

2. 3. 競合 ELISA 法の不確かさ

Fig.5 に、競合 ELISA 法の操作手順を示す。太線で囲んだ操作が、測定値の誤差に大きく寄与すると考えられる。これ以外の操作は影響が少ないまたは無いと結論できる。ここで取り上げている競合 ELISA 法は、第 2 抗体固相化法である。プレートに結合している第 2 抗体は、第 1 抗体（抗血清）に比べて過剰にあるため、第 2 抗体の固相化の度合いのパラツキは測定値の精度に影響しない。反応停止液の量が測定値に影響しないことは、非競合法の例と同様である。測定対象物質と標識抗原を抗血清に対して競合させるため、これら 3 つの量の誤差は測定誤差に影響する。

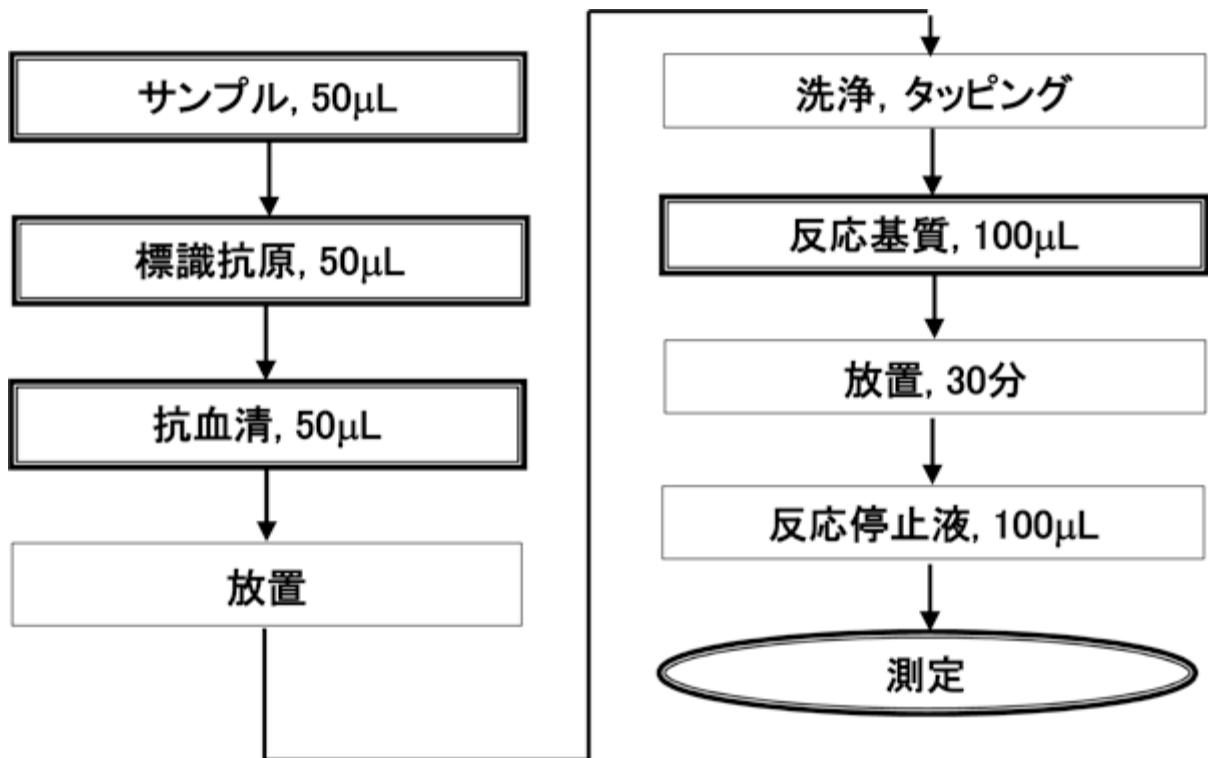


Figure 5 競合 ELISA の測定手順

3.2 合成標準不確かさの推定

非競合法の例と同様に、合成標準不確かさは式 1 から求める。分析対象物質の量を X 、標識抗原の量を G 、第 1 抗体（抗血清）の量を B とする。酵素反応により生成した色素の量 Z は、固相に結合した標識抗原の量に比例する [5] :

$$Z = k \frac{G}{X + G} B$$

ここで、kは比例係数である。この式を、式1を用いて合成標準不確かさに変換すると、次の式になる[5]；

$$\rho_T^2 = \frac{X^2}{(X+G)^2} [\rho_G^2 + \rho_X^2] + \rho_B^2 + \rho_S^2 + \left(\frac{\sigma_W}{f(X)} \right)^2$$

ただし、

X：分析対象物質の濃度

G：第1抗体の50%に標識抗原が結合するときの標識抗原の量；

ρ_X ：分析対象物質の注入量のRSD（ピペットのばらつき）；

ρ_G ：標識抗原の注入量のRSD（ピペットのばらつき）；

ρ_B ：抗血清の注入量のRSD（ピペットのばらつき）；

ρ_S ：反応基質溶液量のばらつきが吸光度測定値のばらつきに与える影響、

$\rho_S = (\text{注入誤差のRSD}) \cdot (2/3)$ ；

σ_W ：ウェル自体の吸光度のSD（ウェル間でのSD）；

f(X)：吸光度を表す検量線（Xは、分析対象物質の濃度）。

式3の右辺の量は、全て実験から求めることができる。 ρ_G 、 ρ_X 、 ρ_S はピペットで注入した水の重量の相対標準偏差から推定できる。抗血清は水より粘度が高いため、実際に抗血清を分注しその重量から、相対標準偏差を推定する。 σ_W は、空のプレートをプレートリーダーで測定して求められる。

3.3 不確かさの予測式的実験的検証

Fig.6は、競合法の検量線（左上）、測定値の精度プロファイル（右上）、濃度推定値の精度プロファイル（右下）を示す。式3の計算（実線）に使用した値は、 $G = 0.1 \text{ ng/mL}$ 、 $\rho_G = \rho_X = 0.9\%$ 、 $\rho_B = 1.9\%$ 、 $\rho_S = 0.61\%$ 、 $\sigma_W = 0.002$ 、である。抗血清は高粘度であり、このためにピペットによる注入量のばらつき(ρ_B)が大きくなっている。

競合法では、検量線が原点を通る直線でないため、測定値の精度プロファイル（右上）と濃度推定値の精度プロファイル（右下）の形が異なっている。測定値（吸光度）のRSDは全濃度範囲であまり変動していないが、検量線から推定した濃度の推定値のRSDは0.1~1ng/mLで極小となり、低濃度範囲と高濃度範囲で大きくなるU字型を示した。低濃度で濃度推定値のRSDが大きい理由は、RSDの分母（濃度）が小さいためである。一方、高濃度では検量線の傾きが小さいため、RSDは大きくなっている。競合法での定量精度は、検量線の中心（変曲点）の周囲で、最も精度が高いと言われているが、その根拠は濃度の精度プロファイル（右下）から理解できる。

式 3 の各項の寄与率（左下）より，競合法での低濃度での主要な誤差要因は抗血清の注入誤差(ρ_B)であり，高濃度側ではウェルの吸収のバラツキ (σ_w) であることが分かる。

競合法と非競合法の精度プロファイル，寄与率を比べると，それぞれの方法の特長が見えてくる。競合法では，抗血清の注入精度を上げると，低濃度での定量値の不確かさを小さくできる。一方，非競合法では，96 穴プレートのウェルの吸収のバラツキを減らせば，低濃度領域での不確かさが改善される。

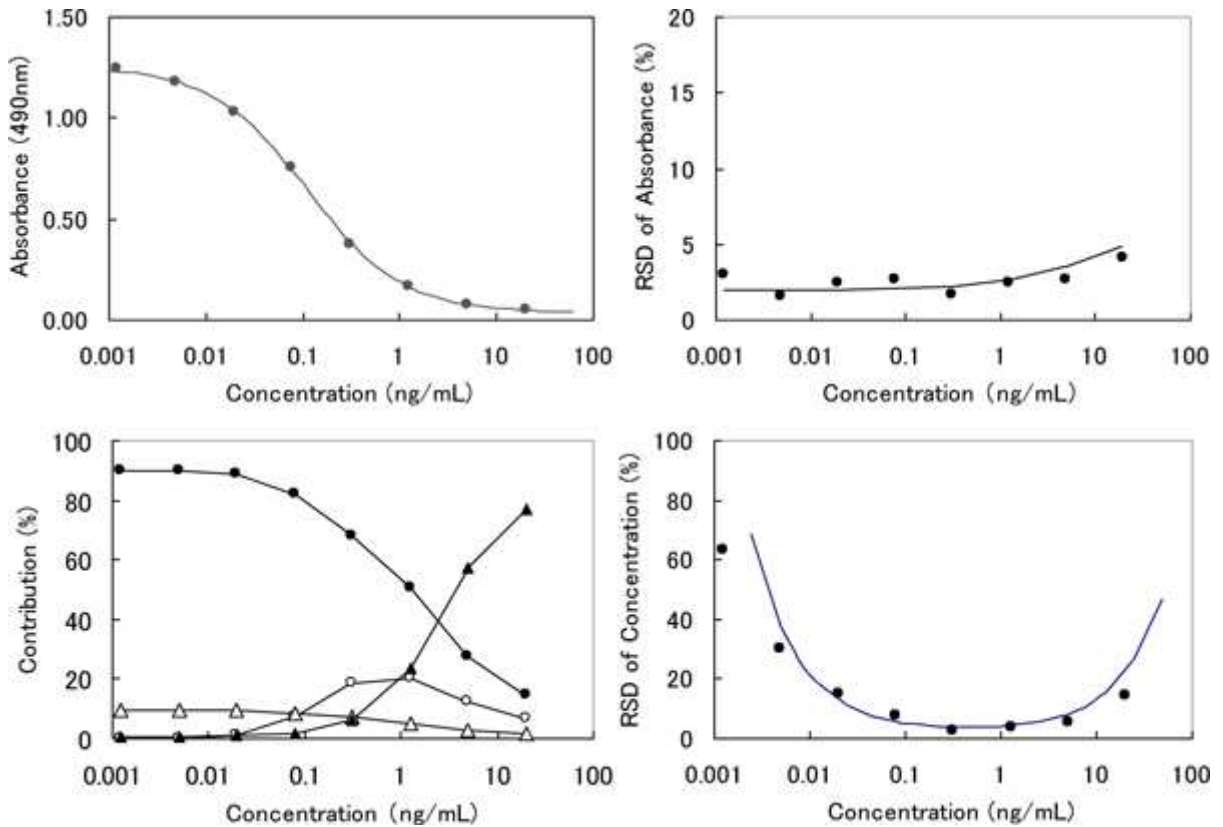


Figure 6 競合 ELISA の検量線（左上），測定値の精度プロファイル（右上），定量値の精度プロファイル（右下），式 2 の項の寄与率（左下）

○第 1 項；●抗血清の注入誤差 (ρ_B)；△基質の注入誤差 (ρ_S)；▲ウェルの吸収 (σ_w)。17 α -hydroxyprogesterone のキット'栄研'II を用いた。文献 [5] より引用。