

# ELISA 法——その特徴と実施上の注意点——

日本植物防疫協会研究所 **たか** **はし** **よし** **ゆき**  
**高** **橋** **義** **行**

## はじめに

前報では凝集反応法について述べたが、引き続きここでは ELISA 法 (酵素結合抗体法) を紹介する。

近年植物ウイルス検出方法の一つとして、ELISA 法が一般に普及してきた。その理由は本法の感度がきわめて高く、結果に信頼が置けること、及び一度に多試料の検定ができることなどによるが、同時に、調製された抗体と酵素標識抗体がセットで購入できるようになったことも一因と考えられる (国内では日植防研究所でこれまで実費配布している。ほかに外国製品の輸入代理店もある)。

ELISA 法はウイルス病の診断・同定、圃場検診、輸出入検疫、果樹の母樹・苗木検定、その他種子検定など幅広く利用されている。また、最近ではウイルス抵抗性品種育成におけるスクリーニングの一手法としても本法が適用され始めた。このため、ELISA 法は今や特定の専門家に限って実施される技法ではないといえる。

市販の抗体及び酵素標識抗体はセットに、あるいはキット化されており、初心者でも行えるようになっている。しかし、初心者がこれらを使う場合、時に予想外の結果 (例えばすべて発色したり、逆に発色しないか発色が弱い) に戸惑うことも見られた。これは ELISA 法が他の血清試験法に比べて手法が煩雑であり、誤操作などが生じやすいためである。

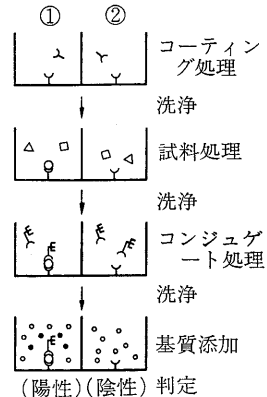
本稿では、日植防研究所で配布している ELISA 用セットを用いてウイルス検定を実施する場合を例にして、初心者が引き起こしやすい問題点や留意すべき事項について述べ、今後新たに ELISA 法を試みようとする方々の御参考に供したい。

## I ELISA 法の実際と注意点

### 1 ELISA 法の原理

ELISA 法には、種々の方法が考案されているが、こ

Serological Diagnosis for Plant Viruses (2). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)—— The characteristics and Technical Remarks—— By Yoshiyuki TAKAHASHI



Y: 抗体, ○: ウイルス, E: 酵素標識抗体,  
●: 基質, ☆: 基質分解発色

第1図 二重抗体法の概略

こではよく用いられる二重抗体法 (CLARK et al., 1977; 久原, 1980) を基本として説明する。本法の概略を第1図に示した。マイクロプレートの各ウエル壁に抗体を吸着させ (コーティング処理), 試料を添加する (試料処理)。次に酵素 (ここではアルカリフォスファターゼ=AP) 標識抗体 (コンジュゲート) を添加する (コンジュゲート処理)。最後に基質を添加するとウイルスの存在するウエル (第1図の①) では基質が分解され黄色に発色する (発色程度はウイルス量に比例)。

### 2 準備するもの

日植防研究所では、コーティング液 (抗体) とコンジュゲート液 (AP 標識抗体) をセットにして配布している。これ以外に必要な試薬は、次のとおりである。

- ① 0.05 M カーボネート緩衝液 (pH 9.6, 0.02%  $\text{NaN}_3$  を含む, コーティング液希釈用)
- ② 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.85%  $\text{NaCl}$ , 0.02%  $\text{NaN}_3$ , 0.05% Tween 20 を含む, プレート洗浄及びコンジュゲート希釈用, PBS-T)
- ③ 10% ジエタノールアミン溶液 (pH 9.8, 発色剤溶解用)
- ④ P-ニトロフェニルリン酸 II ナトリウム (発色

剤)

⑤ 3 M 水酸化ナトリウム (反応停止用)

⑥ 96 ウェル マイクロプレート

### 3 操作法

#### (1) コーティング処理

コーティング液をカーボネート緩衝液によって所定量 (100~1,000 倍) に希釈し, 1 ウェル当たり 200  $\mu$ l ずつ分注する。プレートにカバーをして (乾燥防止用), 37°C で 4 時間 (または 4°C で一晩) インキュベーションする (抗体吸着)。

#### (2) 洗浄

未吸着の抗体を PBS-T で洗い流す。洗浄には, プレートウォシャー またはプラスチック製の洗浄瓶を用いる。PBS-T は分注後 3 分間ほど放置してから吸引して除去するか, もしくはプレートを逆さにして振り落として除去する。また, 水の切れを良くするため, ペーパータオルの上に逆さにしてたたきつける。洗浄は 3 回行う。以後の洗浄も同様に行う。

#### (3) 試料処理

磨砕用緩衝液を加えて磨砕した検体試料を 200  $\mu$ l ずつ入れる (1 検体に 2 ウェルを使用, 必ず緩衝液のみの区を設ける)。試料添加後カバーをして 4°C 16 時間 (37°C 2 時間) インキュベーションする。

(4) PBS-T で 3 回洗浄する。

#### (5) コンジュゲート処理

PBS-T で所定量 (100~1,000 倍) に希釈したコンジュゲート液を 200  $\mu$ l ずつ分注する。カバーをして 37°C で 3 時間インキュベーションする。

(6) PBS-T で 5 回洗浄する。

#### (7) 基質添加

発色剤を 1 mg/ml になるように 10% ジエタノールアミン溶液に溶解し, 200  $\mu$ l ずつ分注する。

#### (8) 結果の判定

基質添加後 15 分ごとに白紙を背景にして肉眼でプレートを観察し, 黄色の発色程度を見る。対照区と罹病区間の発色強度差が明りょうになったとき, 3 M NaOH を添加して反応を停止させる (通常 1~2 時間後)。また発色強度を分光光度計によって測定する場合には, ウェル中の液を蒸留水で 10 倍に希釈し, 波長 405 nm における吸光度を測定する。オートリーダーがあればプレートのまま測定できる。対照区 (健全または緩衝液区) と比較してウイルス検定する。

### 4 一般的注意事項

#### (1) 試薬

試薬は純度の高いものを用いる。また純度の悪い蒸留

水は酵素活性を阻害したり, バックグラウンドを高くする場合がある。またプレートは, メーカーや種類によって抗体の吸着に差が見られる場合がある。

#### (2) 抗体の吸着

コーティング液が所定濃度より濃い場合には, 発色程度に影響が見られない, 発色が強くなる, あるいは逆に発色が弱くなることもある。

#### (3) 試料調製

磨砕用緩衝液は検定対象によって, PBS-T に種々の添加物を加えたり, pH を変えたり, あるいはこれ以外の緩衝液を用いなければならない場合がある。あらかじめ対象とするウイルスについて文献などで調べる必要がある。

#### (4) コンジュゲート処理

一般に所定濃度より濃い濃度で使用した場合, 基質分解反応時間は早くなり発色も強くなる。感度を上げる必要がある場合, あるいは所定の濃度では発色が弱い場合に高い濃度のコンジュゲートを用いて発色を強くすることができる。ただし, 濃すぎるとバックグラウンドが高くなる傾向を示すので注意しなければならない。

#### (5) 洗浄

コーティング処理及び試料処理後の洗浄はたとえ十分でなくても結果への影響は少ない。ただし, 試料処理後の洗浄で注意が必要なことは試料を振り出した後で, 洗浄液を分注したときにあふれさせないことである。PBS-T を入れては振り出し, 入れては振り出すという具合に, 1~2 回の予備洗いをしてから PBS-T をたっぷり入れて 3 分間ごとの洗浄を行う。これは洗浄瓶を用いて洗浄する場合, ウィルス濃度の高いものを検定したときに周りのウェルに非特異反応が起こることがあり, これを避けるためである。また, コンジュゲート処理後の洗浄は十分に行い, 余分な酵素が残らないようにしなければならない。特に洗浄瓶を用いて PBS-T を入れる場合, よく泡などのため PBS-T が入らないウェルができることがあり, なかなか気づきにくいので注意を要する。

#### (6) 判定

オートリーダーで測定した場合に, ウェル中に泡があると吸光値が異常に高く記録されることがあるので, 常に肉眼でも確認する必要がある。また基質を添加してからの経過時間は常に記録しておくと便利である。これによって吸光度の増加量がわかり陽性, 陰性を判定する際, あるいは特異反応, 非特異反応によるものかを判断する際にある程度参考になる。また他のプレートあるいは以前の検定と比較するためにも必要である (III を参

照)。

II 問題解決チャート

I 問題解決チャート

問 題 点	原 因	コメント・対策
A全ウエルで発色なし、または発色が弱い。	<p>1 検体試料中に対象となるウイルスがない。</p> <p>2 対象とするウイルス濃度が低いか、試料の希釈しすぎ。</p> <p>3 操作ミス</p> <p>(1)カーボネート緩衝液のモル濃度及び pH の間違い。</p> <p>(2)コーティング液を PBS-T で希釈して使用。</p> <p>(3)各インキュベーションの時間が短い。</p> <p>(4)コンジュゲート液の代わりにコーティング液の添加。</p> <p>(5)コーティング液及びコンジュゲート液を所定の濃度に希釈しない。</p> <p>(6)コンジュゲート処理の過程で 40°C 以上の高温下にインキュベーションした。</p> <p>(7)コーティング液及びコンジュゲート液を希釈した状態</p>	<p>正常</p> <p>磨砕用緩衝液を少なくしてウイルス濃度を高める。コンジュゲート液の濃度を濃くして用いる。各インキュベーションの時間を長くする。</p> <p>カーボネート緩衝液を使う。</p> <p>時間を長くする。</p> <p>ラベルをよく確認して使用直前に希釈して使用する。</p> <p>コンジュゲート液が薄すぎると発色強度は低下する。</p> <p>常に必要量のみ使用直前に希釈して用いる。ただし、コーティング液は</p>

問 題 点	原 因	コメント・対策
	<p>で保存し、これを使用。</p> <p>(8)コンジュゲート液の凍結。</p> <p>(9)有効期間を過ぎ、または保存状態の悪いコーティング液及びコンジュゲート液を使用。</p> <p>(10)コーティング液またはコンジュゲート液の入れ忘れ。</p> <p>(11)変質した発色剤の使用。</p> <p>(12)基質の濃度の間違い。</p> <p>(13)10%ジェタノールアミン溶液の pH の未調整。</p>	<p>希釈してプレートに添加した状態で 4°C で長期間保存できる (TAKAHASHI et al., 1987)。</p> <p>凍結により酵素と抗体が分離してしまうことがある。</p> <p>新しいものを使用する。コンジュゲート液の活性を調べてみる。</p> <p>それぞれを分注した後よく確認する。</p> <p>基質の活性を調べてみる。</p> <p>作り直す。</p> <p>AP の至適 pH は 8.0~10.0 であるが、発色剤との関係で pH 9.8 に調整する。</p>
B対照区 (健全葉区、緩衝液区) まで発色した。	<p>1 操作ミス</p> <p>(1)ウイルスの混入。</p> <p>(2)コンジュゲート処理後の洗浄が不十分。</p> <p>(3)隣り合ったウエルに高濃度のウイルスを含む試料の存在。</p>	<p>使用器具をよく滅菌する。使い終わった器具は片づけておく。ピペット操作のときウイルスが混入しやすいので注意する。</p> <p>洗浄の回数を多くする。また液をよく振り出して効率よく洗浄する。</p> <p>試料処理後の洗浄のときあふれた洗浄液や飛び散った試料液によって他のウエルがウイル</p>

問題点	原因	コメント・対策
C全ウェルで発色した.	1 操作ミス	スで汚染されることがある.
	(1)コーティング液の代わりにコンジュゲート液の吸着.	ラベルをよく確認して使用直前に希釈すること.
	(2)基質液のコンジュゲート液による汚染.	手指をよく洗い使用直前に作る. またコンジュゲート処理で使った器具などは片づけておく.
	(3)A—3—(1) (4)B—1—(2)	

2 活性テスト

(1) 基質溶液の活性テスト

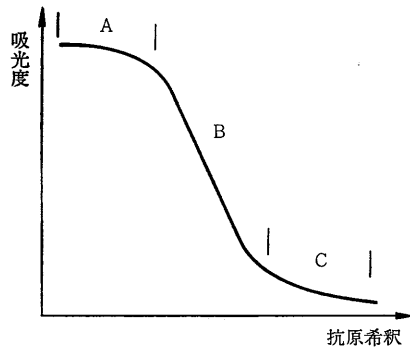
1.0 ml の基質溶液に 10 μl のコンジュゲート原液を入れる。5 分間以内に発色が出なければ基質溶液は失活している。

(2) コンジュゲート液の活性テスト

(1) でテスト済みの 1.0 ml の基質溶液に、1.0 ml の所定量に希釈したコンジュゲート液を加える。これで 5 分間以内に発色がでなければコンジュゲート液が失活している恐れがある。

III 判定結果の評価と注意点

吸光度の測定値を基に判定する際に注意しなければならないのは、測定値を比較する場合と、陽性、陰性の境界値を決める場合である。ELISA 法では、用いるプレートごとに測定感度の変動し、プレートごとの測定値を直接比較できないことが多い。したがって以前に行ったものと比較するのはきわめて難しい。そこで各プレートごとに陽性対照の標準曲線を描き、この標準曲線に対して各検体ウイルスごとの値を補正、標準化することによって異なるプレート間で、また異なる時期に行ったプレート間で測定値を相互に比較することが可能になる。この場合、各インキュベーションの時間や温度、基質添加後の時間などの各条件は同じにする必要がある。ただし、厳密には、同じプレート内でもウェル間で差が見られることが多い。このため検定に際しては、常に 1 検体に 2 ウェルを使用することを勧めたい。ところで既知の



第 2 図 標準曲線

ものと未知のものとを比較する場合、考慮しなければならないことがある。第 2 図のような標準曲線で、A、C では吸光度の差は小さいのにウイルス濃度差は大きく、B ではウイルス濃度差は小さくても吸光度の差は大きいことである。これはウイルス濃度が 2 倍濃くなくても、必ずしも吸光度が 2 倍になるものではないことを示している。この点を考慮してウイルス濃度を推定しなければならない。

次に測定値を基に、陽性、陰性の境界値をどこにとるかによって判定結果は大きく異なってくる。第 1 表は 1984 年から 1985 年の 2 年間に 4 種の学術誌に発表された ELISA 法を用いた研究論文の中で境界値をどのように決めているかを調べたものである (SUTULA et al., 1986)。ELISA 法を用いた 81 編の研究論文のうち、半分以上の論文では判定基準を直接には述べておらず、残りの論文でもまちまちの方法が用いられている。このよ

第 1 表 1984 年と 1985 年に 4 種の学術誌<sup>a)</sup> に発表された ELISA 法を用いた論文の中での判定基準 (SUTULA et al., 1986 から作成)

方 法	論 文 数
明らかにしていない <sup>b)</sup>	49
肉眼	7
2 $\bar{x}$ <sup>c)</sup>	10
3 $\bar{x}$	5
$\bar{x}+2S$ <sup>d)</sup>	2
$\bar{x}+3S$	5
$\bar{x}+4S$	1
その他	2
計	81

a) Plant Disease, Plant Pathology, Annals of Applied Biology, Journal of General Virology

b) 引用文献を引いているものも含む。

c)  $\bar{x}$  = 健全の吸光度の平均。

d) S = 健全の吸光度の標準偏差。

うに同じ ELISA 法を用いても研究者によって判定基準が違っており、客観的に吸光値がいくら以上になったら陽性とみなすのかは、きわめて難しい。今日、比較的よく用いられるのは、 $2\bar{x}$  と  $x+3S$  (第1表) であるがもっぱらケース・バイ・ケースで経験的に、各検定対象ごとに決めてるのが現状ではないかと考えられる。さて、ここまで操作上の幾多の注意事項を守ってやっと正確な測定データを得た方々のため、筆者は、有意差検定法を利用されることをお勧めする。この有意差検定法は、陰性対照の吸光度に対して有意(危険率は1%以下とする)に高い吸光度を求める方法である(岩崎ら, 1983)。この方法は、種子検定や抵抗性品種のスクリーニングなどの判定に向いていると思われる。これに対してウイルス病の同定・診断などでは陰性対照の2倍以上( $\geq 2\bar{x}$ )を便宜的に陽性と判定してもよいのではないかとと思われる。

以上、正確な検定を行った結果、測定感度が不足している場合、①各処理のインキュベーションの時間を長くする、②抗原の量が増えるように工夫する、③コンジュゲート液の濃度を上げる、④磨砕用緩衝液を検討する、⑤基質添加後、測定までの時間を長くする、などの点を検討することが必要になる。

### おわりに

本稿では主として初心者を対象として、市販の抗体を

用いて ELISA 法を実施する際に生じる問題点と対策について述べてきた。これらに留意すれば、誤操作による結果判定の混乱は相当防げるものと思われる。

前述以外の問題として、検体試料の調製がある。特に磨砕用緩衝液の選択は重要である。試料によっては基質を分解する酵素を多量に含む場合もあり、この場合には当然のこととして非特異反応が生じやすい。また、緩衝液が対象ウイルスの抽出に不適当な場合、あるいは基質の酵素分解を阻害するような場合には、発色度が低下する。検定前に予備調査をして、常に最適な条件を確立することが重要である。

ELISA 法は、多数試料の慣行検診法としてきわめて有利な方法であり、今後もより一層普及することが期待される。

本稿を草するうえで種々ご指導、ご助言を賜った本会研究所匠原監一郎博士、下村 徹博士、荒木隆男博士に謝意を表する。

### 引用文献

- 1) CLARK, M. F. and A. N. ADAMS (1977): J. Gen. Virol. 34: 475~483.
- 2) 岩崎辰夫ら (1983): 単クローン抗体 ハイブリドーマと ELISA, 講談社, pp. 187.
- 3) 久原重松 (1980): 植物防疫 34: 129~135.
- 4) SUTULA, C. L. et al. (1986): Plant. Disease 70: 722~726.
- 5) TAKAHASHI, Y. et al. (1987): Ann. Phytopath. Soc. Japan 53: 254~257.