

### 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。

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

$\epsilon$  : 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  $\phi$  : 量子収量  $\epsilon$  : 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。