
三重測定	triplicate assay
時間分解蛍光測定	time-resolved fluorometry
室間再現精度	reproducibility
室内再現精度	intermediate precision, intra-assay precision, within-assay precision
真度	accuracy, trueness
精度	precision
生物学的測定法、生物検定	biological assay, bioassay
相関係数	correlation coefficient
相対標準偏差, 変動係数	relative standard deviation, RSD, coefficient of variation, CV
単位	unit (U)
直線性	linearity
低濃度管理血清	LQC
定量限界	quantitation limit
添加回収試験	recovery test, spike recovery test
凍結融解 (したもの)	freezing and thawing (frozen-thawed)
同種動物測定系	homologous assay
特異性	specificity
二重測定	duplicate assay, assayed in duplicate
日米 EU 三極医薬品承認審査 ハーモナイゼーション国際会議	International Conference of Harmonization ICH
倍々希釈	serial dilution
範囲、測定範囲	range, assay range
非競合的測定法	non-competitive assay
ひどい誤り	mistake, gross error
非特異的吸着	non-specific adsorption

標準誤差	standard error, SE, standard error of mean, SEM
標準品	standard preparation
標準偏差	standard deviation, SD
不均一系測定	heterogeneous assay
分散	variance
分析法	analytical procedure
併行精度	repeatability
放射競合測定法	competitive radioassay
放射受容体測定法	radioreceptor assay RRA
放射性同位元素	radioisotope
放射免疫測定法	radioimmunoassay
免疫学的測定法	immunoassay
モル濃度	molarity, M
有効化、有効であることの証明	validation
力価	potency

索引 (付録を除く)

-- アルファベット--		heterologous assays	13
absorbance	22, 24, 35 50	homogeneous assays	12
accidental deviation	47	homologous assays	13
accuracy	49, 77	horseradish peroxidase	23
antigenic determinant	17	HRP	23
aprotinin	82	immunoassay	5
assay	1	immunofluorometric assay (IFMA)	15
Berson	7, 8	immunogenicity	5
bioassay	19	immunoradiometric assay (IRMA)	14
competitive assay	9	in vitro assay	19
DELFLIA	15	in vivo assay	19
detection limit	49, 64	intermediate precision	49, 72
dilution linearity test	77	Lambert-Beer's law	24
edge 現象(効果)	86	linearity	49
ELISA 検量線のシミュレーション	69	logit	11
ELISA 施行上の留意事項	92	Luminescence immunoassay	16
ELISA の偶然誤差	47	M (molarity)	2
enzyme immunoassay (EIA)	15	measurement	1
ELISA	15, 21	mistake	47
epitope	17	mole (mol)	2
EXCEL による ELISA 計算	56	NIH-U	3
同検量線テンプレート	56	RIA(radioimmunoassay)	7, 14
同試料計算テンプレート	58	robustness	49, 83
同 Goal seek 法	60	specific binding	6
fluoroimmunoassay (FIA)	15	spike recovery test	78
gross error	47	spin-immunoassay	16
hapten	6	systematic error	47
HCG	20	TR-FIA	15
hetero-antibody assay	13	TMB	24

trasylol	82	validate (validation)	4
trueness	49, 77	validity test	5
-- ア行 --		クラススイッチ	6
アビジン	22	蛍光物質	15
アブソーバンス	22	系統誤差	47
アプロチニン	82	血液試料の pH	89
一次免疫応答	6	血液成分の影響	89
イムノアッセイの特徴と問題点	16	検出限界	49, 64
インスリン RIA	7	検量線の吟味	64
インスリン	17	検量線のシミュレーション	69
ウェルの数(replicate)	36	検量線の評価目安	66
エッジ現象(効果)	86	抗原	5
エッジ現象(効果)対策	88	酵素	14
エピトープ	21	酵素標識第二抗体	21
-- カ行 --		抗体	5
回帰曲線	24, 51	抗体固相化プレート	28
回帰と計算の具体例	53	国際標準品	3
攪拌操作	34	誤差	47
可変部	5	固相化抗体	7
頑健性	49, 83	-- サ行 --	
感度	4	サンドイッチ結合原理	10
管理血清	81	サンドイッチ法	23
希釈試験	77	シール	29
技能検定	93	色原性基質	23
キャプチャー抗体	7	室温安定性	81
キャリア	6	室内再現性	49, 76
吸光度	22, 24, 35, 50	室内再現精度	49, 73
吸光度のバラツキと測定値の バラツキ(ELISA)	68	自動ウォッシャー	30
競合的結合原理	9	試薬溶液調製法	25
均一系	12	試薬溶液の加え方	33

使用済み試薬等の処理方法	45	動物種	13
試料とキットの適合性テスト	91	特異性	4, 49
真度	49, 77	-- ナ行 --	
スピン試薬	16	二次免疫応答	6
精度	49	濃縮洗浄液	28
精度管理	84	-- ハ行 --	
生物学的測定法	19	倍々希釈	26
絶対量	1	ハイブリドーマ	7
洗浄液の完全除去	31	発光物質	16
洗浄回数	36	ハプテン	6
全般的注意事項	37	バリデート(バリデーション)	4
相関性試験	79	範囲(測定範囲)	49, 66
相対量	1	ビオチン	22
測定	1	非競合的結合	10
測定原理と検量線	10	比色定量	35, 50
測定試料の安定性	80	ひどい通り	47
測定値の計算 一回帰曲線による計算機処理	52	ピペッター確率誤差のテスト	42
測定値の計算 —マニュアル計算	51	ピペッターキャリーオーバー	43
測定法の評価	3	ピペッター許容誤差	31, 39
-- タ行 --		ピペッター種類	38
第二抗体	21	ピペッタータッチ&ゴー	32, 40
単クローン性抗体	6	ピペットとピペッティング—注意事項	90
長期安定性	81	ピペッター共洗い法	32
直線性	49	ピペットの精度と測定精度	44
定常部	5	ピペッタープレウエットティング法	32
定性的検出	1	ピペッターマルチチャンネル	32, 40
定量限界	49, 65	ピペッターマルチデリバリー	33, 41
定量的測定	1	併行精度	49, 73
添加回収試験	78	標準液と試料の添加	31
凍結融解安定性	81	標準液の調製法	26
糖タンパク質	18	標準物質(標準品)	3

比例配分希釈	27	放射性同位元素	13
不均一系	13	ポリクローナル抗体	6
物理・化学的測定法	18	-- マ行～ラ行 --	
プレートの洗浄－使用直前	29	免疫学的測定法	5
プレートの洗浄－反応後	30	免疫記憶	6
プレートリーダー	35	免疫補助剤	6
プロゾーン	66	モノクローナル抗体	6
分子多様性	18	有用性	3
分析法バリデーション項目	49	ランタニド元素	15
平均値の信頼区間	37	ランベルトとベールの法則	24, 35, 50
ペルオキシダーゼ	23	冷蔵庫安定性	81

書名 ELISA－A to Z

著者 株式会社シバヤギ技術顧問

群馬大学名誉教授

若林克己

発行者 株式会社シバヤギ

代表者 蜂巢達之

〒377-0007 群馬県渋川市石原 1062-1

TEL (0279) 25-0279

FAX (0279) 23-0313

E-mail : syc-info@shibayagi.co.jp

URL :<http://www.shibayagi.co.jp>

初版 2000年6月1日

増補版2 2002年4月10日

増補改訂版3 2005年11月1日

増補改訂版4(書名変更) 2006年10月1日

増補改訂版5 2011年3月10日