

# ELISA法による抗体測定に用いるマイクロプレートの種類の比較検討

内村眞佐子<sup>1)</sup>, 矢崎 広久<sup>1)</sup>, 北山 秋雄<sup>2)</sup>, 堀内 善信<sup>3)</sup>

## Comparative Examination of Microplate Types Appropriate for Serum Antibody Titration by ELISA Method

Msako UCHIMURA, Hirohisa YAZAKI, Yoshinobu HORIUCHI  
and Akio KITAYAMA

### I はじめに

Engvalら<sup>1)</sup>によって1972年に報告されたELISA法は、抗原抗体反応と酵素基質反応を組み合わせる検体中に含まれる被検物質を測定する方法で、被検物質濃度は吸光度値として得られる。この方法は迅速かつ簡便で感度の高い測定法として、感染症を含む広い分野で応用されている<sup>2,3)</sup>。

ELISA法における操作の第一段階は、抗原あるいは抗体による固相化であり、その担体にはマイクロプレートあるいはガラスビーズが用いられている。マイクロプレートを用いた方法は、一度にたくさんの検体が処理できることから、各種感染症診断のための抗原や抗体検出用市販キットに多く用いられている。

ELISA用マイクロプレートは各社から数多く市販されているが、本稿では平底マイクロプレートとU底マイクロプレートを用いて血中抗体価の平行線定量<sup>4)</sup>を行い、O.D.値のウェル間のばらつき、用量反応線の直線性等について検討を行ったので報告する。

### II 材料及び方法

#### 1. マイクロプレート

U底型イミュロン1, (以下IM-Uと略) 平底型イミュロン1 (以下IM-Fと略), U底型イミュロンサブストレート (以下SUB-Uと略), 平底型イミュロンサブストレート (以下SUB-Fと略) (ダイナテック社) を用いた。

#### 2. ELISA法

マイクロプレートの各ウェルに、精製百日咳毒素希釈液 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を100  $\mu\text{l}$  ずつ分注し、4°Cで一夜感作した。抗原希釈液には炭酸ナトリウム緩衝液 (0.156%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.293%  $\text{NaHCO}_3$ ) を用いた。血清希釈およびマイクロプレートの洗浄には0.05% Tween20加里ン酸緩衝生理食塩液 (0.8%  $\text{NaCl}$ , 0.02%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.29%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.02%  $\text{KCl}$ , 0.05% Tween20) を用いた。プレートの洗浄は各行程ごとに3回ずつ行った。標準血清及び被検血清は50  $\mu\text{l}$  / ウェル, 標識抗体 (アルカリフォスファターゼ結合抗ヒトIgGヤギIgG5,000倍希釈液) (タゴ社) は100  $\mu\text{l}$  / ウェルで30分間反応させた。基質は、p-ニトロフェニルリン酸2ナトリウムを基質溶解用緩衝液 (9.7% Diethanolamine, 0.01%  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , pH9.8) で1  $\text{mg}/\text{ml}$  に調整し、200  $\mu\text{l}$  / ウェル分注し室温で40分間反応後、オートリーダーMR580 (ダイナテック社) でO.D.値を測定した。反応はすべて室温で行った。

#### 3. 血清

標準血清はWST 1, 被検血清は健康小児血清<sup>4)</sup>を使用した。

#### 4. 被検血清の測定及び相対力価の算出

標準血清および被検血清を2倍階段希釈し、それぞれの希釈について4ウェルを用い、各ウェルに50  $\mu\text{l}$  ずつ分注しELISA法を行った。得られたO.D.値からの被検血清の相対力価の算出は、平行線定量法に基づいて行った<sup>5,6)</sup>。平行線定量法は、測定値の検定および相対力価の算出を行うELISA解析システム: CDPS (Computerized Data-Processing System)<sup>7)</sup>を用いてパーソナルコンピューター (PC-9801VX, 日本電気(株)) により行った。平均値の差の検定は、分散分析法 (危険率0.05%) で行った。

1) 千葉県衛生研究所

2) " 現国立公衆衛生院

3) 千葉県血清研究所, 現千葉県食品衛生検査所  
(1989年9月30日受理)

III 結果

1. 同一血清の繰り返し測定における測定値のばらつき  
 一枚のIM-Fマイクロプレートのブランクを除く95  
 ウェルすべてに、自家用標準血清WST 1の100倍希釈液  
 を反応させてELISA法を行ったところ、得られたO.D.  
 値は0.482から1.079の間でばらつきが認められた。O.D.  
 値をlog変換した後のO.D.値の出現度数分布は、平均値  
 0.73, 不偏分散 $3.1 \times 10^{-3}$ の正規分布図を示した(図1)。

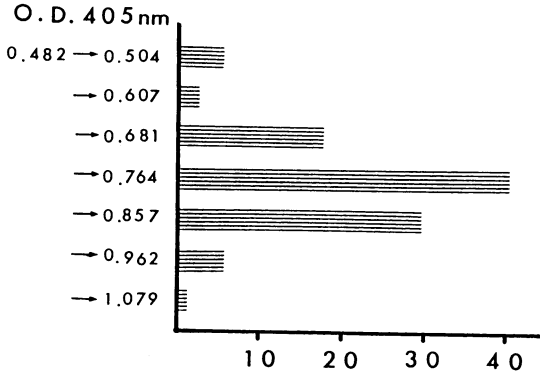


図1 同一検体のO.D.値のばらつき

同様に、SUB-F, SUB-U, IM-Uマイクロプレート  
 を用いてそれぞれ2回ずつO.D.値を測定した。95ウ  
 エルのO.D.値の不偏分散を表1に示す。基質量200およ

び $250 \mu\text{l}$ で測定を行ったが、いずれの場合も不偏分散  
 は $10^{-3}$ のオーダーで得られ、用いたマイクロプレートの  
 種類および加えた基質量による差は認められなかった。

表1 各プレートにおけるウェル間のばらつき

プレート	基質量( $\mu\text{l}$ )	O.D.値平均	不偏分散
IM-F	200	0.727	$3.1 \times 10^{-3}$
	200	0.741	$2.9 \times 10^{-3}$
IM-F	250	0.724	$2.8 \times 10^{-3}$
	250	0.584	$7.4 \times 10^{-3}$
IM-U	200	0.789	$2.7 \times 10^{-3}$
	200	0.786	$1.8 \times 10^{-3}$
SUB-F	200	0.610	$2.2 \times 10^{-3}$
	200	0.607	$4.6 \times 10^{-3}$
SUB-U	200	0.948	$1.3 \times 10^{-3}$
	200	0.865	$3.4 \times 10^{-3}$

2. 平行線定量法による相対力価

各プレートにWST 1は100~3,200倍、および被検血  
 清S 1, S 2は12.5~800倍の各希釈段階のそれぞれに  
 つき4ウェルずつを割り付けて測定を行った。各プレ  
 ートより得られた標準血清及び被検血清の各用量にお  
 けるO.D.値及び用量反応線を図2に示す。いずれも実線  
 で示した領域で直線性及び標準血清に対する平行性が認め  
 られた。

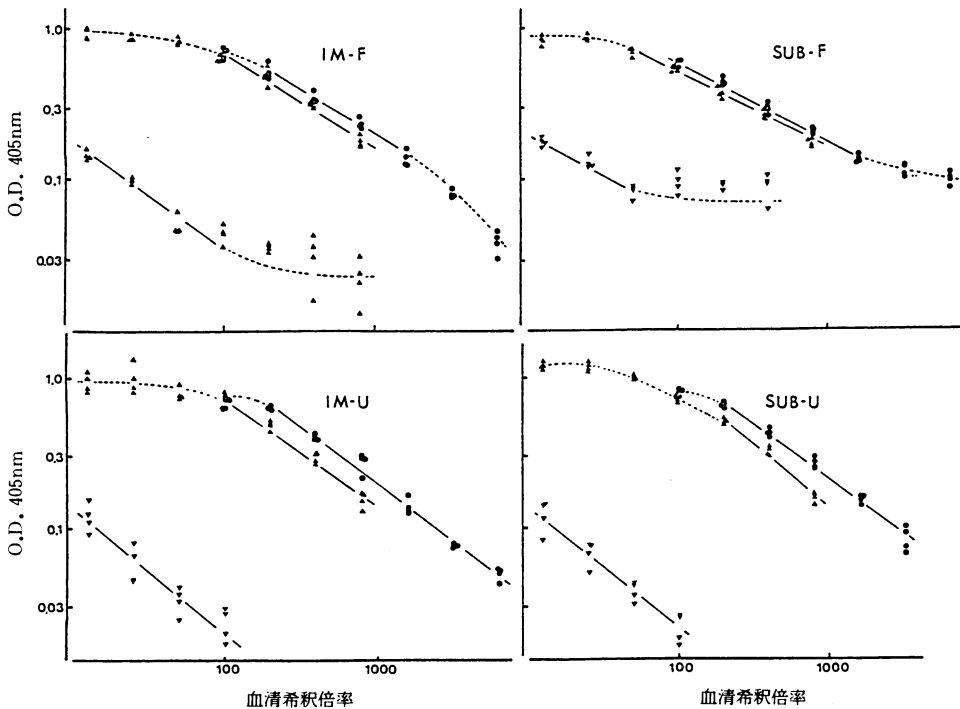


図2 被検血清の用量反応線

用量反応線は、直線部分を立に挟んだシグモイド形を示した。直線部分の長さ及びそのO.D.値の範囲は、用いたマイクロプレートにより異なり、IM-Uでは0.02~0.7で最も長く、SUB-Uで0.02~0.6、IM-Fで0.03~0.7、SUB-Fで0.09~0.6であった。血清の各希釈用量におけるO.D.値のばらつきについてみると、Uプレートでは4ウエルのO.D.値の平均が0.1以下となる場合に不偏分散が大きくなる傾向が認められた。

被検血清S1およびS2の標準血清に対する相対力価を表2に示す。SUB-FマイクロプレートでのS1の相対力価の平均値は、SUB-UおよびIM-Uプレートでの測定に比べて高い値を示し、有意な差が認められた。一方S2においては、Uプレートを用いて行った繰り返し測定の間ばらつきが認められたが、相対力価の平均値に差は認められなかった。

表2 各種プレートで測定した相対力価

プレート	相対力価	
	S 1	S 2
IM-F	0.77	0.0085
	0.65	0.0070
IM-U	0.59	0.0057
	0.64	0.0094
SUB-F	0.82	0.012
	0.86	0.014
SUB-U	0.63	0.0055
	0.56	0.0080

### 3. O.D.値の大きさとばらつきの関係

標識抗体に基質を加え酵素基質反応後、3N NaOH液を添加し反応を停止させた溶液を出発材料として、基質希釈用緩衝液を用いて階段希釈を行った。それぞれを抗原未感作のマイクロプレートの4ウエルに200 $\mu$ lまたは250 $\mu$ lずつ分注し、O.D.値の測定を行った。イミュロン1プレートを用いて行った結果を図3に示す。F及びUプレートにおいて、用量反応線は傾き0.95~1.0の直線を描いた。しかしFプレートにおいてはO.D.値が0.03以下で、Uプレートにおいては0.05以下で用量反応線の傾きが小さくなる傾向がみられた。ウエル間の測定値のばらつきは、O.D.値が低いところで大きくなり、FプレートにおいてはO.D.0.03以下で、UプレートにおいてはO.D.0.1以下で大きくなった。サブストレープレートを用いて行った結果も同様であった。

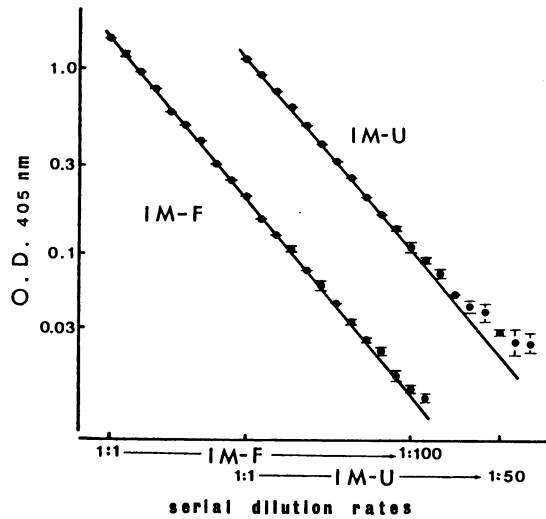


図3 オートリーダーMR580によるOD値の測定とウエル間のばらつき

## IV 考察

マイクロプレートを用いて行うELISA法では、96個のウエルのそれぞれの中で抗原抗体反応及び酵素基質反応を行い、各ウエルがその後の吸光度測定においてセルの役割を持つ。測定を正確に行うための条件の一つとして、各ウエルのセルとしての品質に偏りが少ないことが挙げられる。吸光分析法において、ランバート・ベールの法則により“O.D.値は溶液の濃度に比例する”ことが知られている。一方、マイクロプレートを用いてELISA法で血中抗体価を定量する場合にもランバート・ベールの法則は成り立つが、同一試料の測定値間には一定のばらつきが生じることから、抗体価の算出は血清の希釈倍率及びO.D.値をlog変換後、平行線定量法に当てはめて行う<sup>8)</sup>。従ってマイクロプレートは、ウエル間のばらつきが少なく、幅広い範囲で用量反応線の直線が得られ、繰り返し測定で再現性のよい抗体価が得られるものが望ましい。

今回検討を行った4種類のマイクロプレートの中で、これらの条件をすべて満足するプレートは見あたらなかった。Uプレートの利点として用量反応線の直線性が広い範囲で得られることが挙げられるが、ウエル間のばらつきがO.D.0.1以下の範囲で大きくなるという欠点も持っている。抗体価の低い血清S2の測定において、Uプレートを用いた場合測定回毎の値に差が認められたことは、ウエル間のばらつきが大きいことに原因があると考えられる。オートリーダー上でのマイクロプレートの自動送りには各行毎にわずかなずれがあり、光軸が常にウエル

内の一定点を通過しないことが考えられる。このことは、Fプレートは底が平らであるので影響はないが、Uプレートではウェル毎に光が通過する液の長さが異なる結果となり、O.D.値のばらつきの原因となり得る。総合的に見ると、4種のマイクロプレートの中では、平底イミュロンプレートが平行線定量に適したプレートであろう。

抗原抗体反応を行わない酵素基質反応生成物の用量反応線（検量線）では、Fプレート、Uプレートいずれを用いた場合にも、O.D.値1.0~0.03の間で理論値とよく一致する約1.0の傾きを示した。被検血清の測定においては、Uプレートに比べFプレートで用量反応直線の傾きが大きい結果が得られたが、いずれも理論値である1.0よりは小さいものであった。その理由は明かではない。構造的にFプレートは底部が直角になっているため、抗原抗体反応、酵素基質反応各行程毎のウェルの洗浄操作の際に洗浄しにくい部分が残ってしまうことが考えられている。用量反応線の傾きの問題は、イミュロンプレートの抗原捕捉能を含め、今後さらにより多くのマイクロプレートについて検討されるべきであろう。

## V まとめ

ELISA法を用いた抗体定量に用いるマイクロプレートの検討を行った。IM-U、IM-F、SUB-U、SUB-Fマイクロプレートを用いて測定を行い、平行線定量法で抗体価を算出したところ、Uプレートでは、広い範囲で直線性が得られるが、ウェル間のばらつきが大きく、繰り返し測定の再現性に難点がみられた。

SUB-Fプレートは直線性の範囲が狭く、他のプレートに比べ相対力価が高く表わされた。

比較を行った4種類のプレートはすべて、望ましいプレートの条件を十分に備えていなかったが、その中ではIM-Fプレートの品質が比較的良好であった。

## 文献

- 1) Engval, E. and Perlmann, P. (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III Quantitation of specific antibody by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, 109, 129-155.
- 2) Young, C.R., Levine, M.M., Craig, J.P. and Robins-Broene, R. (1980): Microtiter enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin G Cholera antitoxin in humans: Method and correlativn with rabbit skin vascular permeability factor technique. *Infection and Immunity*, 27, 492-496.
- 3) 中村良子, 田沢節子, 沢田威男, 福田一郎, 奥村和夫, 青木良雄 (1982): マイクロELISA法によるリン菌感染症の迅速診断法について. *臨床と細菌*, 9, 323-328.
- 4) 内村真佐子, 北山秋雄, 堀内善信, 太田原美作雄 (1989): 平行線定量法 (Parallel line assay) を用いたELISA法 (酵素抗体法) による百日咳抗体測定. *臨床と微生物*, 16, 205-210.
- 5) 黒川正身, 高橋宏一, 石田説示: 定量的分析法, バイオアッセー (生物定量法) - その医学生物学的領域での適用. 85-149, 近代出版, 東京, 1978.
- 6) Finny, D.J.: *Stastical methods in biological assay*. 3rd ed., London, Charles Griffin & Company Ltd., 1978.
- 7) 北山秋雄, 内村真佐子, 市村 博, 太田原美作雄 (1988): パーソナルコンピューターを用いたELISA法の抗体価処理・解析システムの開発について. *千葉県衛研報告*, 12, 41-44.
- 8) Kitayama, A., Uchimura, M. and Horiuchi Y. Study on factors of variance derived from micro-ELISA. (投稿予定) *J. Biological Standardization*.