

間接 ELISA による抗原特異的抗体検出法の開発手法

広田次郎, 清水眞也*

(平成 25 年 8 月 6 日 受付)

Guide to develop indirect ELISA to detect antigen specific antibody

Jiro HIROTA & Shinya SHIMIZU *

序

ELISA に関する手技については多くの実用書に記載されているが、一例報告に類するものが多く、応用性のある具体的な ELISA の開発法に関する記載は少ない。そこで、具体例やモデルを示し、『間接 ELISA による抗原特異的抗体検出法』の私達の経験に基づいた開発手法を紹介する。

酵素抗体法と ELISA

酵素抗体法は、抗原抗体反応（免疫反応）と酵素反応による可視化の 2 つのプロセスからなり、抗原と抗体の特異的結合を、抗体等に直接的または間接的に結合させた酵素により呈色物または発光現象として観察あるいは測定する方法である。酵素抗体法では、抗体の特異的結合を利用しているため特異性の高い結果を得ることが可能であり、さらに、反応が酵素により増幅されるため高感度な測定法となる。酵素を標識した抗体を用いた酵素抗体法には、免疫組織染色、ウェスタンブロッティング、ELISA などの方法があり、家畜衛生の分野においては免

疫組織染色や血清診断において多用されている。酵素抗体法という言葉は、当初、病理学の分野で用いられたため、酵素抗体法は免疫組織化学（あるいは免疫組織染色）とほぼ同義で用いられることもある。

酵素反応物が不溶性の呈色物である場合、反応が可視化され、肉眼で観察可能となる。この反応を利用することにより、免疫組織化学では特定の抗原や抗体の存在部位を組織標本において同定することが可能となる。ウェスタンブロッティングでは、抗原を SDS-PAGE で展開後、ニトロセルロース膜などに転写し、膜上で抗原抗体反応を行い抗体が反応した物質の分子量等の情報を得ることが可能となる。一方、酵素の反応物が水溶性である場合、吸光度の強弱により反応の強さを計測可能となる。これが、ELISA である。なお、標識物質が蛍光物質である場合には、(免疫) 蛍光染色法あるいは (免疫) 蛍光測定法となり、呈色基質に代わり発光基質を用いたものが化学発光法である。

ELISA は、「Enzyme Linked Immunosorbent Assay」の略で、酵素抗体法の 1 種である。

ELISA の訳語として「酵素結合免疫吸着法」、「固相酵素免疫検定法」などがあるが、定訳はなく、「ELISA」、「エライザ」、「イライザ」、「エリサ」などと言われる。本稿では、ELISA として表記する。一般に ELISA は、①プラスチックプレートやプラスチック球などの表面に直接的あるいは間接的に固相化された抗原に抗体を反応させる、②結合した抗体に結合する酵素標識された物質を反応させる、③酵素反応により抗原抗体反応を基質の呈

農研機構 動物衛生研究所 動物疾病対策センター

文責：清水眞也

* Corresponding author; Shinya SHIMIZU,
Center for Animal Disease Control and Prevention, National
Institute of Animal Health, NARO, JAPAN
3-1-5, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, JAPAN
Tel: 029-838-7833
E-mail: shimizux@affrc.go.jp

色や発光として検出する。一般的には、呈色試薬が用いられる。反応は吸光度計やルミノメーターを用いて測定される。反応の強弱により、定量を行うことが可能である。抗原と結合した抗体の検出には、酵素標識した抗体（以下：二次抗体）が用いられることが多い。

ELISA は、高感度、簡易、定量的、迅速、安全、自動化可能、多数検体処理可能、安価、専用の施設が不要である等の利点を有する測定法である。Radioimmunoassay (RI) とは異なり、廃液処理に特段の問題は無い。さらに、ELISA を血清診断法として用いる場合、ゲル内沈降法などと比較して、測定に用いる抗原や血清・抗体の使用量を大幅に削減することが可能である。ELISA の実施に当たり、通常必要な機器は、ピペッター、プレート洗浄器（無くても可）とプレートリーダーである。

ELISA には、直接 ELISA (direct ELISA)、間接 ELISA (indirect ELISA)、サンドウィッチ ELISA/キャプチャー ELISA (sandwich ELISA/capture ELISA)、競合 ELISA/ブロッキング ELISA (competitive ELISA/blocking ELISA) 等の方法がある。このうち、血清診断法では、間接 ELISA による抗原特異的抗体の検出が一般的に用いられる。間接 ELISA とは、プレート上に固定された抗原に反応する抗体を、酵素標識された二次抗体を用いて検出する ELISA を言う (図 1)。間接 ELISA の利点は、ELISA の利点の他に、酵素標識された各種動物の二次抗体が多種類市販されており測定系を構築しやすい点や応用性が広い点がある。検出感度は、用いる抗体の特性や基質により異なるが、100 fg/ml から 1 ng/ml である。

間接 ELISA に用いる試薬・器具、手技 および操作について

実験室レベルや臨床において実用的である 96 ウェルフォーマットプレートの使用を前提として、記載する。

間接 ELISA を実施するには次の器具・試薬を準備する。

器具

プレート洗浄器（あると便利、洗浄瓶でも可能）

96 ウェル吸光度計

ピペッター

試薬等

ELISA プレート

抗原

抗原固定液

陽性血清

陰性血清

洗浄液

ブロッキング剤

酵素標識二次抗体

呈色液

停止液

プレート

プレートは、主としてポリスチレン（一部塩化ビニール）を原料とし、各社から様々な透明タイプのプレートが販売されている。抗原はプレートの表面に固相化・不動化され、洗浄操作等で流出しなくなる。固相化の機序は、(1) 静電相互作用、(2) 疎水的な相互作用、(3) 水素結合、(4) その他電荷移動、(5) 共有結合等により非特

間接ELISAの手順

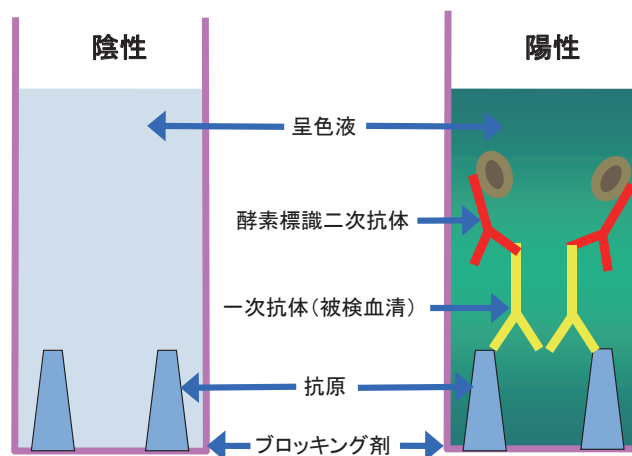
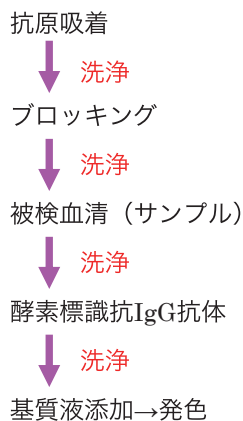


図 1. 間接 ELISA の手順 (左) と反応終了時の模式図 (右)

プレート表面に固定化された抗原に特異抗体が結合し、その抗体に酵素標識二次抗体が結合する。呈色液を加えると、陽性では酵素と呈色液が反応し、呈色する。

異的に固相化される。通常の ELISA で用いる抗原はほとんどが水溶性抗原であり、水分子の強い極性のため、固相との相互作用は疎水的相互作用が重要な役割を占めると考えられる。一般に、蛋白質を固相化させる場合に用いるバッファーは、アルカリ性のバッファーが良いとされる。これはプレートに用いられるポリスチレンのゼータ電位がアルカリ側の pH で正の電荷を持つため、電気的な作用により蛋白質の迅速な固相化が可能となるためである。ELISA プレートには抗原の結合（吸着）量により、標準（低）結合タイプから高結合タイプがある。各社の技術情報によると、結合 IgG 量で抗原固定能力を見ると、標準結合タイプで 300 ng/cm^2 で、高結合タイプでは、 $600 \sim 650 \text{ ng/cm}^2$ である。なお、96 平底ウェルでは、1 ウェルの $100 \mu\text{l}$ 当たりの抗原結合面積はおおよそ 0.95 cm^2 である。他に、NH 結合、COOH 結合、コバレント結合により抗原をプレートに固定する方法もある。プレートは、Nunc 社、住友ベークライト社、コーニング社等から発売されている。高結合タイプでは、非特異反応を抑制するためにブロッキングを確実に実施することが重要である。

抗原は、プレート表面に上記の機序により固定化されるため、抗原の立体構造に変化がみられることがある。立体構造を維持する手法としては、抗原特異的抗体を固相化して抗原を捕捉する方法 (sandwich ELISA/capture ELISA) や、NH 結合、COOH 結合による方法がある。

抗原や被検血清とプレートには相性があり、陰性対象であってもバックグラウンドが高くなることがある。このような場合、使用するプレートを別の種類（会社）のプレートにすると解決することがある。また、抗原によっては、高結合タイププレートではなく、低結合タイプのプレートを用いた方がよい場合もある。

研究室レベルでは、96 ウェルプレートを用いることが多い。近年、384 ウェルや 1536 ウェルの系も開発されているが、使用に当たり専用の器具を必要とする。

ウェルへの分注量

操作する際の間違いを防ぐため、各ステップで分注する容量は統一する方がよい。例えば、実験室レベルで 96 ウェルプレートを使用する場合、抗原、ブロッキング溶液、被検血清、二次抗体の各溶液ともすべて $100 \mu\text{l}$ /ウェルで統一して実施すると、取り扱いやすい。なお、96 ウェルを用いた場合、 $50 \mu\text{l}$ /ウェルの系を用いると、メニスカスの関係で、結果のばらつきが大きくなる傾向がある。

ピペッターで分注する際、最後の吹き出しは、行わない方がよい。吹き出すことにより、ウェルの横壁や別のウェルに試薬等が飛散し、誤差の原因となる。

反応温度

抗原抗体反応や酵素反応などは、温度により反応速度が異なってくる。室温下で ELISA を実施すると、高温時には反応が促進され、低温時には反応が遅延するため、冬と夏で数値が異なってくる。安定した結果を得るためには、 37°C の恒温器を用いるなどして、反応温度を一定に保つとよい。この際、プレートをビニール袋に包むなどして、プレートの乾燥を防ぐ。なお、炭酸ガス孵卵器を恒温槽として使うことは pH に影響することからあまり勧められていない。抗原のプレートへの固定やブロッキングは、 4°C 一夜で実施することも可能である。プレートをシールで覆う場合、シールを剥がす際にウェル内の液が飛び出すことがあるので注意が必要である。

反応時間

抗原抗体反応や酵素反応は、反応時間に比例して応答が異なってくる。そこで、反応時間は一定にすることが推奨される。また、反応時間を短くすると、試料の分注などで時間がかかった場合、分注の最初と最後で反応時間に差が出るため、同一の試料であっても、異なった吸光度になることがある。一般的には反応時間を 1 時間以上にすると、操作によるウェル毎の反応時間の誤差を小さくでき、安定した結果が得られる。

『プレート毎の偏差の補正』の項に示すように、プレート毎に標準血清を入れることにより、誤差を最小化でき、異なったプレート間のデータの比較が可能となる。

抗原

直接抗原をプレートに固定する場合、抗原にはある程度の分子量が必要であり、カビ毒などの低分子量の抗原ではプレートに固定できないことがある。さらに、抗原の純度は高い方がよい。筆者らの経験からは、直接プレートに固定化する場合には、50% 以上の純度の抗原であることが望ましい。固定する抗原濃度の目安としては、基質に 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) を用いた場合 $1 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ 、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) を用いた場合 $10 \sim 200 \text{ ng/ml}$ の濃度で固定する。 $1 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ の濃度の抗原液をプレートに結合させた場合、およそ 30%～40% が結合していると報告されている。抗原の精製度が低い場合

や精製困難な場合、抗原特異抗体を用いたサンドウィッチ ELISA により、粗抗原から特定の抗原をプレート上に固定可能である。抗原の適切な濃度は、二次抗体濃度との関連性を検討して決める(後述)。プレートに結合しない低分子抗原の場合、競合 ELISA や BSA などのキャリアー蛋白質と結合させた抗原を用いることで測定が可能である。

抗原の可溶化(界面活性剤による)

様々な種類の物質から構成されている病原体を抗原として用いる場合、界面活性剤で抗原を可溶化した後、ELISA に用いることが多い。抗原を可溶化する際には Triton X-100 (TX-100) や NP-40 などの界面活性剤が主として用いられる。界面活性剤の効用として、次の点が上げられる。

1. 抗原の力価が上がる: 抗原が可溶化され、分子数が増える
2. 安定した結果が得られる: 抗原分子の均質化
3. バックグラウンドが下がる

加える界面活性剤量の目安として、蛋白質濃度 20 mg/ml に対し TX-100 の濃度が 2.0% (2 mg/ml なら TX-100 は 0.2%) となるように加える。なお、抗原により至適濃度は異なるため、条件検討が必要である。界面活性剤添加後は、ピペッティング、ボルテックスや軽い超音波処理により、可溶化する。

しかし、抗原結合液に高濃度の界面活性剤が存在する場合には、抗原のプレートへの固定が阻害され、反応が低下する。我々の経験では、TX-100 を用いた場合、最終的な希釈抗原液に TX-100 が 0.01% 以上含まれる場合には、抗原のプレート (maxsorp, Nunc) への結合が阻害され始めた。TX-100 の最終濃度が 0.01% 以下であれば、抗原結合阻止反応は起こらなかったため、最終的な TX-100 濃度は 0.01% 以下となるよう調整する必要がある。TX-100 処理抗原の最適希釈において TX-100 が 0.01% 以上含まれている場合には、抗原結合が阻害されている可能性があるため、処理に用いる TX-100 の濃度を下げることにより、抗原の使用希釈倍率の上昇が期待される。

抗原固定液

通常、蛋白質を固相化させるには、アルカリ性のバッファ溶液に溶解させ、プレートへの結合を行う。一般的に 50 (~100) mM の炭酸 Buffer (pH 9.5 ~ 9.6) が用い

られることが多い。なお、サンドウィッチ ELISA を行う際、抗体によっては弱アルカリ溶液により抗原との結合能を失うものがあるとの報告もあるため、注意が必要である。このような場合には中性域で結合可能なプレートを用いるとよい。

洗浄液

0.02% 前後の Tween 20 を含む PBS (pH 7.2) を、プレートの洗浄に用いる。筆者らは市販の 10 倍 PBS (500 ml) に Tween 20 を 1 ml 入れておき、使用時に 10 倍希釈して用いている。

洗浄法

プレートウォッシャーで洗浄する。無い場合は、洗浄瓶やマルチチャンネルピペットを使用してもよい。洗浄回数は、通常、3 回以上行う。高感度系では、洗浄回数を 5 回以上行う。ウォッシュが終了した時点で、数枚重ねたペーパータオルにプレート底面側を持ち、プレート上面を強く叩きつけ、ウェルに残っているウォッシュ液を完全に取り去る。思い切り強く叩きつけても、プレートが割れるようなことはない。この操作は、バックグラウンドを下げるためには、重要な操作である。なお TMB 等の高感度な基質を用いる際には、非特異的な反応を低減するため、常に新しいペーパータオルを用いる必要がある。

ブロッキング剤

ブロッキングは抗原をプレート表面に固定後に、抗原が固定化されていない固相表面のオープンスペースを覆い、各ステップで作用させる蛋白質(抗体、二次抗体等)が固相表面に結合されるのを防ぐことで、非特異反応を抑制する目的で行われる。ブロッキングには、抗原と交叉性が無く、抗原抗体反応および酵素反応に無関係な蛋白質が用いられる。一般的にはスキムミルク(1~5%)、カゼイン(1~2%)、BSA(2%前後)等が用いられるほか、各社から様々なものが発売されている。ブロッキング剤の濃度が濃すぎる場合には、オーバーブロッキングになることもあるので、適切な濃度で実施する。また、牛抗体を検出する系において牛由来のブロッキング剤を使用する場合、牛のイムノグロブリンが含まれていないことを確認しておく必要がある。通常の高感度の BSA では、牛 IgG が含まれていることが多いため、BSA をブロッキングに用いた場合、抗牛二次抗体を用いると強い非特異反応が出ることがある。また、スキムミルクやカ

ゼインはビオチンを含むので、アビジン-ビオチン系を用いた検出系での使用は避ける必要がある。なお TMB を基質に用いる場合、ブロッキング液の量を 200 μ l 以上にすると非特異反応が出にくくなる。

希釈液（被検血清、二次抗体）

0.1～0.2% Tween 20 含有 PBS (pH 7.2) を用い、2% 程度の BSA, Block Ace 等を加えることで、より安定化する。なお、スキムミルクやカゼイン等はビオチンを含むので、アビジンの希釈にはこれらの使用は避ける。

TX-100, Tween 20, NP-40 などの界面活性剤は 2% 程度までなら抗原抗体反応を阻害しない。このため非特異反応がひどい場合には、より高濃度の界面活性剤を用いることにより、非特異反応の低下が期待される。また、希釈した二次抗体を保存する場合には、ペルオキシダーゼ標識抗体の防腐剤にはマーゾニン (0.01%) を用い、アルカリフォスファターゼ標識抗体の防腐剤には、アザイド (0.1%) を用いる。

被検血清の希釈

抗原特異的抗体を測定する場合は、被検血清の希釈倍率は 100 倍を用いることが多い。

ただし、感染抗体価が低い例では、被検血清の希釈倍率は 10～50 倍とする方がよいこともある。ただし、被検血清の希釈倍率が低い場合は、バックグラウンドが高くなる傾向がある。

二次抗体

各種動物の抗抗体に酵素標識されたものが数多く市販されている。通常標識酵素は、ペルオキシダーゼ (POD) あるいはアルカリフォスファターゼ (ALP) などが選択される。二次抗体の得にくい哺乳類の場合、酵素標識プロテイン A, 酵素標識プロテイン G, 酵素標識プロテイン AG を用いると、特異抗体 (IgG) を測定可能である。高濃度で二次抗体を使用すると、バックグラウンドが高くなり、また無駄も多いので、至適濃度での使用が望ましい。一般的に二次抗体は凍結厳禁であるが、二次抗体と等量のグリセリンを加え、 -20°C で保存することで、凍結することなく、安定的に保存が可能である。

新規の二次抗体を入手した場合に、どの程度の希釈倍率で用いるかは悩ましい点である。著者らは、次の手法で、おおよその至適濃度を求めている。なお、基質により至適濃度は大きく異なるので、注意が必要である。

簡易な新規二次抗体の至適濃度の求め方

PBS で二次抗体希釈系列を作る。

100 μ l 希釈抗体 + 100 μ l 呈色液を混合後、 37°C で 1 時間反応させ、吸光度を測定。

呈色液が ABTS の場合、反応停止後の吸光度で 1.0 前後の吸光度を示す濃度の 64 倍 (32～128 倍) 濃い濃度を使用濃度とする。

呈色液が TMB の場合、反応停止後の吸光度で 1.0 前後の吸光度を示す濃度の約 256 倍 (128～512 倍) 濃い濃度を使用濃度とする。

事例を図 2 に示している。検討した二次抗体では、吸光度が 1.0 となる希釈倍率は、ABTS で 64,000 倍、TMB で 8,192,000 倍であることから、ABTS で 1,000 倍前後、TMB で 32,000 倍程度が使用濃度となる。この方法の注意点は、酵素活性により二次抗体の希釈倍率を求めているため、実際の系で確認する必要がある点である。高感度基質である TMB を用いる場合は、二次抗体の希釈倍率が高くなるので、より注意が必要である。また、購入時添付のデータシートに記載されている ELISA での使用濃度は、TMB での使用濃度は記載されていないことが多い。

さらに図 2 において、ABTS では、吸光度は二次抗体の濃度に比例して上昇することが判る。一方、TMB では、高濃度の二次抗体において、吸光度の低下が生じている。これは、TMB を用いる場合、適切な濃度の二次抗体を用いる必要があることを示している。

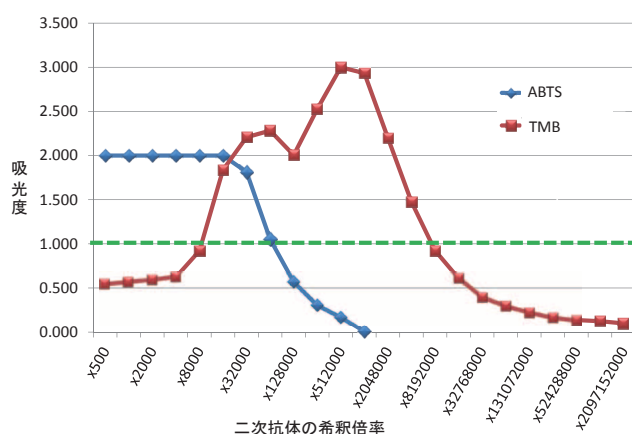


図 2. 簡易な POD 標識二次抗体の使用濃度

96 ウェルに 100 μ l の二次抗体の希釈系列を作り、100 μ l の呈色液を分注し、1 時間後吸光度を測定する。吸光度がおおよそ 1.0 となる希釈倍率を求め、ABTS の場合で、約 64 倍 (32～128 倍) 濃い濃度、TMB の場合で、約 256 倍 (128～512 倍) 濃い濃度で使用する。

二次抗体濃度と測定限界の関係

二次抗体の濃度は、検出感度に影響する。図3に示すように、マウス IgG を直接プレートに固定し、二次抗体 (POD 標識抗マウス IgG) でマウス IgG を検出した場合 (基質: ABTS), 高濃度の二次抗体では吸光度が大きくなり、感度が上昇していることが判る。図3から、吸光度計の測定信頼限界を吸光度 = 0.1 とすると、500 倍では 10 ng/ml, 2,000 倍では 75 ng/ml, 8,000 倍では 150 ng/ml が検出限界となる。ここから、より高濃度の二次抗体を用いることで、抗原を節約することが可能であることがわかる。しかし、高濃度の二次抗体を用いるとバックグラウンドが上昇する傾向があるので、注意が必要である。また、図3から明らかなように、各濃度の二次抗体の測定開始点はほぼ一点から始まっており、感度の上昇は、シグナルの増強に起因することを示している。

基質、停止液および測定波長

基質は、酵素により水溶性の色素を生ずるものが用いられる。酵素により用いる基質は異なっており、通常ペルオキシダーゼでは、ABTS, OPD, TMB などが用いられ、アルカリフォスファターゼでは p-nitrophenyl phosphate (pNPP) などが用いられる。酵素の種類と用いられる基質、停止液および測定波長を表1に示す。

基質による感度の違い

同一の条件であっても基質の違いにより、測定限界が異なってくる。一般的に ABTS < OPD < TMB で高感度となる。

プレートにマウスモノクローナル抗体 (IgG2a) を各濃度結合させ (1 ~ 2,000 ng/ml), POD 標識抗マウス IgG

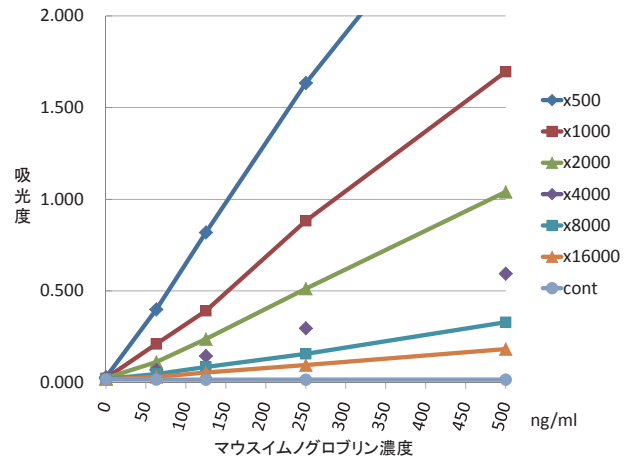


図3. 標識抗体濃度による測定限界の違い (基質: ABTS) マウス IgG を直接プレートに固定し, POD 標識抗マウス IgG でマウス IgG を検出した。POD 標識抗マウス IgG 濃度を高くすると吸光度が大きくなるのがわかる。吸光度計の測定信頼限界を 0.1 とすれば、500 倍では 10 ng/ml, 2,000 倍では 75 ng/ml, 8,000 倍では 150 ng/ml が検出限界となる。標識抗体濃度を上げるとバックグラウンドが上昇する傾向があるので、至適条件の決定には条件検討を行う必要がある。なお、上図からは、各濃度の POD 標識抗マウス IgG の測定開始点はほぼ一点から始まっており、単にシグナルが増強されたことにより、低濃度域が測定可能となったことを示している。

抗体 (Zymed) (2,000 倍) を反応させ、TMB 基質液あるいは ABTS 基質液を加えて、1 時間後の吸光度を測定した結果を図4左に示している。吸光度 = 0.1 を基準とする測定限界は、ABTS では 10 μ g/ml, TMB では 0.2 μ g/ml であった。この例では TMB を用いることにより、ABTS に比較して 50 倍程度高感度化が可能であり、抗原使用量を低減することが可能であることが判る。一方、TMB を用いた系で ABTS と同等の感度にするためには、POD 標識抗マウ

表1. 酵素の種類と用いられる基質、停止液および測定波長

	基質	停止液投入前測定波長	停止液投入後測定波長	停止液
POD	ABTS	405 nm	405 nm	1% SDS or 0.05% NaN ₃
	OPD	450 nm	492 nm	3 N HCl or 3 M H ₂ SO ₄
	5-AS	450 nm	550 nm	3 N NaOH
	o-Dianisidine	405 nm	405 nm	5 M HCl
	TMB	370 or 650 nm	450 nm (650 nm)	2 M H ₂ SO ₄ or 1% NaF
ALP	pNPP	405 nm	405 nm	3 N NaOH

ABTS : 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazole-6-sulfonate)

OPD : o-phenylenediamine dihydrochloride

5-AS : 5-aminosalicylic acid

o-Dianisidine : o-dianisidine dihydrochloride

TMB : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

pNPP : p-nitrophenyl phosphate

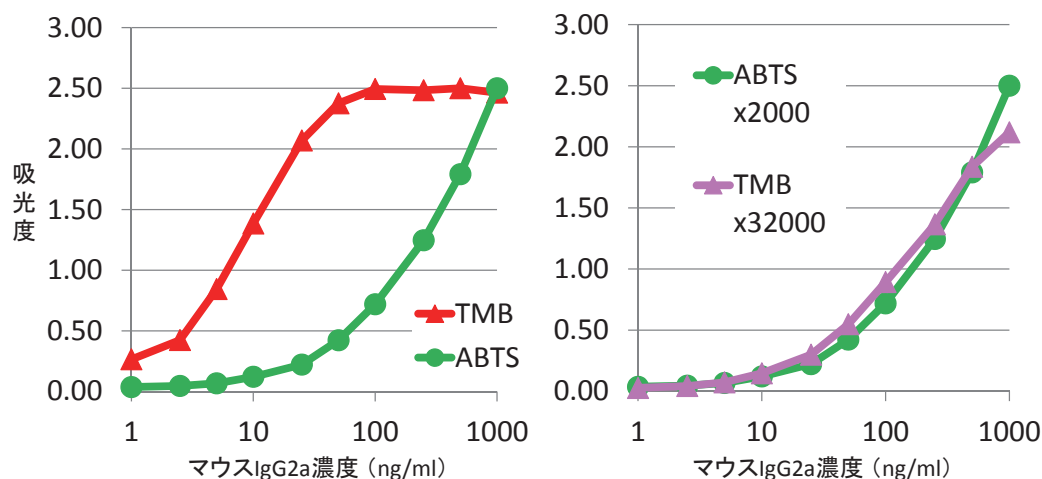


図4. 基質による感度の違い

精製マウスモノクローナル抗体 (IgG2a) をプレートに直接固相化し、POD 標識抗マウス IgG 抗体 (2,000 倍) で検出した。

左図：基質以外の条件を同等にした場合、ABTS での測定限界 (OD ≧ 0.1) は 10 μg/ml、TMB での測定限界は 0.2 μg/ml で、TMB は 50 倍以上高感度であった。

右図：TMB で ABTS と同等の感度にするには、POD 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体を ABTS では 2,000 倍で TMB では 32,000 倍で使用する (右図)。二次抗体の節約が可能である。

ス IgG 抗体を 32,000 倍で使用する必要がある (図 4 右)。

高感度の基質では、様々な要因により非特異反応が出やすい傾向があるので、至適な二次抗体希釈濃度での使用や適切なブロッキングを行う必要がある。また、モノクローナル抗体作製過程のハイブリドーマ選別過程において ELISA の基質に TMB を用いる場合、適切な条件下で実施しないとアフィニティーの低い株を選別したり、有望な株の検出に失敗する可能性がある。

測定装置

様々な測定装置が市販されている。実験室レベルでは、96 ウェルフォーマットが測定可能な測定装置が使いやすい。出力形式が表計算ソフトのエクセルと互換性があると、エクセルの統計ウィザードやグラフウィザードを使用することによりデータの処理が容易となる。近年、発光ダイオードを光源とした、従来よりも低価格かつ小型のプレートリーダーも開発されている。

吸光度の目安

一般的な分光光度計の吸光度は、1 ~ 1.5 の範囲で信頼できるため、アッセイはこの範囲で診断ができるよう設計する必要がある。吸光度計内部では光の反射や散乱、光学系の汚れや傷、劣化などによる光の反射や散乱などにより、迷光が生ずる。この迷光により、すべての光が吸収された場合であっても吸光度は完全にゼロにはなら

ない。光の透過率が下がれば下がるほどこの迷光による誤差が大きくなるため、正確な定量ができなくなるのである。吸光度と透過率の関係は、波長 λ における吸光度 A_λ は、入射光強度 I₀ と透過光強度 I の比 (透過率) の常用対数を取り、下記の式で表される。

$$A_{\lambda} = -\log_{10} (I/I_0)$$

吸光度計の最大吸光度は 2.0 以上のものもあるが、吸光度 = 2.0 以上では光の透過率 1% 以下を比較していることになり、濃度と吸光度の相関性がずれてくる。ちなみに、吸光度 = 1.0 は透過率 10%、吸光度 = 2.0 は透過率 1%、吸光度 = 3.0 は透過率 0.1%、吸光度 = 4.0 は透過率 0.01% である。近年の分析機器は、吸光度の範囲が相当外れても自動補正して測定値を表示する。しかし、定量的に吸光度を扱おうとするなら、有効範囲を考慮に入れる必要がある。

これらを踏まえ、抗体価と吸光度に相関性を持たせるには、ELISA による特異抗体検出法を開発する際の目安として、標準陽性血清で吸光度が 1.0 (高度免疫血清で 1.5 ~ 2.0) 前後になるよう抗原濃度、二次抗体濃度などの試薬の濃度を調整する。このように調整することで、抗体価と吸光度に正の相関関係がみられ、さらに、検体の分布が陰性と陽性の 2 群に分かれる傾向が出てくる (図 6 参照)。

プレート毎の偏差の補正

ELISA では、同一の試料を測定しても、プレート毎

に測定値が異なってくることがある。この場合各プレート毎に標準陽性血清を置き、プレート毎に得られるデータを、標準陽性血清の吸光度で補正することにより、プレート毎のばらつきを補正することが可能である。

その他

高感度を求めると、非特異反応やバックグラウンドを低下させる必要がある。最適な濃度の抗原、二次抗体の使用、ブロッキング剤の選択、界面活性剤の種類、洗浄操作等により改善可能な例もある。

試薬類

ELISA に使用する試薬類は、タブレット化、カプセル化あるいは溶液化されて市販されており、実験室レベルでは、これらを用いることにより、効率化できる。

タブレット化あるいはカプセル化されている試薬の一部を下記に示す。なお、各使用法は、データシート等に従う。

Carbonate-Bicarbonate Buffer Capsule : Sigma, C3041

Phosphate-Citrate Buffer Tablet : Sigma, P4809

ABTS: Roche, 11 112 422 001, ABTS Tablets: 20 tabs, 50 mg/tab, 1 tab/100 ml phosphate citrate buffer (pH 4.0) + 20 μ l of H₂O₂

TMB HCl 錠 : Sigma, T3405

TMB 錠 : Sigma, T5525

pNPP 錠 : Sigma, N2770, N1891

開発のシミュレーション

上記の基礎的知見を踏まえ、牛のある病原体に対する特異抗体検出法として、間接 ELISA による感染血清中の特異抗体検出法を模擬的に開発する。そこでまず、使用する『抗原濃度』と『二次抗体』の至適濃度を求める。至適条件の目安は、標準陽性血清が吸光度 = 1.0 前後を示し、バックグラウンドが低く、抗原が最少量で済み、さらに標準陰性血清が吸光度 = 0.1 以下を示す条件である。

材料

標準陽性牛血清, 標準陰性牛血清 (使用時の希釈倍率は 100 倍)

抗原

市販の二次抗体 (ABTS での使用濃度はおよそ 1,000 倍

程度)

基質 (ABTS)

その他の ELISA に必要な器具試薬類は先の記載による。

今回のモデルケースでは、抗原希釈系列は、50 倍, 100 倍, 200 倍, 400 倍, 800 倍, 1,600 倍, 3,200 倍, 6,400 倍, 12,800 倍, 25,600 倍, 51,200 倍および対照とする。また、二次抗体の希釈系列は、200 倍, 400 倍, 800 倍, 1,600 倍, 3,200 倍, 6,400 倍, 12,800 倍および対照とする。分注パターンは、希釈系列の数などにより変える。プレートは、陽性血清用と陰性血清用の 2 枚用意する。ただし、抗原量が少ない場合は、まず陽性血清で条件を決めた後、その条件で陰性血清の反応性を確認する手順でもよい。

1. 検討する試薬 (抗原, 陽性血清, 陰性血清, 二次抗体等) の必要量 (+ α) を計算する。

今回の例では抗原溶液はプレート 1 枚当たり, 抗原の各希釈濃度および対照に対して各 8 ウェル分必要 (予備も含めて各希釈 1.0 ml) である。陽性血清および陰性血清は、プレート 1 枚分各 10 ml 必要である。ブロッキング剤溶液は、プレート 2 枚分 20 ml 準備する。二次抗体の各希釈濃度に対して、各希釈濃度に対して 12 ウェル分 (予備も含めて、各希釈 1.5 ml) 必要である。呈色液は、20 ml 準備する。表 2 にプレート 1 枚分の抗原と二次抗体の希釈系列の例を示している。

2. 抗原希釈液を濃度の低いものから、表 3 に従いプレート各列に 100 μ l ずつ分注し、ビニールバッグ等に入れ、37°C, 1 時間インキュベートする。洗浄後、ブロッキング液を分注し、ビニールバッグ等に入れ、37°C, 1 時間インキュベートする。
3. プレートを洗浄後、希釈した陽性血清あるいは陰性血清を各ウェルに 100 μ l ずつ分注し、37°C, 1 時間インキュベートする。
4. プレートを洗浄後、濃度の低いものから、希釈した二次抗体を、表 4 に従い 100 μ l ずつ分注し、37°C, 1 時間インキュベートする。
5. プレートを洗浄後、呈色液を全ウェルに 100 μ l ずつ分注し、37°C, 1 時間インキュベートする。

表 2. 希釈系列 (プレート 1 枚分)

単位は, μ l

		antigen											
antigen buffer		x200	x400	x800	x1,600	x3,200	x6,400	x12,800	cont.				
		15 3,000	1,500 1,500	1,500 1,500	1,500 1,500	1,500 1,500	1,500 1,500	1,500 1,500	1,500	1,500			
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓			
		1,500	1,500	1,500	1,500	1,500	1,500	3,000	1,500				
		POD-anti-bovine IgG											
labeled IgG buffer		x50	x100	x200	x400	x800	x1,600	x3,200	x6,400	x12,800	x25,600	x51,200	cont.
		40 2,000	1,000 1,000	1,000 1,000	1,000 1,000	1,000 1,000	1,000 1,000	1,000 1,000	1,000 1,000	1,000 1,000	1,000 1,000	1,000 1,000	1,000
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		1,040	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	2,000	1,000

表 3. 抗原希釈液の分注パターン

希釈した抗原を各列毎に濃度の低いものから分注する。

		抗 原 希 釈											
		x50	x100	x200	x400	x800	x1600	x3200	x6400	x12800	x25600	x51200	cont.
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

表 4. 希釈二次抗体の分注パターン

希釈した二次抗体を各行毎に濃度の低いものから分注する。

二 次 抗 体 希 釈	x200	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	x400	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	x800	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	x1600	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	x3200	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	x6400	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	x12800	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	cont.	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→

表 5. 得られた結果 (陽性血清)

		抗 原 希 釈											
		x50	x100	x200	x400	x800	x1,600	x3,200	x6,400	x12,800	x25,600	x51,200	cont.
二 次 抗 体 希 釈	x200	2.45	2.4	2.35	2.3	2.1	1.9	1.65	1.3	0.9	0.65	0.45	0.3
	x400	2.4	2.35	2.3	2.2	1.95	1.6	1.25	0.95	0.7	0.5	0.35	0.2
	x800	2.2	2.15	2	1.8	1.55	1.25	1	0.75	0.55	0.4	0.25	0.1
	x1,600	1.8	1.75	1.65	1.5	1.25	1	0.8	0.6	0.4	0.3	0.2	0.09
	x3,200	1.4	1.35	1.23	1.1	0.97	0.8	0.6	0.45	0.3	0.2	0.14	0.08
	x6,400	1	0.97	0.9	0.8	0.65	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.09	0.06
	x12,800	0.6	0.55	0.47	0.4	0.3	0.2	0.15	0.12	0.1	0.08	0.08	0.05
	cont.	0.06	0.055	0.05	0.045	0.05	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.04

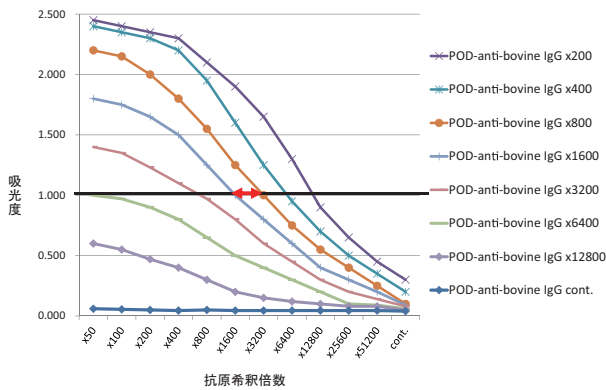


図5. 抗原濃度と二次抗体濃度の関係（陽性血清の反応）
標準陽性血清が、吸光度 \approx 1.0前後を示し、バックグラウンドが低く、抗原希釈が高い領域を至適条件とする。
本図からは、[抗原 = 800 倍, 二次抗体 = 3,200 倍], [抗原 = 1,600 倍, 二次抗体 = 1,600 倍], [抗原 = 3,200 倍, 二次抗体 = 800 倍], [抗原 = 6,400 倍, 二次抗体 = 400 倍], [抗原 = 12,800 倍, 二次抗体 = 200 倍] が相応する。これに対応する POD-IgG のバックグラウンドは、順に、0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3 である。バックグラウンドが低く、抗原希釈が高い至適条件は [抗原 = 1,600 倍, 二次抗体 = 1,600 倍], [抗原 = 3,200 倍, 二次抗体 = 800 倍] 辺りと判断される。

6. 反応停止液を分注し (100 μ l), 測定器で測定する。

表5は得られた結果(陽性血清)で、図にしたものが図5である。

図5に示すように、この条件検討により抗原濃度と二次抗体濃度の関係が明らかとなった。標準陽性血清の吸

光度 \approx 1.0を求めると、[抗原:800倍, 二次抗体:3,200倍], [抗原:1,600倍, 二次抗体:1,600倍], [抗原:3,200倍, 二次抗体:800倍], [抗原:6,400倍, 二次抗体:400倍], [抗原:12,800倍, 二次抗体:200倍]が相応する。これに対応する二次抗体のバックグラウンドは、順に、0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3である。バックグラウンドが低く、抗原希釈が高い至適条件は [抗原:1,600倍, 二次抗体:1,600倍], [抗原:3,200倍, 二次抗体:800倍] 辺りが至適条件と判断される。さらに、陰性血清の吸光度が低いことを確認する。筆者らは、抗原を節約できる方を選択しているので、[抗原:3,200倍, 二次抗体:800倍]に近い条件を、最終条件としている。この後、抗原:3,200倍, 二次抗体:800倍の条件の前後を詳細に検討し、最終的な条件とする。

最終条件が決まった後、陽性血清と陰性血清のサンプルのELISA値(抗体価)を求め、統計処理等により、カットオフ値を求める。図6に陰性血清と陽性血清のヒストグラム例を示している。

最後に

本稿では、ELISAの基本的な解説と、実際的な手技を中心に記載した。ここで示している具体例やモデルは、著者らが報告している実施例に基づいている。ここに示しているノウハウは、サンドウィッチELISAや競合ELISA(ブロッキングELISA)を構築する際にも基本となる。ELISAが家畜衛生の分野においても、今後ますます活用されることが期待される。また、モノクローナル抗体との組み合わせにより、診断の高度化が期待される。

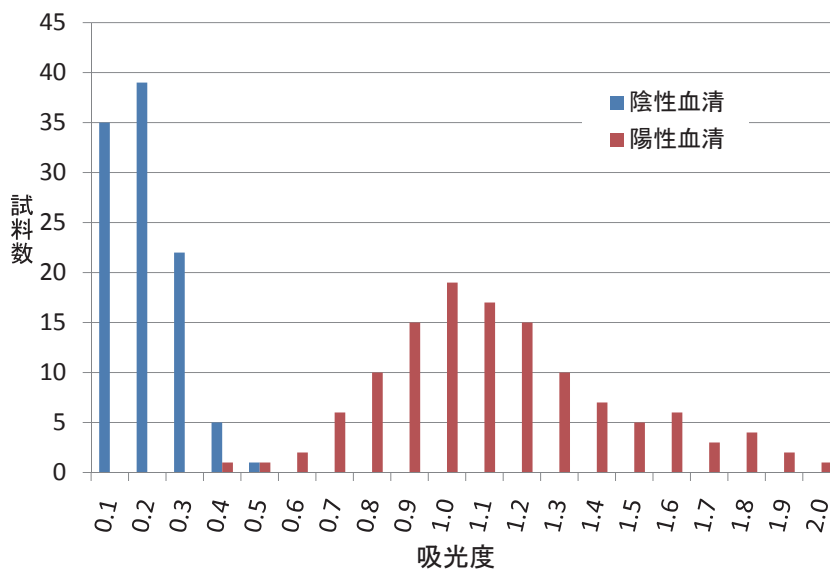


図6. 検査試料のヒストグラム例

参考文献

- 1) Hornbeck, P.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. In: Current Protocols in Immunology (Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., et al. eds.). John Wiley and Sons. New York (1991).
- 2) 森山達哉: バイオ実験で失敗しない! 検出と定量のコツ. 羊土社 (2005).
- 3) 石川榮治, 河合 忠, 宮井 潔編: 酵素免疫測定法, 第2版. 医学書院 (1982).
- 4) Smith, R.D.: Veterinary Clinical Epidemiology, 2nd ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1995).
- 5) Shimizu, S., Suzuki, K., Nakamura, K., et al.: Isolation of *Theileria sergenti* piroplasms from infected erythrocytes and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of *T sergenti* infections. Res. Vet. Sci. 45, 206-212 (1988).
- 6) Shimizu, S., Shimura, K., Itoh, S., et al.: *Babesia ovata*: isolation from erythrocytes and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies. Parasitol. Res. 78, 684-688 (1992).
- 7) Shimizu, S., Toyota, I., Arishima, T., et al.: Frequency of serological cross-reactions between Ibaraki and bluetongue viruses using the agar gel immunodiffusion test. Vet. Ital. 40, 583-586 (2004).
- 8) Hirota, J., Shimizu, S., Watanabe, A., et al.: Establishment of Bovine CXCL8 Quantitative Sandwich ELISA with Newly Developed Monoclonal Antibodies. European Cytokine Network. 1, 73-80 (2011).
- 9) Hirota, J., Shimoji, Y. & Shimizu, S.: New Sensitive Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Monoclonal Antibody against Nonstructural Protein 1 of West Nile Virus NY99. Clin. Vaccine Immunol. 19, 277-283 (2012).
- 10) Hirota, J., Shimizu, S., Shibahara, T., et al.: Development of monoclonal antibodies to West Nile virus and their application in immunohistochemistry. Clin. Vaccine Immunol. 19, 1853-1858 (2012).
- 11) Hirota, J. & Shimizu, S.: A new competitive ELISA detects West Nile virus infection using monoclonal antibodies against the precursor-membrane protein of West Nile virus. J. Virol. Methods. 188, 132-138 (2012).

Summary

Guide to develop indirect ELISA to detect antigen specific antibody

Jiro HIROTA & Shinya SHIMIZU *

ELISA has the merits such as, be easy, rapid, convenient and sensitive, and needs only small amount of samples/antigen and a short detection time. We introduce that the procedure how develop indirect ELISA to detect antigen specific antibody.