

## レビス™ ELISA トレーニングキット

### 1. ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項

- ・本キットは ELISA 法の研修を修了した方、または指導者の方でご使用下さい。
- ・準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
- ・試薬類を皮膚に付けないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
- ・本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
- ・検体は感染の危険性があるものとして充分注意して取り扱って下さい。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
- ・BSA が含まれる試薬を取り扱ったピペットを使用することによる BSA のコンタミネーションにご注意下さい。異常な発色の原因になります。メンテナンスされたピペットをご使用下さい。ピペットのクリーニング方法はピペットメーカーの推奨方法をご確認下さい。
- ・ピペッティングはゆっくり行って下さい。プッシュボタンは決して急激に戻さないで下さい。コンタミネーションの原因になります。
- ・検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウェル／1 チップのご使用をお薦めします。
- ・TMB 溶液は 96 ウェルプレートに使用するまでは薄い黄色澄明です。光を避けて保存して下さい。
- ・反応停止液は 96 ウェルプレートに使用するまでは無色です。反応停止液をウェルに入れるとすぐに青から黄色に変わります。
- ・ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温：20℃～25℃（実験台上またはインキュベータ内温度）を厳守して下さい。また、風速（エアコンの風も含む）：0.4m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下での測定は避けて下さい。やむを得ず、測定操作を風速：0.4m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートシールをすることに加え、下記のような方法をご検討下さい。  
例）インキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細はお問い合わせ下さい。
- ・各ステップでの静置反応時には、ウェルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼って下さい。
- ・試薬類は口でピペッティングしないで下さい。
- ・ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
- ・使用済みの検体、使用した消耗品等は 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。また、使用した消耗品や未使用の薬品類は所属先施設の規定並びに各地域の法令にしたがって廃棄して下さい。

### 2. 構成品

構 成 品	状 態	容 量
(A) 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12) / 1 枚
(B) アルブミン標準品	希釈後使用	200 $\mu$ L / 1 本
(C) 緩衝液	そのまま使用	60mL / 1 本
(D) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液	希釈後使用	200 $\mu$ L / 1 本
(F) TMB 溶液	そのまま使用	12mL / 1 本
(H) 反応停止液	そのまま使用	12mL / 1 本
(I) 洗浄液 (10×)	希釈後使用	100mL / 1 本
(J) プレートシール	—	3 枚
(K) プレートフレーム	—	2 個
(T) 検体	希釈後使用	1mL / 1 本

トレーニングキットは一つのキットを 3 人で使用するようになっております。

そのため、プレートフレームが 2 個同梱されています。

※ウシ血清は BSE 発生国以外の材料を使用しています。

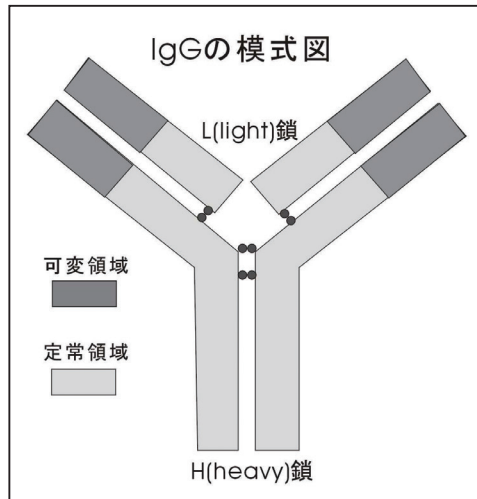
### 3. キット以外に必要な器具 ☐チェックリスト

- ☐精製水（蒸留水）
- ☐標準溶液希釈用試験管
- ☐洗浄液希釈用ガラス器具（メスシリンダー・ビーカー・瓶）
- ☐チップ交換型シングルストロークピストンピペット（使い捨てチップで 50  $\mu$ L を正確にピペッティングできるもの、及び 100  $\mu$ L ～ 500  $\mu$ L を正確にピペッティングできるもの）

- ☐ 連続分注ピペット（例 Eppendorf の multipette plus）、100  $\mu$ L を連続分注できるもの
- ☐ ペーパータオル等の吸水性のあるもの（洗浄後にプレートに残った液を取り除く）
- ☐ 攪拌器（Vortex タイプ）
- ☐ マイクロプレート・ミキサー（約 600rpm ～ 1200rpm）
- ☐ 96 ウェルプレート用洗浄機（あれば好ましい）または噴射ピン
- ☐ 96 ウェルプレートリーダー（450nm  $\pm$  10nm、620nm：600nm ～ 650nm）
- ☐ データ計算用ソフトウェア
- ☐ マニュアル計算時：通常の定規と自在定規（鉛芯で自由に曲げることのできる定規）
- ☐ マニュアル計算時：方眼紙：通常の方眼紙、片対数方眼紙、両対数方眼紙

#### 4. ELISA とは

##### ELISA は免疫学的測定法のひとつです



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。正式には、Enzyme-linked immuno-sorbent assay と言います。「酵素と関連した免疫吸着体測定法」という意味です。酵素免疫測定法という言葉も使われますが、ELISA のほうが一般的です。

**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。

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。

イムノグロブリン（Ig）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。

IgG は分子量約 146,000 の糖タンパクで、H 鎖（分子量約 5 万）2 本と L 鎖（約 2.5 万）2 本から構成されています。

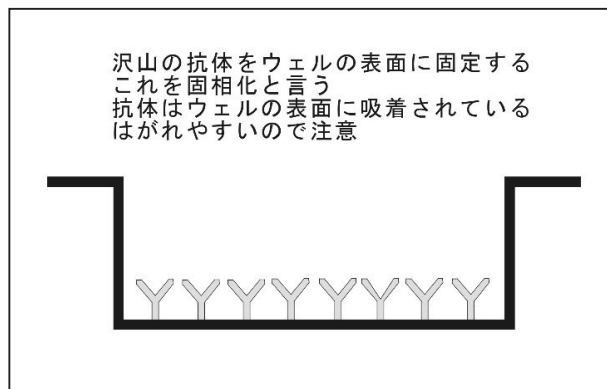
抗体はそれを作った原因となった抗原とだけ結合する性質（特異的結合能）を持っています。抗原と結合する部分は可変領域です。

**抗原**とは、1) 抗体を作る性質（immunogenicity）があり、2) かつ抗体と特異的に結合する性質（specific binding）を兼ね備えた物質です。一方、抗体とは結

合するが抗体を作る性質を持たない物質はハプテン（hapten）といわれています。**免疫学的測定法**とは、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なのです。

##### ELISA は抗体と酵素を使った測定法です

##### 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（コーティング、coating または固相化とも言います）おきます。この抗体はキャプチャー抗体といって、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ます。Yの先端の部分が抗原を認識し、結合する可変領域があります。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す。これに抗体の溶液を加えると自動的に吸着が起こるのです。でき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できるようになります。

では、キャプチャー抗体をどのように使うのでしょうか。模式図を使って説明しましょう。

ここでは画面の都合上、抗体が1個しかついていないように描かれています。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、測定検体）を加え、固相化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。

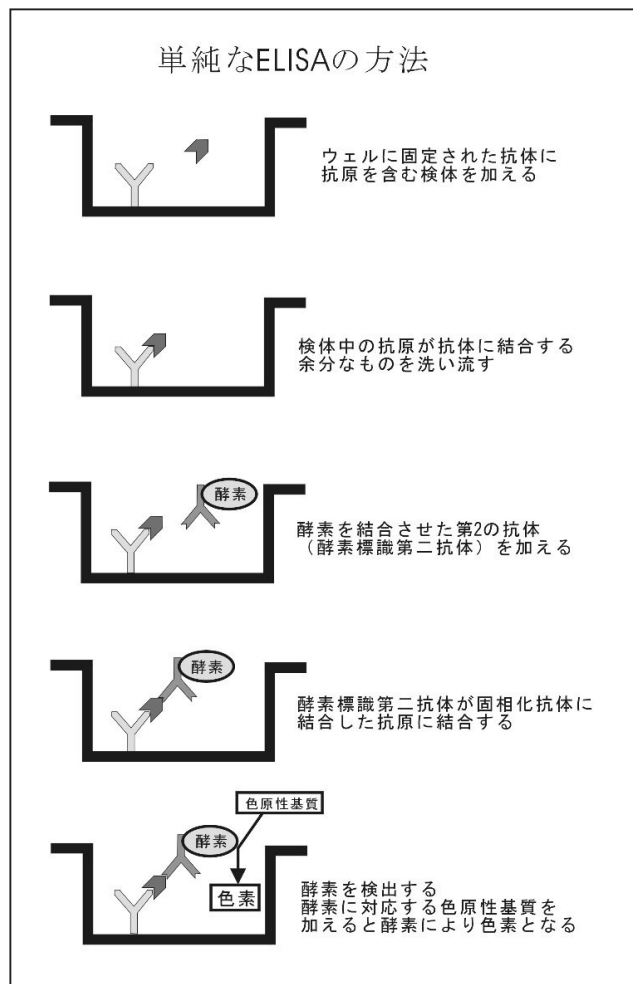
結合が終わったら、余分な液を捨て、ウェルを洗います。こうすると固相化抗体に結合した抗原だけがウェルに残ります。

次に、抗原のキャプチャー抗体が認識する場所（エпитープ）とは異なるエпитープを認識する抗体（第二抗体と言います）を加えます。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、酵素反応を行わせます。色原性基質は酵素の作用を受けて色素に変わります。

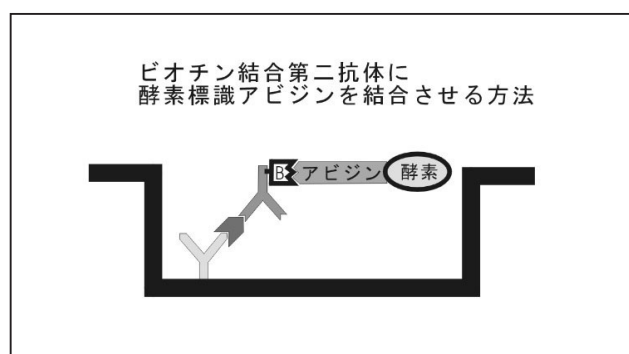
そこで反応停止液を加え酵素反応を止めてから、色素の呈色を96ウェルマイクロプレート用の比色計で測定するのです。こうしてキャプチャー抗体に結合した抗原の量が色素として測定できることになります。比色定量の結果は、吸光度（アブソーバンス、absorbance）として表現されますので、標準品の測定結果から横軸に抗原濃度、縦軸に吸光度をとることによって検量



線が描かれ、測定検体の吸光度から検体中の抗原量を計算するわけです。図に示した ELISA の実施方法は、もっとも単純な方法です。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。

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。ビオチンは、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。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。



## LBIS™ シリーズのキットで使用している酵素と色原性基質

LBIS™ シリーズ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おります。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ました。

ペルオキシダーゼ (Hydrogen peroxidase, Horseradish peroxidase, HRP)	
反応	色原性基質 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ⇌ 酸化型色素 + 2H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> OOH, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OOH のみ
阻害剤と活性化剤	阻害剤: CN <sup>-</sup> , S <sup>2-</sup> , F <sup>-</sup> , N <sub>3</sub> <sup>-</sup> (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 <sub>3</sub> 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<sup>-</sup>, S<sup>2-</sup>, F<sup>-</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup> です。特に血液検体を採取するときに採血管がフッ素や NaN<sub>3</sub> 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しますから、阻害剤が決定的な酵素活性抑制を起こすことはないのですが、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ありません。抗凝固剤としてはヘパリン、EDTA をお使い下さい。抗凝固剤を使用せず、本キットのように血清を検体とすることもあります。

LBIS™ シリーズのキットで HRP の色原性基質として使用されているのは、TMB と言われる 3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン (3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine) です。

前表にありますように、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。この結果できた色素は反応を停止するように加えられた硫酸酸性下で 450nm に吸収を持ち、黄色を呈します。

## 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す。

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

$I_0$ ：入射光， $I$ ：透過光， $\epsilon$ ：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、 $100/10 = 10$ 、 $\log_{10} 10 = 1$  となります。50%の透過率では、 $100/50 = 2$ 、 $\log_{10} 2 = 0.301$  です。

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る路（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できるのです。

## 5. ELISA は具体的にどう実施するのでしょうか

### 試薬の調製法並びに準備

キットを箱のまま測定開始1時間半から2時間前に冷蔵庫から取り出し静置して室温（20℃～25℃）に戻して下さい。

(1) キットの試薬類は室温（20℃～25℃）に戻してから使用して下さい。

(2) 洗浄液：(I) 洗浄液（10×）を、精製水で10倍に希釈します。

(3) ペルオキシダーゼ結合抗体溶液：(C) 緩衝液を用いて **100倍**に希釈します。

(4) 2.で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。

(5) **アルブミン標準品の希釈**：アルブミン標準品（500ng/mL）を（C）緩衝液で、希釈します。

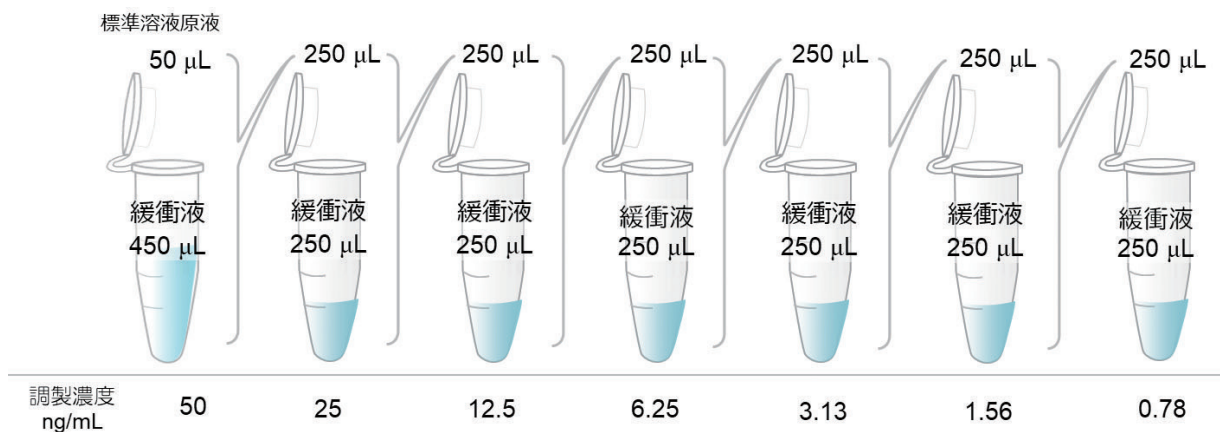
下記は一例です。

ピペットは標準液、緩衝液共に精度の優れたシングルストロークピストンピペットをお使い下さい。

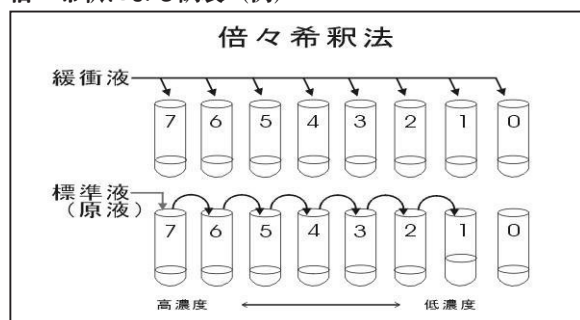
四角で囲んだ0.78ng/mLの調製は任意です。技量により設定して下さい。

濃度 (ng/mL)	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0
標準品 (μL)	原液：50	250*	250*	250*	250*	250*	250*	0
緩衝液 (μL)	450	250	250	250	250	250	250	250

\*：ひとつ高濃度の標準溶液



### 倍々希釈による調製（例）



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。次にそのチューブから指定量の混合液をとり、次のチューブに加え、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。

#### 検体の準備

後で行う色々な検討を含めて、検量線作成用標準品溶液と検体を次のように準備しましょう。

- 1) 検量線系 (Standards) : 2 重測定 (上記)
- 2) 検体 (Samples) : 添付の希釈ウシ血清検体を緩衝液にて倍々希釈で 4 段階希釈 (2 倍、4 倍、8 倍、16 倍)

#### 測定方法

抗体固相化プレートのシールはプレートが室温に戻ってから剥がして下さい。温度が低く、シールが硬いうちに剥がすと、きれいに剥がれないことがあります。キットは室温に戻してから作業を開始して下さい。

重要な操作の箇所には基本的操作法を具体的に記してありますので、その部分を参照しながら操作を実行して下さい。

(1) プレートのシールを剥がし、ウェルストリップを 4 連一組としてプレートフレームにセットします。

(2) 洗浄液を各ウェルに満たし、軽く振盪後捨てることを 4 回繰り返して洗浄します。

洗浄の具体的な方法を説明します。

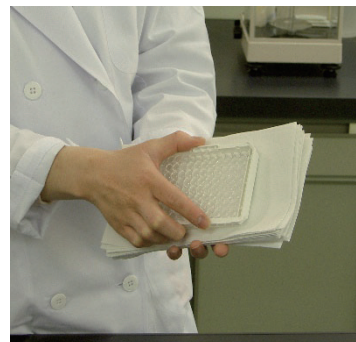
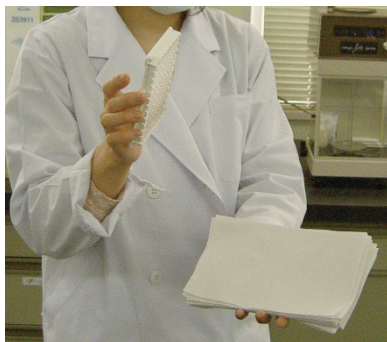
使用直前の洗浄：プレートを片手で持って第 1 回目の洗浄液を洗浄瓶から各ウェルに満たします。軽く 10 秒ほど振盪し、流しの上で一気に逆さまにします。逆さまの状態ですべてのウェルの反応液を流しの中に振り落とします (3 回目、手が滑ってプレートを落とさないよう注意)。



第 2 回目の洗浄液をウェルに加え、振盪後廃棄します。更に第 3、4 回目の洗浄を行います。

洗浄液の完全除去

4 回目の洗浄液を廃棄後、何枚か厚く重ねたペーパータオル上にプレートをパンパンと何度か叩きつけて、プレート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からこの操作は必要です。ウェルが乾燥しないうちに次の溶液を分注して下さい (ノズル調整は事前にご確認下さい)。

(3) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を 100  $\mu$ L ずつ分注します (プレート図参照)。

(4) 検体測定ウェルに検体を 100  $\mu$ L 添加します (プレート図参照)。

標準溶液と検体の採取と加え方

標準溶液、検体ごとに異なる溶液を採取添加することになるので、チップ交換式のシングルストローク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。



ここでは下記の方法で行って下さい。

#### 「プレウエットイング」法

- 新しいチップをセットした後、採取する標準溶液または検体を第1ストップの範囲で2、3回吸い上げ元に戻す「プレウエットイング」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。
- 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。
- 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。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。

※凍結保存された検体溶液は必ずよく攪拌してから検体を採取して下さい。融解した検体は底部に溶質が濃縮されている可能性があります。

ウェルプレートの使用図（標準品 B、S、検体 T の配置）

S1 ～ S7：各標準品濃度、 B：Blank（0 濃度）、 T1 ～ T4：検体  
それぞれの8連ストリップの上端に1～4の番号をマジックで書いて下さい。  
（万一外れてバラバラになったときの備えです）

	1	2	3	4	
A	B	B	T1		
B	S1	S1	T1		
C	S2	S2	T2		
D	S3	S3	T2		
E	S4	S4	T3		
F	S5	S5	T3		
G	S6	S6	T4		
H	S7	S7	T4		

4 列目は自由にご使用下さい。Blank にしても良いですし、余った標準溶液を測定しても良いです。

#### (5) マイクロプレート・ミキサーなどを用いて軽く攪拌します。

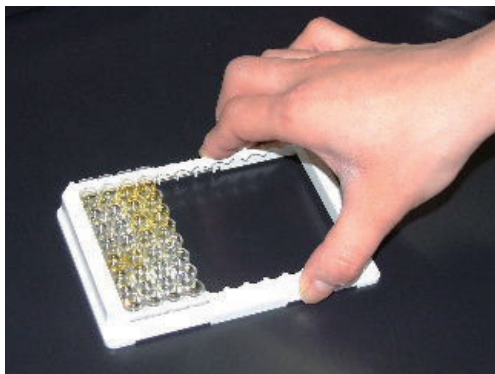
攪拌操作

試薬を加えた後、攪拌操作が必要になりますが、液量が少ないため、短時間の攪拌で充分です。



できれば、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）のような機器にプレートをセットし、**800rpm、10 秒×3 回**程度攪拌して下さい。





もしも攪拌器がない場合は、プレート表面を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。

(6) プレートシールを貼り、室温（20℃～25℃）で1時間静置します。

(7) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし4回洗浄します。その後、ペーパータオルなどでプレートを逆さにしてウェルに残った液を取り除きます。

反応液の廃棄と洗浄：反応が終了した96ウェルプレートのウェル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1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あふれ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  $\mu$ 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掻く可能性があるため使用禁止）。第1回目だけが大事です。

プレートを10秒ほどゆすってから流しの上で一気に逆さまにします。逆さまの状態では96ウェルの洗浄液を流しの中に振り落とします。（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）

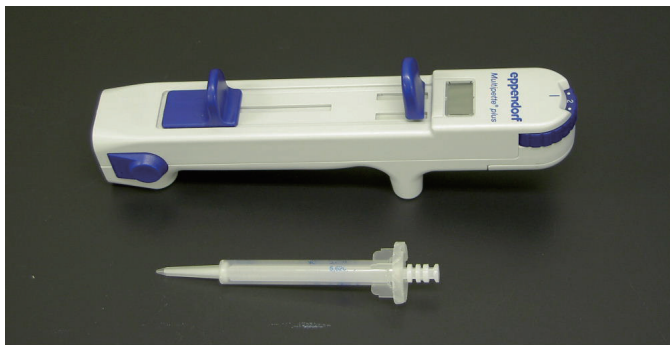
第2回目の洗浄液をウェルに加えますが、これからはあふれてもかまいません。同様に廃棄します。更に第3、4回目の洗浄を行います。

最後に洗浄液の完全除去（前述）を行います。

(8) 各ウェルに、ペルオキシダーゼ結合抗体溶液を100  $\mu$ Lずつ分注します。マイクロプレート・ミキサーなどを用いて軽く攪拌します。

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）のできるピペット（例えば、Eppendorf multipette plus）が適しているため、それを使用する方が望ましいです。



マルチピペットの使い方

○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）。

(9) プレートシールを貼り、室温（20℃～25℃）で1時間静置します。

(10) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし4回洗浄します。その後、ペーパータオルなどでプレートを逆さにしてウェルに残った液を取り除きます。

(11) 各ウェルにTMB溶液を100  $\mu$ Lずつ分注します。マイクロプレート・ミキサーなどを用いて軽く攪拌します。

(12) プレートシールを貼り、室温（20℃～25℃）で30分間静置します。

- (13) 各ウェルに反応停止液を 100  $\mu$ L ずつ分注後軽く攪拌し、発色反応を停止します。
- (14) 直ちにマイクロプレート用分光光度計で 450nm（副波長 620nm）での吸光度を測定します。

操作手順の要約

抗体固相化プレート	
↓ 洗浄 4 回*	
希釈検体 又は 標準溶液	100 $\mu$ L
↓ 攪拌**、室温（20℃～25℃）静置***、1 時間反応	
↓ 洗浄 4 回*	
ペルオキシダーゼ結合抗体溶液	100 $\mu$ L
↓ 攪拌**、室温（20℃～25℃）静置***、1 時間反応	
↓ 洗浄 4 回*	
TMB 溶液	100 $\mu$ L
↓ 攪拌*、室温（20℃～25℃）静置***、30 分間反応	
反応停止液	100 $\mu$ L
↓ 攪拌*	
直ちに吸光度測定（主波長 450nm、副波長 620nm）	

- \* プレート洗浄機またはピペットで洗浄液を加える場合の液量目安：300  $\mu$ L/ウェル  
プレート洗浄機圧力目安：5mL/分～25mL/分（ノズルの径により異なります）  
洗浄液排出後の乾燥にご注意下さい。
- \*\* 攪拌の目安：600rpm～1200rpm、10 秒間×3 回
- \*\*\* 攪拌終了後 96 ウェルプレートの上にプレートシールを貼って静置して下さい。  
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

6. 測定操作の終わった後で検討すること

- 1) 肉眼的計測
- それぞれの検体の呈色を眼でみて標準品と比較し、一番近い標準品の濃度をその検体の濃度としてみましょう。これで比色計が無くても半定量ができるのです。
- 2) 吸光度から検量線を描き測定値を求める（マニュアル計算）
- 比色計は自動的に濃度まで計算することもできますが、まず全てのウェルの吸光度を求めましょう。
- あるいは自動計算の際各ウェルの吸光度がプリントされればそれを使います。
- 620nm での吸光度との差が求めてあればそれを使い、そうでなければ 450nm の吸光度のみでも結構です。620nm での吸光度はウェルの不均一性、キズ等による吸光度の変化を補正するためです。
- 検量線用吸光度表（0.78ng/mL は任意で調製して下さい）

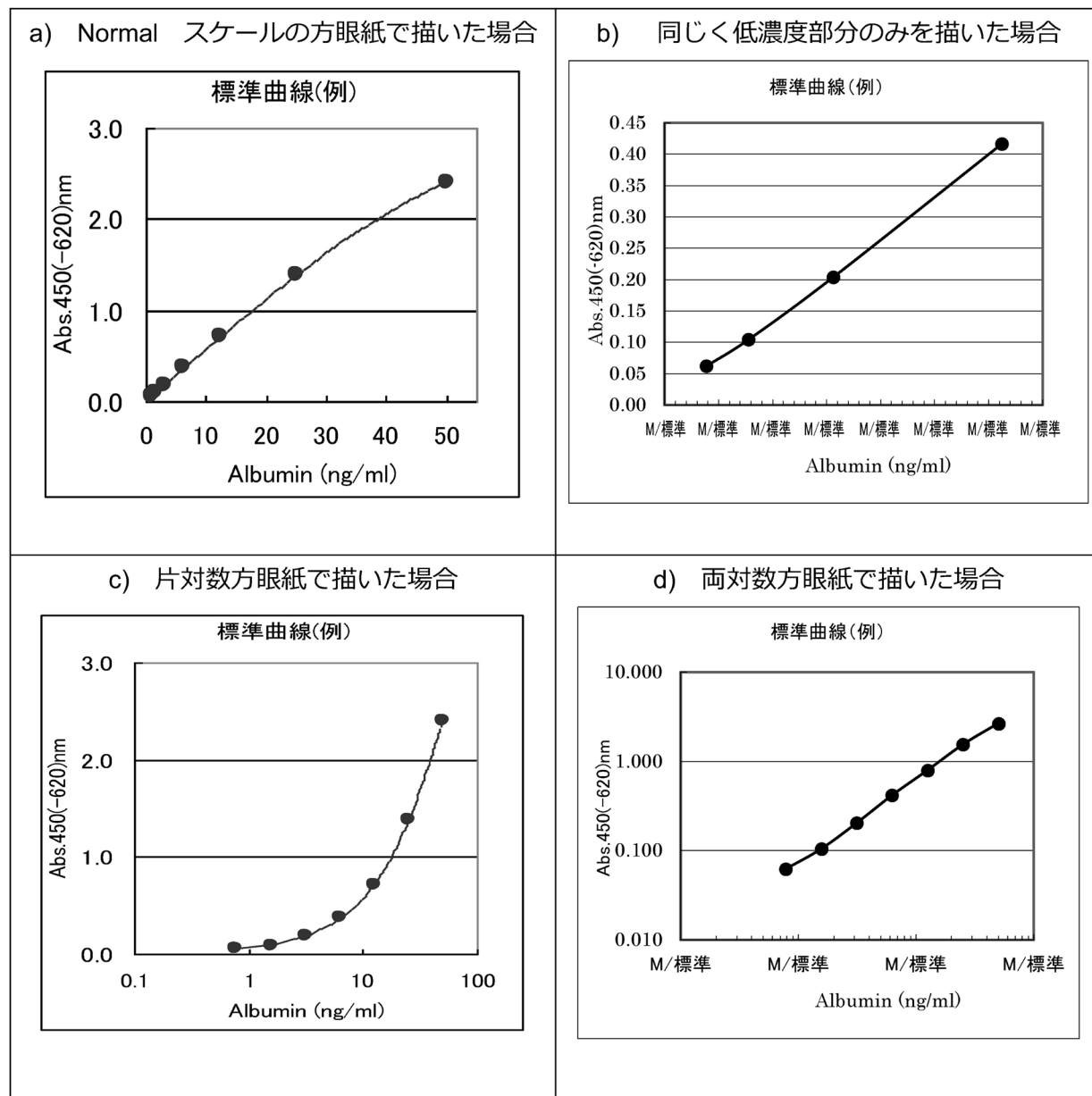
標準品濃度（ng/mL）	吸光度 ウェル 1	吸光度 ウェル 2	平均値	△ Blank
50				
25				
12.5				
6.25				
3.13				
1.56				
0.78				
Blank（0 濃度）				—

- △ Blank：Blank の平均吸光度を差し引いた値
- Blank 及び標準品濃度ごとに吸光度の平均値を求めます。検体については個々のウェルの吸光度を使います。
  - Blank の吸光度の平均値を差し引いて下さい（検体の吸光度からも）。
  - 方眼紙（通常、片対数、両対数）を使って、まず X 軸に標準品濃度を目盛ります。（片対数の場合、対数軸を X 軸にして下さい。）
  - 次に Y 軸に吸光度を目盛ります。
  - 各標準点の標準品濃度（x）と吸光度（y）を座標としてそれぞれの標準点（x、y）を書き込みます。
  - 自在定規を用いて標準点を通る曲線を描いて下さい。これで検量線が完成します。
  - 検量線を用いてそれぞれの検体（ウェル毎の）の吸光度から測定値を読み取って下さい。



・マニュアル計算をしてみると、X 軸、Y 軸の設定によって検量線の形が変わってくるのがお分かりと思います。更に、通常の方眼紙を使ってノーマルスケールでとった場合に、低濃度領域では標準点が非常に近接して読み取りが困難になること、また片対数方眼紙で X 軸に対数目盛りを使うと、各標準点は X 座標に関しては等間隔となるが、Y 軸に関してはそれぞれの標準点が近接してこれまた読み取りにくいことがお分かりになるでしょう。これに対して両対数方眼紙を使って X 軸、Y 軸を共に対数目盛りにすると、標準点が殆ど等間隔に並ぶこと、従って楽に読み取りができることがお分かりでしょう。

参考のために、上記 3 種類の検量線のモデルを EXCEL でデモ用に作ってみました。  
吸光度はゼロ濃度 (Blank) の吸光度を差し引いて描いております。



註) EXCEL で X 軸や Y 軸を対数目盛りにすると、目盛りは 0.01、とか 0.1、1、10 などから始めざるを得ないので、このキットでもそうですが、標準品濃度の最低濃度によっては不要な部分を生じ、間の抜けた検量線グラフが出来てしまいます。EXCEL で検量線を描き計算する方法については 11 ページの「EXCEL で測定値を計算する方法」をご参照下さい。検量線は 0.78 ~ 50ng/mL の範囲で描いたものです。

### 3) マイクロプレート用比色計で自動計算

- 比色計を個々の検体について各ウェルの吸光度からウェルごとの測定値を計算するように設定します。
- 比色定量を実行して下さい。

### 4) 測定値の観察と検討

#### a. 測定感度について

通常の方眼紙を使って、ゼロ濃度 (Blank) を含め、低濃度標準点 (2 ~ 3 点で充分です) の低いほうから 3 点くらいのそれぞれの平均値 (この場合は Blank 値を引かないで) Blank 入り低濃度領域の検量線を作して下さい。

Blank の吸光度平均値と標準偏差 (SD) を計算しましょう。

Blank の吸光度平均値 + 2 SD を計算しましょう。(慣習的な測定感度を計算するため)

Blank の吸光度平均値 + 3.3 SD を計算しましょう。(ICH 合意による検出限界、detection limit, DL を計算するため) (正確な判定には Blank のウェル数をかなり多くすることが必要です)

この値を先ほどの検量線からアルブミン濃度に換算しましょう。いくらになりますか？

この値がこの測定系の測定感度、および検出限界と考えられます。

Blank の吸光度平均値 + 10 SD を計算しましょう。(ICH 合意による定量限界 (quantitation limit, QL) を計算するため)。DL, QL については参考 (13 ページ) を参照して下さい。1.56ng/mL よりも定量限界が低くなっていれば 0.78ng/mL まで測定範囲を広げて再測定してみてください。これは技量によります。

b. 検体に関して

b-1. 測定精度の検討

平均値と標準偏差を求め、平均値に対する百分率、即ち変動係数 (Coefficient of Variation, CV) を計算して下さい。この値が測定精度を示します。下の表を完成させて下さい。EXCEL の関数ツールを用いると楽に計算ができます。

この表はマニュアル計算用です。吸光度は△ Blank (濃度ゼロの吸光度との差) を記入。

検体	ウェル 1 吸光度	ウェル 2 吸光度	ウェル 1 測定値	ウェル 2 測定値	平均値	標準偏差	変動係数 CV (%)
T1							
T2							
T3							
T4							

変動係数 CV (%) = 標準偏差 / 平均値 × 100

b-2. 希釈直線性の検討

希釈直線性は正確度を検討する重要な手段です。

通常の方眼紙を使い、横軸に希釈度の逆数、縦軸に測定値をとり各希釈検体 (T1 ~ T4) の測定値をプロットしてみてください。

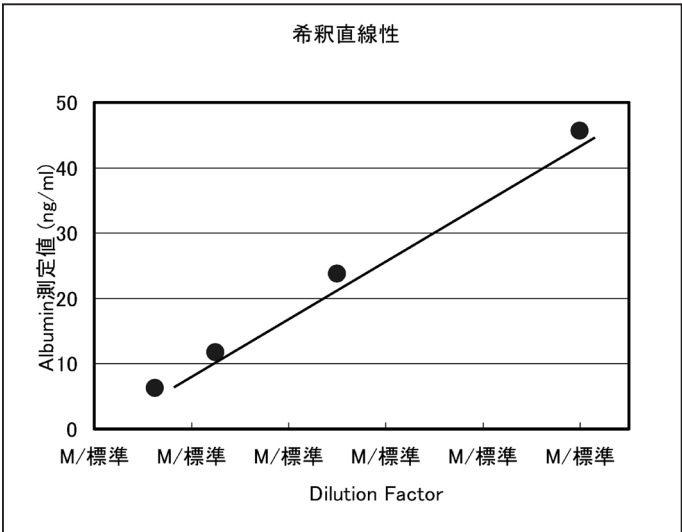
それぞれの点を結ぶと原点を通る直線が得られますか？

一次回帰式を求めると説得性のある直線となります。

例として当社で実施した結果のグラフを示しておきます。

(注：それぞれの測定値は必ずしもキットに附属している測定検体とは同じではありません)。それぞれの希釈検体平均値に希釈度を掛け、オリジナル検体の濃度を求めて下さい。バラツキの範囲内でどれも同じような値が得られますか？これも希釈直線性の証明の方法です。

(\* Dilution Factor : 倍々希釈なので、1, 0.5, 0.25, 0.125)



反省事項

- ・測定はうまく行きましたか？
- ・検量線は上手く描けましたか？
- ・バラツキ (測定精度) はどうでしょうか？
- ・希釈直線性は得られましたか (計算上も、グラフの上でも) ？
- ・もし何組かで同時に実習されたのならお互いの測定値や測定精度を比較してみましょう。

註) この実習キットでは標準液及び検体の量は 100 μL ですが、実際のキットではサンプル量が 5 μL ~ 10 μL の場合が多く、その場合は微量のピペッティングに対応できるピペット、たとえば Eppendorf の 4910 (0.5 μL ~ 10 μL が量り採れるモデル) を使用することで測定精度が改善されます。

7. キットの保存と使用期限

キットは 2℃ ~ 10℃ で保存して下さい (凍結厳禁)。使用期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。開封した各試薬につきましては、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

【製品名】	レビス <sup>TM</sup> ELISA トレーニングキット
【和光コード】	290-86401
【英語表記】	LBIS <sup>TM</sup> ELISA Training Kit
【貯法】	2 ~ 10℃ 保存
【使用期限】	ラベルに記載
【包装】	96 回用

## 参 考

EXCEL でデモ用検量線を描く方法：EXCEL2007 の場合

	A	B	C	D	E
1	Std (ng/mL)	Abs.450 (-620) nm		Mean	△ Blank
2	50	2.179	2.275	2.227	2.192
3	25	1.207	1.208	1.208	1.172
4	12.5	0.614	0.616	0.615	0.580
5	6.25	0.318	0.323	0.321	0.285
6	3.13	0.166	0.170	0.168	0.133
7	1.56	0.100	0.107	0.104	0.068
8	0.78	0.071	0.072	0.072	0.036
9	Blank	0.035	0.036	0.036	—

- 1) 先ずデータを表にする。
- 2) データ範囲 (A2-A8 と E2-E8) を指定し、「挿入タブ」をクリック。「散布図」をクリック。
- 3) 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。
- 4) 横軸には濃度、例えば「Albumin concentration, ng/mL」を書き入れる。縦軸には吸光度「Abs.450-620nm △ Blank」と書き入れる。
- 5) 「レイアウト」タブの近似曲線をクリック。「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。

## EXCEL で測定値を計算する方法

EXCEL では X から Y を求めることは出来ませんが、Y から X を求めることはゴールシーク法を用いなければ困難です。そこで EXCEL で検体の測定値を計算するには、デモ用の検量線とは別に、X 軸と Y 軸を入れ替えた計算用検量線を描きます。例に沿って説明します。

この表は検量線を描くためのデータの例です。前の検量線のところで説明したように、濃度と吸光度を対数にしたほうが標準点の間隔が平等になり、曲線の形もなだらかで標準点にフィットしやすいです。そこでここでも対数にして曲線を描きます。下表のように一つの標準品濃度に対して2重測定した吸光度とその平均値、Blank の吸光度との差（以下△ Blank と記します）を EXCEL に書き込みます。次にこの表の右に2列 (F, G) を加え、標準品濃度と△ Blank の自然対数を書き込みます。自然対数を求める EXCEL 関数は、「=LN (セル No.)」です。10 を底にした常用対数よりも自然対数のほうが後で行う再変換で便利です。

具体的には、まず F2 に半角で =LN (A2) と書き込んで Enter キーを押します。F2 が A2 の自然対数に変わります。更に F2 セルをポイントしてアクティブ・セルとし、セルを囲む枠の右下の小さな四角（フィル・ハンドル）をポイントして F8 までドラックすると、F3 から F8 に対数が表示されます。次に G2 に =LN (E2) を書き込んで変換し、同様にドラッグして全ての△ Blank の対数を計算します。

結果は以下のようになります。

	A	B	C	D	E	F	G
1	Std (ng/mL)	Abs.450 (-620) nm		Mean.	△ Blank	LN (conc)	LN (△ Blank)
2	50	2.179	2.275	2.227	2.192	3.912023	0.784586
3	25	1.207	1.208	1.208	1.172	3.218876	0.158712
4	12.5	0.614	0.616	0.615	0.580	2.525729	-0.54559
5	6.25	0.318	0.323	0.321	0.285	1.832581	-1.25527
6	3.13	0.166	0.170	0.168	0.133	1.141033	-2.02117
7	1.56	0.100	0.107	0.104	0.068	0.444686	-2.68825
8	0.78	0.071	0.072	0.072	0.036	-0.24846	-3.32424
9	0	0.035	0.036	0.036	—		

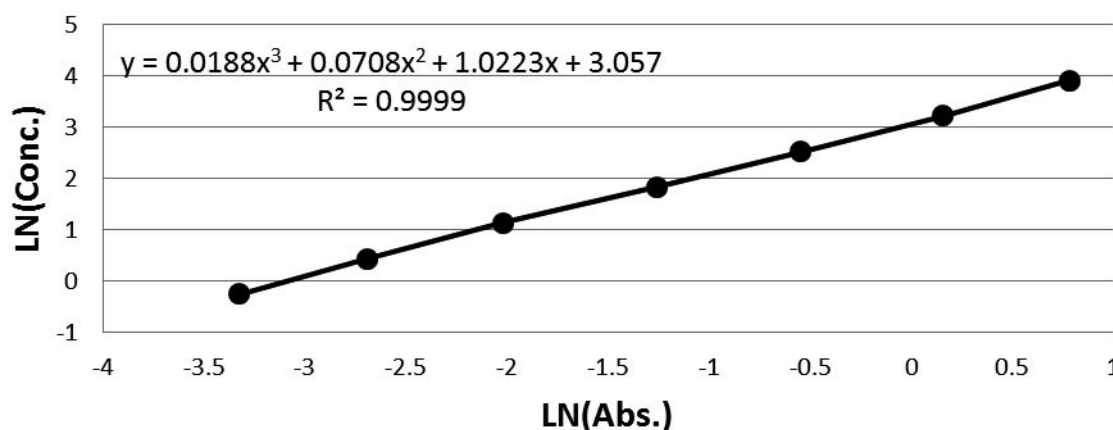
この表から検量線を描きます。通常は標準品濃度を X 軸にとり、吸光度、として Blank の吸光度を差し引いた△ Blank を Y 軸にとるのですが、検体計算のための方程式を得ることが目的なので X と Y を逆にして描きます。

## 逆グラフと近似方程式を求める方法

1. 上で作成したグラフの外枠のところをクリックしグラフ全体を指定します。
2. 「デザイン」タブをクリックし、「データの選択」を選び、X 軸に指定する値と Y 軸に指定する値を逆にします。
3. つまり、X 軸の指定場所には (G2-G8) を、Y 軸の指定場所には (F2-F8) を指定します。
4. 「レイアウト」タブをクリックし、近似曲線と回帰式を前述した方法と同じようにして追加します。



## 検量線(X軸とY軸入れ替え), 対数変換



### フィットネス・テストをする

これで LN-LN プロットの 3 次多項式近似方程式が得られました。この式を使って X 即ち LN (△ Blank) から Y、即ち濃度の対数、LN (conc.) を求め、最後に LN (conc.) を逆対数変換すれば濃度が得られます。これを、検量線データを使って実行してみましょう。つまり得られた近似方程式で標準品データの △ Blank から標準品濃度を計算し、それがどの程度実際の標準品濃度と一致しているかを検討してみるのです。これをフィットネス・テストと呼ばせて頂きます。標準品を検体の測定値と見立てて計算するわけです。

今までの表の右隣に更に H、I の 2 列を用意します。H 列は Cal.LN (conc.)、つまり計算された濃度の対数、I 列は Cal.conc. 計算された濃度です。

H2 に「= 近似方程式」を書き込みます。しかし、グラフをいちいち見ながら係数を書き込むのは大変なので、便法としてグラフの方程式をコピーします。グラフの方程式のうち  $=0.0188x^3+0.0708x^2+1.0223x+3.057$  をコピーして H2 に貼り付けます。同じ式がウィンドウの上にある数式バーにも表示されます。実はこのままでは計算できません。ECXEL 用の数式に書き換える必要があります。書き換えは数式バーで行います。数式バーでは  $=0.0188 \times 3+0.0708 \times 2+1.0223 \times +3.057$  のようになっていて、べき乗の数字は都合よく普通の数字に変わっています。どう書き換えるかということ、x を消してその代わりに \*G2^ と半角文字で書けばよいのです。「掛ける」は「\*」、「べき乗」は「^」なのです。変数としては G2 の数値を使わせる訳です。即ち、 $=0.0188 * G2^3+0.0708 * G2^2+1.0223 * G2+3.057$  と、修正したら、Enter キーを押します。H2 に計算値が書き込まれます。この後は前にやった通りに H2 をもう一度ポイントしてアクティブ・セルとし、その右下のフィル・ハンドルを H8 までドラッグすれば、全ての計算値が書き込まれます。

最後に対数濃度を濃度に変換します。I2 をポイントして  $=EXP (H2)$  と書き入れ、Enter キーを押し、もう一度 I2 をポイントしてフィル・ハンドルをドラッグすれば、完了です。

こうして得られた I 列の Cal.conc. の結果を A 列の標準品濃度と比べてみて下さい。

良好なフィットネスが得られていることと思います。

フィットネスの判定には真度を用いることが多いのです。真度 (trueness) とは下の表で  $I/A \times 100$ 、つまり標準品の名目濃度に対する回帰曲線からの計算濃度のパーセンテージを求めてそれが 100% に近いことを確認するわけです。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Std (ng/mL)	Abs. 450 (-620) nm		平均値	△ Blank	LN (conc.)	LN (Abs)	Cal. LN (conc.)	Cal.conc.
2	50	2.179	2.275	2.227	2.192	3.912023	0.784586	3.911745	49.99
3	25	1.207	1.208	1.208	1.172	3.218876	0.158712	3.22111	25.06
4	12.5	0.614	0.616	0.615	0.580	2.525729	-0.54559	2.517265	12.39
5	6.25	0.318	0.323	0.321	0.285	1.832581	-1.25527	1.848116	6.35
6	3.13	0.166	0.170	0.168	0.133	1.141033	-2.02117	1.124756	3.08
7	1.56	0.100	0.107	0.104	0.068	0.444686	-2.68825	0.455224	1.58
8	0.78	0.071	0.072	0.072	0.036	-0.24846	-3.32424	-0.2496	0.78
9	0	0.035	0.036	0.036	-				

ここでは話を分かり易くするために省略したのですが、本来は 2 重測定ですので、それぞれのウェルについて測定値を計算し、各標準点でのバラツキ、つまり標準偏差と変動係数 (標準偏差 / 平均値 × 100) を求められるようにしたほうが良いのです (検体の測定値計算参照)。

## 検体の測定値計算

測定検体の計算は下のような表を作ることで行うことができます。これは2重測定の例で、1、2はそれぞれウェル1、ウェル2のデータに対応しています。検量線のフィットネス・テストで行った手順と同じです。それぞれのウェルで測定値を求め、最後に平均値を求めています。こうしないと標準偏差（SD）や変動係数（CV）が計算できません。

この表のような順序で列を作って置くと、計算が楽です。フィル・ハンドルのポイント&ドラッグで2重測定でも3重測定でも、一回の数式書き込みで済んでしまいます。

No.	ウェル 1	ウェル 2	Ln (ウェル 1)	LN (ウェル 2)	LN (conc1)	LN (conc2)	Conc.1	Conc.2	Mean	SD	CV
1	0.256	0.265	-1.36258	-1.328	1.747925	1.780193	5.74	5.93	5.84	0.133	2.3
2	0.422	0.431	-0.86275	-0.842	2.215637	2.235528	9.17	9.35	9.26	0.130	1.4
3	0.854	0.862	-0.15782	-0.149	2.897346	2.906688	18.13	18.30	18.21	0.120	0.7
4	1.654	1.671	0.503197	0.513	3.59174	3.603079	36.30	36.71	36.50	0.293	0.8

## 『EXCEL で検量線を作成する際の注意事項のご案内』

EXCEL では Y の値より X を求めることがゴールシーク法を用いないとできませんので Y 軸に吸光度（誤差を含む）、X 軸に濃度をとった回帰曲線のままでは計算することができません。そこで苦肉の策として X 軸と Y 軸を逆にしたグラフを作成し濃度を求める方法をご紹介します。X 軸と Y 軸を入れ替えていますので下記の点にご注意下さい。

- 回帰曲線の計算に当たって各標準点における個々のウェルの吸光度のバラツキや求められた曲線からの距離に基づく「重み付け」はされておりません。なお、3次回帰曲線なので、標準点が4点の場合には  $R^2$  は 1.0 になってしまいます。従って標準点が4点以下の場合には真度の評価はできません。標準点は6点以上が望ましいです。
- 標準点の数が4になってしまうと全ての標準点は回帰曲線の上に乗ってしまいます。このような場合は曲線を良く眺めて納得のいくようなものになっているかどうか調べて下さい。曲線の形が異常なら使用しないで下さい。

## Assay validation について

或る測定法を確立する際、その測定法で目的の物質が正しく測定できるか否かを検討しなければなりません。そのためにさまざまな試験を行う、これを Validity test といいます。測定しようとする物質だけを、検体中の重さあるいは濃度として高い信頼性で決定できることが保証されなければならないのです。

近年、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、それは今まで慣例的に行われてきたものとはかなり違った定義になっています。以下に旧来のものと併記しておきましょう。

**性能の評価法（Validity test）として通常検討される項目は、**

### ・測定感度（Sensitivity）

旧来は、Blank よりも反応が有意に高いと言うことが証明される濃度。よく用いられるのは、Blank の反応平均値よりも 2SD 高い反応値を示す標準品濃度を測定感度としておりました。

ICH の検出限界の合意は、測定感度という言葉を使わず、検出限界（detection limit, DL）と呼び、その定義としては

$$DL = 3.3 s/a$$

s : blank 検体の吸光度の 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。具体的には Blank の反応平均値よりも 3.3 SD 高い反応値を示す標準品濃度を検出限界とするわけです。

ICH では測定感度に関連するもうひとつのパラメータ、定量限界（quantitation limit, QL）を定義しております。

$$QL = 10 s/a$$

即ち DL が検出可能な最低濃度を定義しているのに対して、満足すべき信頼性で定量可能な最低濃度を定義しているのです。

### ・測定精度（Precision）Intra-assay variation（Within assay variation）

同一アッセイにおいてひとつの検体をいくつかのウェルで測定して得た測定値の標準偏差が平均値の何パーセントにあたるか（変動係数、Coefficient of variation）で表現します。5% 以下の数値が欲しいところです。

ICH の合意では、精度（precision）に含まれるもののひとつとして

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）と定義されています。

### ・再現性（Reproducibility）Inter-assay variation（Between assay variation）

ひとつの検体を何回かのアッセイ（例えば毎日1回で4日間）で測定して、その平均値と標準偏差を計算し、同じく変動係数で表現します。一回のアッセイでいくつかのウェルを使いその平均値をそのアッセイの測定値とすれば、測定精度がキャンセルされるので再現性は良好になります。測定系の安定性が検討できます。

ICH の合意では、精度（precision）に含まれるもののひとつとして、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と定義されています。ICH の合意では Reproducibility という、室間再現精度（Reproducibility）：異なった施設間で測定する場合の精度ということになり、全く異なる意味になります。要注意です。従って reproducibility という言葉を使わず、Inter-assay variation（Between assay variation）として記述するほうが良いでしょう。

- ・ 特異性 (Specificity)

アッセイ系の特異性は使用する抗体の特異性と関連します。通常は物質特異性を検討します。つまりある物質を測定する系で、その物質と似た構造を持つ物質で測り込んで困る物質を候補として選び、いくつかの濃度範囲で測定してみて、どの程度の測定値が出るかを検討します。厳密な物質特異性が歓迎されます。

一方、種特異性ということもあります。これは、ある動物種のある物質を測定する系で、他の動物種の同じ物質が測れるかどうかと言う問題です。タンパク質などは種が違えば通常アミノ酸配列が異なるので、イムノアッセイでは種特異性も厳密なものとなる傾向があります。つまり測定系がひとつの動物種にしか通用しないことなのです。

これは良いことでもあり、都合の悪いことでもあります。動物種ごとに抗体を作り直して測定系を組み上げねばならないからです。

- ・ 正確度 (Accuracy)

ICH での合意では真度 (accuracy, trueness) と呼ばれています。(検量線の検討でも真度という表現が使われていますが混同しないよう注意して下さい。)

測定対象物質の量が正確に測定できるかという正確度(真度)の検討は、希釈直線性 (Dilution test)、添加回収試験 (Recovery test)、他の測定系との比較 (Correlation) などで裏付けます。

- ・ 希釈直線性 (Dilution test)

検体をいろいろに希釈して測定しても、測定値に希釈倍率を掛ければいつも同じ数値となると言うことは重要です。例えば、血清などを希釈していけば、血清に存在している妨害物質も希釈されます。希釈直線性が得られると言うことは血清や試料中の妨害物質の影響を受けないと言うことの証明になるからです。

- ・ 添加回収試験 (Recovery test)

検体に既知の量の標準品を加えて測定し、加えただけの値が上乘せされていれば、測定対象物は正確に測定されていると考えても良いのではないか、というのがこの添加回収試験の眼目です。具体的には、測定対象物質をすでに含んでいる検体、例えば血清をいくつかに分け、それぞれに様々な量の標準品を加えて測定します。得られたそれぞれの測定値から血清のみの場合の測定値を差し引き、その値と加えた標準品の量を比較し、加えた量の何パーセントが測定値の差として得られたか(回収率といいます)を検討します。測定のバラツキの範囲内(例えば測定精度の範囲内)で 100% と考えることが出来れば成功です。

- ・ 他の測定系との比較 (Correlation)

同一検体を他の測定系での測定値と比べてみることは、比較相手の測定系が信頼性の高いものであるならば有意義なことです。方法は測定対象物質をなるべく広い範囲で含む検体を多く集めます。それを比較すべき測定系と自分の測定系とで測定し、得られた値を分析します。分析の方法は、同一検体について通常の方眼紙の X 軸に自分の測定系での測定値、Y 軸に比較したい測定系での測定値をプロットします。相関係数を求めるプログラムで相関係数を求めます。一次回帰直線の方程式を求めます。結果の判定としては、相関係数が 1 に近いこと、一次回帰式  $Y = AX + B$  において、B がゼロに近く、A が 1 に近いことです。

(若林 克己 記)

製造発売元

**富士フイルム 和光純薬株式会社**

大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号

Tel : 06-6203-3741