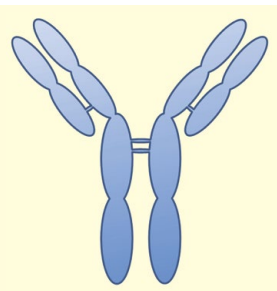


第1回 ELISA とは？

ELISAは免疫学的測定法のひとつ

ELISA は抗体を使った免疫学的測定法（イムノアッセイ、Immunoassay）のひとつです。Enzyme-linked immuno-sorbent assay の頭文字をとっています。「酵素結合免疫吸着測定法」、「酵素免疫測定法」と訳されています。読み方はエライザ／エライサ／イライザ／イライサと様々ですが、エライザが多いようです。

抗体は生体にとって異物である抗原が体内に入ることによって免疫反応を起こした結果作られるタンパク質です。イムノグロブリン(Ig) に属します。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。イムノアッセイで使われる抗体は主として IgG です。



ELISA は、目的とする物質とだけ結合する「優れた特異的結合能」と「ごく微量の物質でも結合できる強い親和性」を持つ抗体を結合試薬として利用した測定法です。

ELISAでは抗体をどう利用するのか？

ここでは利用頻度が最も高いサンドイッチ ELISA について説明します。通常 96 ウェルマイクロプレートを使います。

まず、ウェルの表面に抗体を吸着させておきます（コーティング、coating とか固相化と言う）。この抗体は固相化抗体（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。図1では都合上、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ます。抗体が固相化されたウェルに抗原を含む溶液（標準品、または測定試料）を加え、抗体に抗原が結合するまでの時間放置します（一次反応）。反応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、固相化抗体が抗原を認識する場所（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、検出抗体と言う）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（標識）してあります。

加えられた酵素標識第二抗体は固相化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、酵素反応によって発色する物質（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の濃淡を 96 ウェルマイクロプレート用の比色計で測定します。こうして固相化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ります。比色定量の結果は吸光度 (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、縦軸に吸光度をとり検量線を描きます。この検量線を用い測定試料の吸光度から試料中の抗原量を計算します。

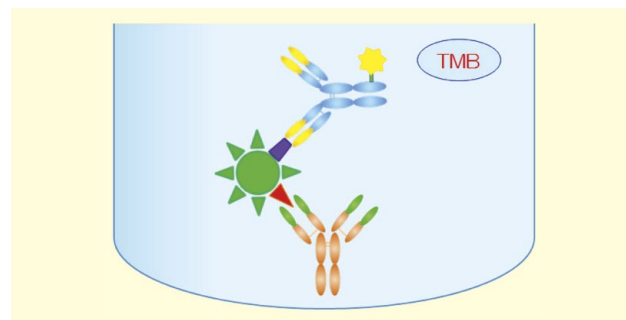


図1.

図1に示したサンドイッチ ELISA の実施方法はもっとも基本的な方法です。酵素の分子量はかなり大きいので抗体の結合に立体障害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立体障害を少なくする方法が考えられました。

下の図2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。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るアビジンです。このアビジンに酵素を結合させ、抗原

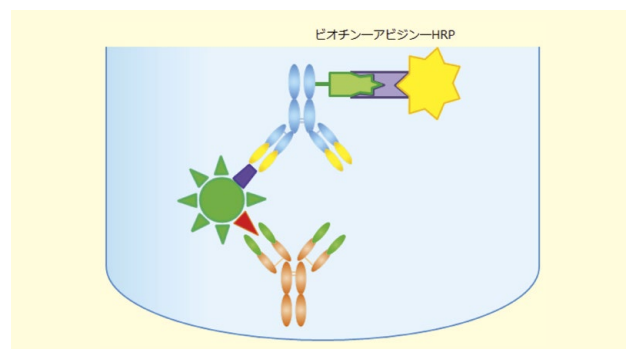


図2.

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ます。ELISA ではこのような改善方法も用いられています。

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

酵素と色原性基質

ELISA で良く用いられている酵素はペルオキシダーゼと言う過酸化水素等を基質として酸化反応を触媒する酵素です。ペルオキシダーゼにはいくつかあります。今回はHRPと呼ばれる西洋わさび (Horseradish) 由来のペルオキシダーゼの主な性質を表1に要約しました。

ここでひとつご注意したいのは、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1にあるようにCN⁻、S²⁻、F⁻、N₃⁻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に洗浄するので、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、洗浄後わず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です。

HRP の色原性基質として使用されているのは、TMBと言われる、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine) です。HRP によって過酸化水素

ペルオキシダーゼ (Hydrogen peroxidase, Horseradish peroxidase, HRP)	
反 応 起 源	色原性基質 + H ₂ O ₂ ⇌ 酸化型色素 + 2H ₂ O 西洋わさび (Horseradish)
分子量、至適pH 基質特異性	40,000, pH 6.5 色原性基質 (水素供与体) については特異性なし。 過酸化水素としては 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

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。

吸光度の測定

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、ウェルの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 (600 ~ 650nm) 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-ベールの法則 (Lambert-Beer's law) によって決められる数値のことです。

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

I₀: 入射光、I: 透過光、

ε: モル吸光係数、l: 吸収層 (cm)、

c: 濃度 (M)

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) になります。

例えば、光が10%しか透過しないときには、吸光度は100/10 = 10、log10 = 1となります。50%の透過率では、100/50 = 2、log2 = 0.301となります。吸光度3.0は透過率0.1%ということになります。プレートリーダーの性能にも寄りますが信頼できる限界付近を事前に決めておくことをお勧めします。

表2.

透過率 (%)	90	80	50	10	1	0.1
吸光度	0.046	0.097	0.301	1.000	2.000	3.000

今回は、「第2回 ELISA の操作法とそのポイント (前編)」の予定です。

本記事は、若林克己著「ELISA A to Z」(株式会社シバヤギ発行) をもとに、株式会社シバヤギで編集したものです。

~『イムノアッセイ』の測定技術習得をサポートします~

教材 / 研修用 / 技術評価用

ELISA トレーニングキット

ELISA トレーニングキットは、ELISA 測定を始められる方、ELISA 測定の技量を確認したい方、測定施設内 / 間で技術検定を実施したい方向けの製品です。

コード No.	メーカーコード	品 名	容 量	希望納入価格(円)
639-31581	AKRBS-TR2	ELISA training Kit	1kit	40,000

詳しくは、p.19 をご覧下さい。

第2回 ELISA の操作法とそのポイント (前編)

市販キットを使用した場合の一般的な ELISA 操作法のポイントをご紹介します。キットメーカーにより推奨方法が異なります。実際には使用キットの取扱説明書に従って操作して下さい。

ポイント①：測定前のチェック

【納品時のチェックポイント】

■製品の状態を確認しましょう。輸送温度が適切だったかどうか、損傷がないかなど、異常の有無を確認しましょう。

【冷蔵保管品の場合のチェックポイント】

■冷蔵庫の温度設定（製品指定温度）を確認しましょう。試薬は凍結厳禁の場合があります。

■冷蔵庫内で吹き出し口から直接冷気が当たる位置での保管は避けましょう。凍結する可能性があります。

■冷蔵庫の温度が低過ぎるとキット構成品の濃縮洗浄液中の塩が析出することがあります。

■上下逆さまに置いたり、横向きに置いたりしないようにしましょう。

*プレートに保存安定液が充填されているものがあります。上下逆さまに保管すると抗体固相面に気泡が接触してしまいます。

【実験室・機器のチェックポイント】

■反応温度が一定に調節できる実験室を選びましょう。

・エアコンやストーブ、恒温槽、オートクレーブ、パソコンなど熱源が近くに無いこと。

・空気の流れが小さいこと（風速 0.4m/sec 以下を推奨します）。

・湿度が 30% 以上あることを推奨。

・直射日光が当たらないこと。

■ピペットは定期的に校正を行いましょう。

■自動洗浄機、プレートリーダーなどメンテナンスされた機器、器具を使用しましょう。

ポイント②：ピペット (プランジャー型について)

■ピペット操作について

ELISA 測定でピペットを使用する場面は、標準溶液の調製、試薬溶液の希釈調製、標準溶液や検体、試薬溶液を 96 ウェルプレートに分注するところです。これらの作業で再現性良く分注するために、手慣れたピペットのご使用をお勧めします。プッシュボタンを一定の力で押せるピペットをお勧めします。

■ピペット選択について

96 ウェルプレートへの分注量は 5 μ L、10 μ L、50 μ L、100 μ L などさまざまです。5 μ L 分注する時は最大 10 μ L

のピペットを、50 μ L 分注する時は最大 100 μ L のピペットを選択するなど適切なピペットを使用しましょう。

96 ウェル全体に分注する際には連続分注器のご使用をお勧めします。また、メンテナンスされた電動ピペットもお勧めです。

ポイント③：プレートへの分注

【分注前の準備】

■96 ウェルプレートのアドレスを作成しましょう。どのウェルに何を入れるかを確認しましょう。

■96 ウェルプレートのシールは室温に戻してから剥がしましょう。

■ストリップタイプのプレートの場合は外れてしまった時のためにストリップの端に油性ペンで No. を書きましょう。

■キットの全試薬の室温化が必要な場合は室温に戻してから使用するようにしましょう（1 時間半～2 時間必要）。特に緩衝液、洗浄液は重要です。

【各標準溶液の分注時】

■0 濃度 (Blank)、一番薄い濃度の標準溶液から分注しましょう。連続分注時も薄い濃度のウェルから分注することをお勧めします。

■20 分前後で 1 プレート全体に分注できるようにしましょう。高感度タイプでは特にプレートの乾燥に注意しましょう。

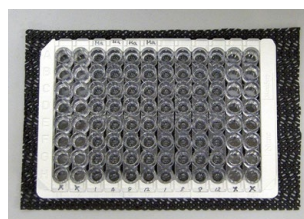
■連続分注時を除きチップは 1 ウェル毎に交換することをお勧めします。

■検体の希釈が必要な時は事前に希釈したものを用意しておきましょう。

■標準溶液、検体、第二抗体の入れ忘れに注意しましょう。

■泡を立てないように分注しましょう。

お薦めグッズ



96 ウェルプレートに分注する際にプレートのズレが気になる方へ。100 円ショップで販売している玄関マットなどのスベリ止めをプレートの下に敷き操作をすると便利です。

ポイント④：チップ使用法

チップ使用法のポイントに 2 つの方法があります。どちらか一方に統一して使用しましょう。

●プレウェットティング法

1. 新しいチップをセットした後、採取する溶液を第一ス

トップ（プランジャーが最初に止まる所）の範囲で1～2回吸い上げ、放出する「プレウェットイング」を行った後、溶液を満たします。

2. 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ている溶液を除去し取り出します（タッチ&ゴー）（図1）。
3. チップの先端をウェルの内壁から少し離し、溶液を排出します。この時プッシュボタンを最後まで押し、溶液を完全に排出します（ブローアウト）。
4. ウェルの内壁でタッチ&ゴーを行ってピペットを抜き出し、チップを交換します。この時チップ先端で内壁を擦らないように注意しましょう。

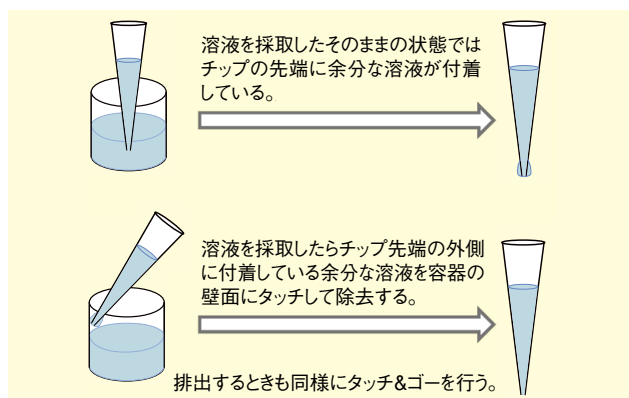


図1.

●共洗いの法

この方法は緩衝液などが既にウェルやチューブに入っている場合に適用できます。微量な検体、微量な各標準溶液の分注作業時などにお勧めします。

1. 新しいチップをセットし、第一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。
2. 容器の内壁でタッチ&ゴーを行いピペットを取り出します。
3. 緩衝液などが既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、第一ストップの範囲内で1～2回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。
4. ウェルの内壁でタッチ&ゴーを行いピペットを抜き出し、チップを交換します。この時、チップの先を96ウェルプレート内壁に擦らないように分注しましょう。

ピペッティング時における注意ポイント（一例）

プレウェットイング法、共洗いの法を使い分け正確な分注を行いましょう。ブローアウトをすると泡の発生が起こる可能性があります。泡の発生に注意しましょう。分注時にウェルの底面、壁面にチップを擦らないようにしましょう。固相化抗体が剥がれてしまいます。いつも一定のスピードで押し下げましょう。最後にタッチ&ゴーを行いましょう。

Q&A

Q：なぜ1検体1ウェルで測定してはいけないのでしょうか。

A：

●アッセイの操作法から考えると…

1ウェルでの測定結果をサポートする側面的データがないこと。もし測定操作に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できません。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なかっただろうと推定することになりますが、本当にそれで良いのかと言う疑問が残ります。二重、三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することができます。

それでは二重測定でも2つの測定値がかけ離れているときはどうするかということなのですが、二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。従って、同一実験群に属する他の試料との比較で考えることになります。三重測定ならば他の2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。特に二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ウェルの場合は自由度がゼロになります。したがって統計学的には信頼度はゼロです。二重、三重測定ならば平均値と標準誤差が計算できますので、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は試料数の平方根に反比例します。したが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。

次のグラフ（図2）は平均測定値を1、標準偏差を0.05（つまり相対標準偏差あるいは変動係数を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、二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。三重測定で区間は上下10%強です。二重測定は最低限行うようにしましょう。

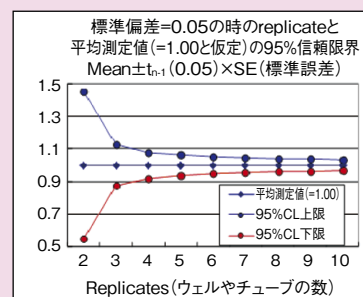


図2.

次回は、「第3回 ELISA の操作法とそのポイント（中編）」の予定です。

本記事は、若林克己著「ELISA A to Z」（株式会社シバヤギ発行）をもとに、株式会社シバヤギで編集したものです。

第3回 ELISA の操作法とそのポイント（中編）

ポイント⑥：試薬の希釈

【試薬希釈作業の準備について】

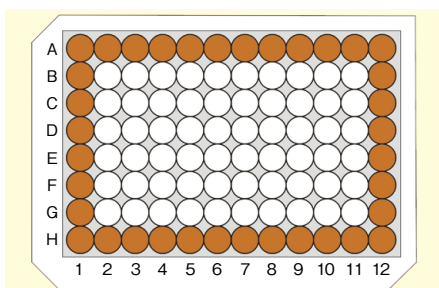
- キット構成試薬のうち、希釈が必要な試薬を確認しましょう。
- キット構成試薬の室温化が必要な場合は室温化をしましょう。
特に冬季や春先は実験台の表面温度は暖房を入れても直ぐに上昇しません。実験台の上にキムタオルなどを敷いて、その上にキット構成品のすべてを並べ、室温化することをお勧めします。
- 試薬原液を分取する前に良く攪拌しましょう。この時、泡立てないように注意しましょう。
- 標識試薬など液量が少ない試薬は攪拌後、軽く遠心して、キャップ、壁面に付いたものを落としてから使用しましょう。
- 試薬原液を緩衝液で1,000倍以上に希釈する時は、段階希釈することをお勧めします。
 - ・10倍希釈の一例：
 - 試薬原液 20 μ L + 緩衝液 180 μ L
 - 試薬原液 10 μ L + 緩衝液 90 μ L
 - ・1,000倍希釈の一例：
 - 10倍希釈した溶液 100 μ L + 緩衝液 9,900 μ L
 - 緩衝液は10,000 μ L を分取したところから、100 μ L を抜き取っても構いません。
 - ・希釈後は良く攪拌しましょう。この時、泡立てないように注意しましょう。
- 試薬は用時調製するようにしましょう。

ポイント⑦：エッジ現象

【エッジ現象（エッジ効果とも言う）とは？】

ウェルプレートの外周部に位置するウェルは、他の内側のウェルと比べて外部からの温度の影響を受けやすいことから、その部分で反応が他の部分より進行し過ぎる、或いは抑制されることを言います。

一般的には冷蔵庫に保管してあったウェルプレートや試薬、検体を室温より低い状態で使用すると外側が先に暖



まって反応が速くなり、吸光度が高くなります。発色液の温度が低い場合は顕著に現れます。冬ではヒーターの温風またはストーブの輻射熱の影響を受け、夏ではクーラーの冷風の影響を受ける可能性があります。その結果、Blank（ゼロ濃度）の吸光度が最低濃度の標準溶液のウェルより高く（暖められた場合）なったり、Blank を含めた二重測定標準品ウェルのプレート端側が常に吸光度が高いなどという現象が見られることになります。

【エッジ現象対策】

- 測定する1時間半から2時間前にウェルプレートや試薬、検体を冷蔵庫から出し反応温度に合わせましょう。
 - 測定開始前に試薬の温度を確認しましょう。
 - 空調機器／恒温槽／PC／人など熱源となるものの影響を直接受けないところで測定を行いましょう。
 - 反応温度を一定に保ちましょう。
 - 洗浄液の温度管理には特に注意しましょう。洗浄液は容量が多いので温度を合わせるのに時間がかかります。洗浄液の温度が反応温度と異なると洗浄の都度プレートの温度が変化してしまいます。
 - プレートシールやプレートカバーを使用しましょう。
 - プレートに温度が均一に伝わるようにしましょう。
 - インキュベータを使用する場合は緩衝液や洗浄液もインキュベータに入れておきましょう。
- *ただし、試薬の安定性は事前に確認して下さい。

ポイント⑧：洗浄

ELISA 操作において洗浄はとても重要です。特に洗浄不足は非特異的反応によるブランクの吸光度が上がり、測定範囲の低濃度域での感度が得られなくなります。このようなことを防ぐためにも洗浄操作を確実に行いましょう。

【洗浄のポイント（手洗浄の場合）】

- 濃縮洗浄液が付属の場合は、精製水の温度を室温に戻してから希釈しましょう。ご存じのように液体の温度は室温に比べ変化しにくいいため操作開始時に洗浄液の温度が反応温度と違う場合があります。特に汲み置きした精製水を使用する場合は注意しましょう。操作前に温度確認することをお勧めします。
- インキュベータを使用する場合は、洗浄液もインキュベータに入れ温度を同じにしましょう。
- 検体、標準溶液を分注後指定時間反応させた後の1回目の洗浄については、反応液を捨て、洗浄液を各ウェルに満たす時、洗浄液が溢れたり、飛び跳ねたりして、隣り

のウェルに移ることのないように注意しましょう。
この時の洗浄液量の目安は 250 ~ 300 μ L/ウェルです。
2 回目からは溢れても構いません。

- 洗浄液をウェルに満たす時、ある程度の水流の強さで行わないと洗浄不良を起こす可能性があります。
特に 8 連、12 連ピペットで分注する場合、洗浄が弱いことがあるので注意しましょう。
- ペルオキシダーゼ結合物反応後の洗浄工程は重要です。
ピペットでウェルに洗浄液を分注する場合には洗浄不良を起こしやすいので洗浄回数を増やすことで改善される

場合があります（例えば、指定回数が 4 回の場合は 6 ~ 8 回）。

- 洗浄液をウェルに満たした後は手のひらの上で軽く水平方向に円を描くように 5 ~ 10 秒程撹拌してから一気にプレートを逆さまにして洗浄液を振り捨ててください。軽く撹拌することにより洗浄効果が上がります。
- 洗浄後、次の試薬を分注するまでにウェルを乾燥させないように注意しましょう。ウェルの乾燥はブランクが上がる原因になります。洗浄操作を始める前に、必ず次に分注する試薬を準備しましょう。

ELISA トラブルシューティング

A：最後の段階で発色が薄い、または発色しない

原因と対策

- 1) 標準品や検体を入れ忘れた
- 2) 発色に関連する試薬液を入れ忘れた
 - ① ビオチン抗体
 - ② ペルオキシダーゼ結合抗体
 - ③ アビジン HRP
 - ④ TMB
- 3) 発色に関連する溶液の取り違いや希釈調製不良
ビオチン抗体、アビジン HRP など
- 4) 酵素阻害剤の混入
希釈に使用した容器にアジ化ナトリウム (NaN_3) が付着していたためにアビジン HRP 溶液に混入し、HRP が失活した。
* アジ化ナトリウムは防腐剤としてさまざまな溶液（特に緩衝液）に加えられています。そのような溶液を取扱った器具は要注意です。抗凝固剤として NaF を含む採血管が使用されている場合、或いは検体の保存にアジ化ナトリウムが使用されている場合、抗原抗体反応後、洗浄操作で洗い流されるはずですが、使用を避けるのが望ましいです。
- 5) プレートの過剰な洗浄
特に自動洗浄機の洗浄パワーの調節が強すぎると固相化されている抗体や反応物を剥がしてしまうことがあります。適当な強さに設定しましょう。また、洗浄モードはプレートモードでの洗浄をお勧めします。
マニュアルでの洗浄の場合はピペットや洗浄瓶の先端がウェル表面に接触しないように洗浄液を分注しましょう。
- 6) TMB 溶液を冷蔵庫から出してすぐに加えていませんか？
充分室温に戻してから加えないと発色が弱くなります（室温反応の場合）。



噴射ピンを用いて洗浄を行うと便利です。

B：目で見えて発色しているのに測定してみると吸光度が出ない
原因と対策

プレートリーダーの測定波長のずれが考えられます。リーダーの波長の調整を行いましょう。フィルター式のリーダーではフィルターの波長が正しいかどうか確認しましょう。

C：標準曲線が上手く描けない

原因と対策

- 標準曲線が右上がりにならない
全て低い吸光度
検体は発色している
⇒ 標準品の入れ忘れ ・ 標準品原液の入れ忘れ
・ 標準品原液の取り違い
- 検体も発色していない
⇒ 発色試薬の希釈ミス ・ 発色試薬の取り違い
・ 第 2 抗体の取り違い ・ 第 2 抗体の入れ忘れ
・ 第 2 抗体の変性、希釈ミス
- すべて高い吸光度
⇒ 発色試薬の変性（酸化）
- 標準曲線が右下がりになった
⇒ 標準曲線の添加順序が逆転した
- 標準曲線が凸凹になった
⇒ 標準品の希釈途中でミスがあった
- 標準曲線が右寄りで感度が出ない
⇒ 標準品の失活 ・ 反応時間を間違えた
- ブランク（ゼロ濃度）を含めた 2 重測定の標準品用のウェルのプレート端側の吸光度が内側のものよりも常に高くなる
⇒ エッジ現象が起きている可能性があります。
- 一般的注意事項
標準溶液の原液を分注する際まず Vortex で撹拌してください。この際、泡立てないように注意してください。
標準溶液の希釈系列を作製する際、高濃度の標準溶液を採取して緩衝液の入った試験管に加えた後、よく撹拌してから次の操作に移ってください。

次回は、「第 4 回 ELISA の操作法とそのポイント（後編）」（最終回）の予定です。

本記事は、若林克己著「ELISA A to Z」（株式会社シバヤギ発行）をもとに、株式会社シバヤギで編集したものです。

ELISA トレーニングキット

Shibayagi

コード No.	メーカーコード	品 名	容 量	希望納入価格(円)
639-31581	AKRBS-TR2	ELISA training Kit 	1kit	40,000

 2 ~ 10℃ 保存  20℃ 保存  80℃ 保存  150℃ 保存 表示がない場合は室温保存です。その他の略号は、巻末をご参照下さい。
掲載内容は、2017 年 10 月時点での情報です。最新情報は、siyaku.com (http://www.siyaku.com/) をご参照下さい。

第4回 ELISA の操作法とそのポイント（後編）

ポイント⑧：ELISA の反応温度・湿度

キットにより反応温度が指定されていますので一定の温度で指定温度を維持できるよう環境を整えることが重要です。夏は外気温が30℃を超える日も多くなってきます。出入りが多い部屋や開放された部屋では温度管理ができません。反応温度が高いとブランクや高濃度の標準溶液の吸光度の上昇が起きやすくなります。発色反応が進みすぎると高濃度付近の測定が正確にできません。温度管理には充分注意しましょう。

冬になりだんだん気温が下がってくると気を付けなければならないのが湿度です。室温化時間や反応温度も重要ですが、湿度も重要です。冬は外気の湿度も下がりますが、暖房を入れている部屋の湿度はさらに下がります。湿度が30%以下（目安です）で、なお且つ空気の対流がある場所で反応させることは避けましょう。静置反応中に分注した溶液が蒸散しその部分に非特異吸着が起こり、ブランク値上昇の原因となります。そのような環境でどうしても測定しなければならない場合は静置反応時にプレートシールを貼り反応させるようにしましょう。プレートシールが貼れない場合（測定を機械化している場合）で、プレートカバーで対応可能な場合はプレートカバーを使いましょう。プレートシールに比べると効果は弱いですがしないよりは良いでしょう。

ポイント⑨：ELISA の各過程における偶然誤差（バラツキ）の生じる要因

■ 96 ウェルプレートにおける要因

- ・温度が不均一になっていませんか？

■ 試料における要因

- ・試料の濃度が不均一（凍結融解で起こる溶質の不均一分布）ではありませんでしたか？
- ・試料の希釈により不均一（攪拌不良による溶液中での濃度の偏り）ではありませんでしたか？

■ 試料・標準品添加と結合反応における要因

- ・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）に問題はありましたか？
- ・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）はありましたか？

■ 試料添加（1次反応）後の最初の洗浄操作における要因

- ・洗浄液を溢れさせてしまいませんでしたか？隣のウェルに影響がでることがあります。
- ・洗浄液の残りはありませんでしたか？

■ 酵素標識抗体（ビオチン標識抗体）添加と反応における要因

- ・温度のバラツキ、時間的バラツキはありましたか？
- ・標識抗体の非特異的吸着はありましたか？ブランク値は高くないですか？

■ 発色液添加と反応における要因

- ・温度のバラツキ、時間的バラツキはありましたか？

■ 吸光度測定における要因

- ・プレート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）はありましたか？
- ・吸光度測定の精度（複数光度計の不均一）に問題はありますか？メンテナンス状況を確認しましょう。

【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、重量測定の変り（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、結合タンパクの存在、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、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。
- ・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）。

ポイント⑩：手技の比較

ELISA の手技は一見やさしそうでも、それがまた ELISA の「売り」でもあります。proficiency が要求される手技でもあります。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。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、その結果をすべてのデータと共に各測定者にフィードバックします。これによって手技などの見直しが行われ、次の分析に反映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 ：数名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ます。

ELISA トラブルシューティング

D : ブランク (ゼロ濃度) の吸光度が高い

原因と対策

- 1) ウェルの乾燥の可能性
各ウェルの洗浄液を除いてから次の試薬溶液を添加するまでの時間が長い場合、または各ウェルに直接空調機などの風が当たり、ウェルが乾燥した可能性があります。
- 2) 濃縮液として供給されている試薬の希釈率の誤り
指定された希釈率になっているかどうか確認しましょう。
- 3) 洗浄の不完全
自動プレート洗浄機を用いる場合は、キットに適した洗浄条件の設定が必要な場合があります。設定を正しく行ってから使用しましょう。吸引、排出ノズル位置、列ごとの吸引量、洗浄液噴射の圧力、吸引後の残量などの確認が必要です。マニュアルでの洗浄の場合は洗浄効果が不足していることが原因として考えられますので、洗浄回数を所定の回数より増やすことにより解決するケースもあります。特に酵素結合物反応後の洗浄が重要です。洗浄液をウェルに満たし、軽く10秒ほど手のひらの上で揺らせてから捨てると効果的です。
- 4) 反応過剰の可能性
プレートは正しい温度で、決められた時間でインキュベートしましょう。

E : 二重測定の場合のウェル間のバラツキが大きい

原因と対策

バラツキすなわち測定精度が大きくなってしまう主な原因は、反応の不均一な進行とピペティングのバラツキ、及び検体の不均一性です。

- 反応を不均一にするさまざまな要因
- 1) 洗浄液を吸引する際、アスピレーターを使ったためにウェルの底を引っかいた。
- 2) 試薬添加の際ピペットの先端がウェルの底を引っかいている。8連、12連ピペットで試薬を加えるとチップをウェルプレートに平行にすることが難しく、ウェルの底部を引っかく可能性が大きくなります。
- 3) プレートが十分に反応温度と同じになっていないため反応進行に差が生じた (エッジ現象)。
- 4) プレートにエアコンの冷風 (夏) や機械の冷却装置の吹き出し口からの温風が当たって温度を偏らせた。またプレートの傍にストーブや発熱する機器があると、輻射熱でエッジ現象が起こります。
- 5) エアコンやパソコンなどの温風が当たってウェルを乾燥させてしまった。
- 6) 洗浄液が完全に除去されおらず、ウェルに残っていた。
- ピペティングのバラツキ、特に標準溶液や検体をウェルに加える際のピペティングのバラツキはそのまま測定値のバラツキに結びつきます。
- ピペットの詰まり
血漿を凍結保存すると、融解した際にフィブリンが析出していることがあります。これをそのままピペットでサンプリン

グするとフィブリンがチップの先に詰まり、正しい液量を量りとすることができなくなる可能性があります。

- 検体の不均一
検体は測定まで凍結保存し、測定の際に融解することが多いですが、血清や血漿は凍結の際と、融解の際にタンパク部分が後で凍り、先に融けるということが起こり、その結果保存容器の底部が濃く上部が薄い状態になりやすいです。そのままサンプリングすると1回目と2回目では濃度が違うことになり、ウェル間のバラツキが大きくなります。凍結保存したタンパク溶液は必ず攪拌して均一にしてからサンプリングしましょう。
- 8連、12連ピペットをお使いの方は各チップに採取・排出される液量が等しいかどうかを検定してから使用しましょう。
- F : 標準曲線は取扱説明書通りに描けるが、検体の測定値を読み取れないか、読み取れても異常値となる。

原因と対策

- すべての検体で吸光度が低い
測定物質の失活
⇒ 失活防止に分解酵素阻害剤添加 ・ 保存条件の検体
検体に酵素阻害剤 (N^3 , F)
⇒ 使用を止める ・ 検体添加後の洗浄を充分にする
反応妨害物質の存在
⇒ 添加回収試験 ・ 希釈直線性試験を試みる
検体の凍結による影響
⇒ ごく少量の血清や血漿を比較的大きな容器に入れて凍結保存すると水分が蒸散して血清や血漿が濃縮されタンパク濃度が上がり反応を阻害したり、測定物質が変性したりする可能性があります。マウスの検体は特に量が少ないので注意しましょう。できるだけ小さいチューブを使用し測定前に充分に攪拌して下さい。
- 組織や細胞からの抽出検体、クロマトや等電点分離での分画検体で測定値が得られない。
検体のpHがELISAの測定限界を超えている。
⇒ 緩衝液で希釈し、中性化してから測定する
⇒ 少量の酸、塩基で中和してから測定する
抽出液に有機溶媒が入っている
⇒ 有機溶媒は抗原抗体反応を妨害するので緩衝液で希釈する。pHに注意。緩衝液で希釈してみ、アッセイできればその方法が良いでしょう。
- 検体の測定値が高すぎる (低すぎる)
他の報文よりも高い (低い)
⇒ その報文のキットと当該キットの標準品の純度が異なっている
いつもの測定値よりも高い
⇒ 今回のキットの標準品が変性している
いつもの測定値よりも低い
⇒ 検体保存中に失活 (事故)

検体の測定値に関する判定は、管理血清 (positive control) (同一検体などを小分け保管してあるもの) を測定ごとに検体として加え、同一の測定値が得られるかを確認するようにしましょう。

本記事は、若林克己著「ELISA A to Z」(株式会社シバヤギ発行) をもとに、株式会社シバヤギで編集したものです。

～ ELISA A to Z について～

私は微量測定法としての Radioimmunoassay (RIA) の導入を放射線医学総合研究所で始め、その後群馬大学でも研究者への啓蒙を長く続けてきました。RIA はごく少量の抗体と抗原さえあれば簡単に組み立てられる、いわば貧者の測定法ですが、RIを使用する制約と理論的にも測定感度の限界がありました。退官後関与した株式会社シバヤギで、ELISA に乗り換える必要から始めてみると、ELISA の長所が分かり、その技術を brush-up することに努めました。そして総まとめとして“ELISA A to Z”を書き上げました。ELISA の使用法と注意点を初歩の使用者にも理解できるように作成したものです。 若林克己