

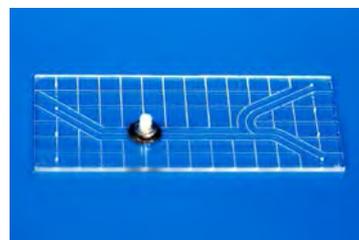
はじめに

本参考資料集は微量検体免疫分析装置（微量検体 ELISA 装置）に関するガイドライン案を検討する上で必要な実験と実験結果、その考察についてまとめたものである。研究対象として、ELISA をマイクロフレイディクス（微小流体工学）と熱レンズ検出法（非蛍光分子を超高感度に分析できるレーザー分析法）をデバイス化した分析機能デバイスを搭載した微量検体 ELISA 装置とした。微量検体 ELISA 装置の開発を通じて、ELISA を原理とする微量免疫分析装置全般に係るガイドライン案を策定する。この装置では、マイクロリットル以下の検体量で疾病マーカーの分析が可能であり、将来の診断分析法として世界中で研究されている。実験者らはその中において、世界で最も早くからデバイス開発と機器開発に成功したグループであり、この技術の草分けとして国際的に認知されている。微量検体 ELISA の外観写真および装置構成を図 1 に示す。

(微量検体 ELISA)



(マイクロ流体チップ)



【流路レイアウト】

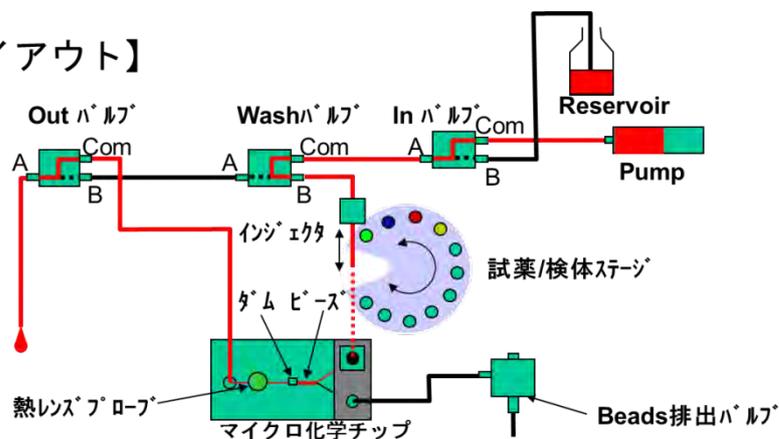


図 1 装置構成

開発の経緯

現在の日本における国民医療費や少子高齢化などの問題を背景に、病院治療から予防医療や疾病管理を伴う継続的ケアができるような検査システムは、今後ますます需要が増すと考えられる。医療検査のデバイス化やその小型化は必要不可欠であり、近い将来、これまで大病院や分析専門会社の高度な分析機器で行われていた検体検査がクリニックや家庭で行われるようになることが予想され、国民医療費の抑制に大きく貢献すると期待されている。現在、多くの診断マーカーがあり、身体の状態を把握するために大変重要な検査項目となっている。

一般に、検査をするための免疫分析装置は、大型で検体や試薬も多くを必要とするため、大病院や検査機関のみの使用となっているが、超微小空間で ELISA を行い、超高感度分析の技術を利用したマイクロ免疫分析装置を用いることにより、従来の大型装置と比較して、検体や試薬の消費量および反応時間の大幅な削減が出来、さらに価格も低コストになることで、一般ユーザーでも取扱いが可能になると考える。また、使用場所が、大病院、クリニック、在宅となれば、装置も小型分散化が進み、必然的に検体量も mL 単位から μL 単位へと変わってくるため、それに適した技術開発が必要となる。

本事業では、モデルバイオマーカーとして C 反応性蛋白 (C-reactive protein : CRP) を選択し、それを用いた検討によって得られた評価基準を参考資料集に示した。CRP の選択理由として、以下の点が挙げられる。

- ・炎症マーカーとして既に臨床現場で用いられている
- ・ $5 \mu\text{g/mL}$ 以下の低濃度領域まで高精度に測定する高感度測定により、炎症の有無だけにとどまらず、慢性疾患（心筋梗塞、脳梗塞など）の可能性などをスクリーニング的に診断することが可能となるため、疾病マーカーとしても最も頻繁に用いられているものの一つである
- ・将来的に在宅にて疾病管理や健康管理をする際の指標になり得る
- ・小病院で診療経験のある複数の医師からのヒアリングで、小規模医療現場で常用したいとされるマーカーとして CRP が挙げられた

原理と装置構成

1. 反応原理・検出原理

(1) サンドイッチ ELISA 法（ビーズ法）

抗体が固相化された反応場に検体中の抗原を抗原抗体反応により結合させた後、さらに酵素標識抗体に結合させ、発色基質と反応させて酵素反応生成物を測定し、検体中の抗原量を測定する方法。目的物質を高感度で測定できる利点をもつが、小分子の場合、測定できない場合がある。微量検体 ELISA では、反応場として捕捉抗体を固相化したビーズを用いる。ビーズはガラス製のマイクロ化学チップの流路内にあるダム構造によって堰き止められ、検体・2次抗体・発色基質を順次送液することにより反応させる。検出は流路下部に取り付けられた熱レンズプロブにより検出する。測定終了後、使用したビーズは排出される。(図 2、図 3)

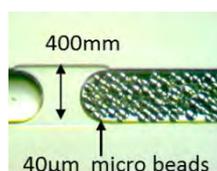


図 2 ダム構造と充填ビーズ

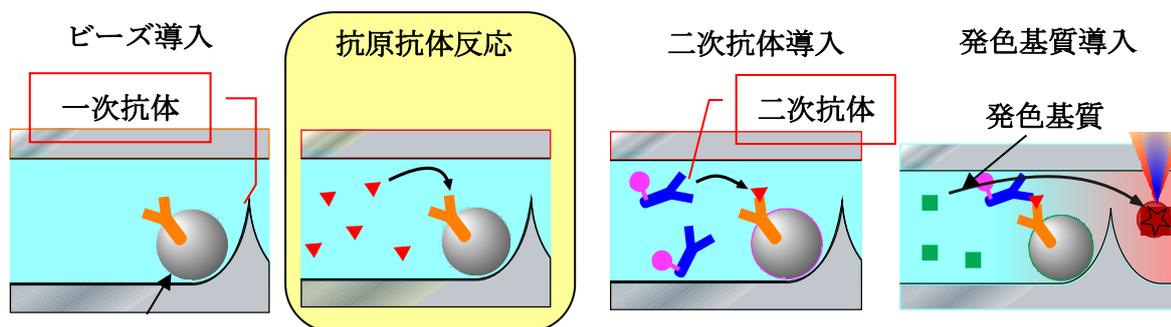


図 3 ビーズ上での ELISA

(2) ストップ/フロー検出法とピークの検出

反応生成物の検出は、ストップ/フロー検出法を用いて行う。本法はビーズを充填した微小空間での酵素反応を容易にコントロールすることができるとともに、酵素反応に由来しない発色基質の自己反応によるバックグラウンドを除去することができる。ビーズ充填部位に酵素基質を送り込み、一定時間送液を停止した後、再送液することによって高濃度の反応生成物が検出部に送られ、反応生成物がピークとなって検出される。(図 4)

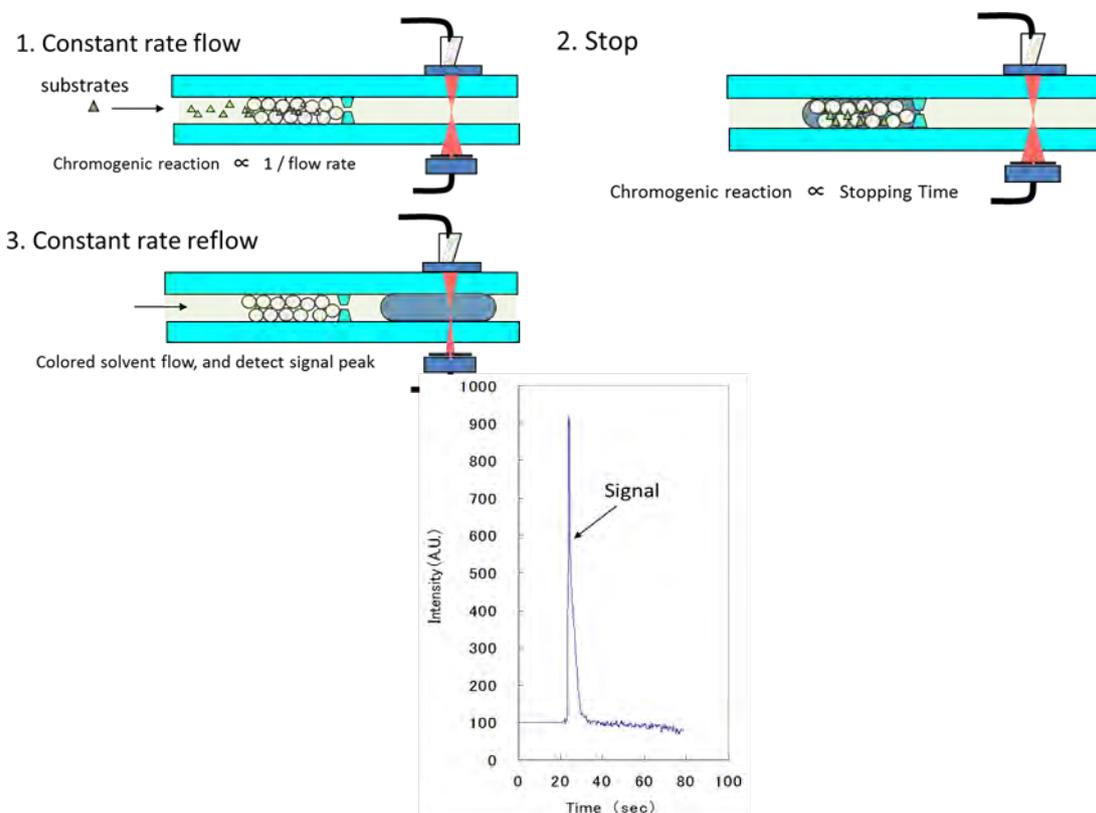


図 4 ストップ/フロー検出法とピーク検出

(3) 熱レンズ (検出部) の原理

対物レンズを通して励起光・プローブ光の 2 本のレーザー光を吸収する物質がある場合には、試料液量が光を吸収し輻射緩和する分を除いたエネルギーはすべて熱エネルギーとして溶媒中に放出され温度上昇が起こる。温度上昇の空間分布について考えると、レーザー光の強度分布と熱拡散によって、レーザーの光軸周りには高い温度分布勾配が形成され、水などの液体の場合、屈折率は温度上昇により下がるため、レーザー光軸の中心ほど屈折率が低く、周辺部ほど屈折率の高い状態が形成される。この屈折率分布は光学的には凹レンズと等価であり、熱レンズと呼ばれる。熱レンズの度は発生した熱量、すなわち試料の量・濃度に比例するため、熱レンズの度の測定から試料の定量が可能となる。実際の測定では、励起光を変調し、プローブ光の光量変化を同期検出する。(図 5)

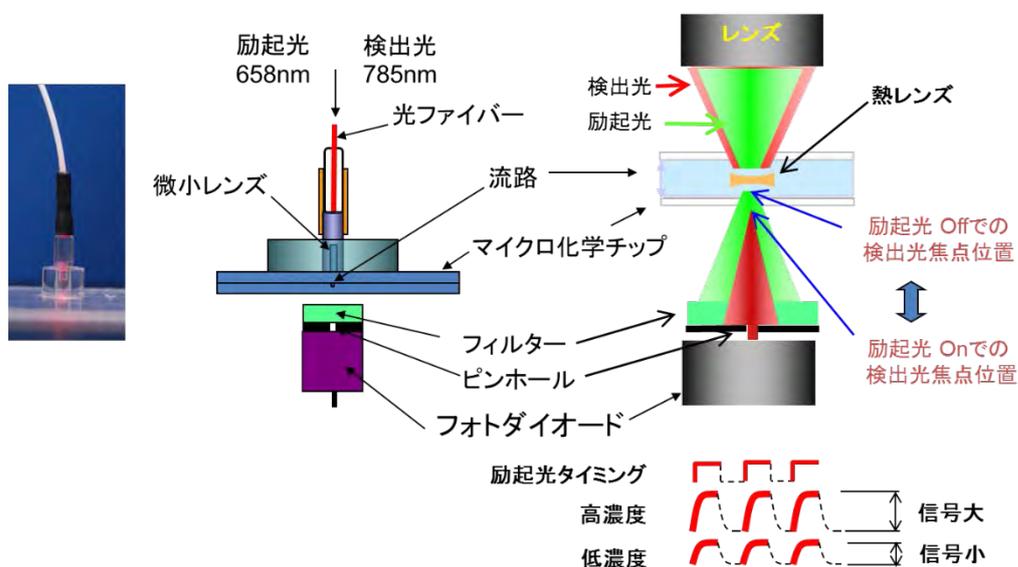


図 5 熱レンズ顕微鏡の構造

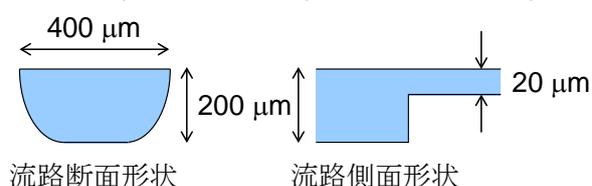
2. 反応部と装置の構造

(反応部・送液部)

- ・ シリンジポンプ
 マイクロシリンジ (250 μ L) 吸引吐出速度：1~800 μ L/分
 検体および試薬を吸引/排出する
- ・ インジェクター
 駆動速度 50~800mm/分
 試薬/検体/ビーズを吸引導入する
- ・ サンプル・試薬ステージ 20穴
 試薬/検体/ビーズ分散液をセットする
- ・ マイクロ流体チップ

ガラス製、30 \times 70mm

流路幅 400 μ m、深さ 200 μ m、ダム深さ 20 μ m



(検出部)

熱レンズ検出器

励起光：658nm、半導体レーザー

検出光：785nm、半導体レーザー

検出下限 3 \times 10⁻⁸Abs. (Ni 錯体水溶液を試料として用いたとき)

(制御部 ソフトウェア含む)

自動送液、自動測定 (検体数 12 検体)

PC 制御 (微量検体 ELISA 制御用ソフト)

【一般的な評価項目】

標準物質に関する検討

作成方法・使用方法

検量線作成用の標準溶液の濃度範囲

CRP 測定における検量線の濃度範囲としては、以下（表 1）を参考とした。検量線作成用の標準品として、組換え型ヒト C 反応性蛋白（rCRP、オリエンタル酵母、濃度 1.0mg/mL）を 0.1～32 μ g/mL の濃度に希釈して使用した。20 μ g/mL を超えると中程度以上の炎症と検討されるためである。標準溶液として作製する濃度は、0.1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL、4 μ g/mL、8 μ g/mL、16 μ g/mL、32 μ g/mL とした。

表 1 CRP 値とリスクの関係

リスク	CRP値 (μ g/mL)
一般的な基準値の範囲	3.0
軽い炎症などが検討される範囲	4.0～9.0
中程度の炎症などが検討される範囲	10～20
中程度以上の炎症が検討される範囲	20～

固相化方法に関する検討

抗体固定化法（条件検討）

できるだけ多くの抗体を吸着させることによって、ごく少量の抗原でも捉えられるようになる。したがって、抗体の種類に適した固相化方法の条件検討が必要である。

CRP 測定における固相化方法は以下の通り。

ストレプトアビジン化ビーズへの吸着

固相化抗体をビオチン化することでアビジン-ビオチン結合により、希薄濃度の抗体でも十分な固相化密度が得られるが、検体にビオチンが含まれる場合、ビオチンを前もって除く必要がある。

- (1)ビオチン化キット（同仁化学研究所 Biotinylation Kit）により、ビオチン化抗体を作製
- (2)ストレプトアビジンビーズの分散液（25%）1mL に、ビオチン化抗体（抗 CRP 抗体濃度を 0.32 μ g/mL、0.64 μ g/mL、1.25 μ g/mL、2.5 μ g/mL、5 μ g/mL とする）を加えて攪拌し、冷蔵庫で 24 時間以上静置。
- (3)(2)懸濁液をカラム処理し、1%BSA/PBS にて洗浄する。
- (4)カラムからビオチン化抗体-ストレプトアビジンビーズを 1%BSA/PBS 加えて取り出し、静置し、上澄みを除去。50%シュークロース/1%BSA/PBS を加え全体を 1mL とする。
- (5)作製したビーズをそれぞれチップ内に導入し、HRP 標識抗マウス IgG (ECL 社 from sheep) にて信号値を評価する。

以下に固相化用の抗体濃度の検討結果を示す。（図 6）

抗 CRP 抗体濃度

5 μ g/mL 2.5 μ g/mL 1.25 μ g/mL 0.64 μ g/mL 0.32 μ g/mL

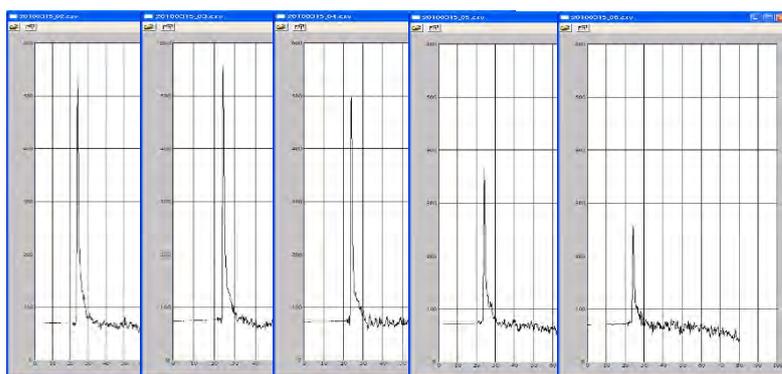


図 6 固相化条件検討

これにより、固相化最適濃度は 2.5 μ g/mL であることが分かった。

操作機能と性能に関する検討

今回、微量検体量を分かりやすい値として 1.0 μ L と定義する。一般的な検体量の装置開発と同様に、微量検体 1.0 μ L での装置や試薬の性能評価について検討が必要となる。

1. サンプル注入精度

微量検体 ELISA はプログラムにより、送液、測定（検体数 12 検体まで）を自動制御しており、微量検体測定のためには、チップ内に導入される試薬や検体の体積の再現性が極めて重要となる。そのため、インジェクターノズルの注入量の再現性について検討した。ニッケルフタロシアニン水溶液（ 10^{-4} M）を検体として、プログラムで、注入量を 1.0 μ L、2.0 μ L、3.0 μ L、5.0 μ L、10 μ L、20 μ L として設定し、それぞれ 5 回ずつ流したときのシグナル面積値と再現性について評価した結果を図 7 に示す。注入量とシグナル面積の相関係数 $R^2=0.9999$ 、回帰式は $y=22005x-9741.2$ となった。さらに、注入量を 5.0 μ L としたときのシグナル面積値を 5.0 μ L とし、各注入量のシグナル面積値から相対値を計算した。その結果、各シグナル面積値は相対値で 1.0 μ L、1.9 μ L、2.9 μ L、5.0 μ L（リファレンス）、9.9 μ L、20 μ L となった。また、注入精度（CV）は、2.2%、1.3%、0.9%、0.3%、0.4%、0.4%となり、いずれも良好な数値であった。（表 2）

以上により、1.0 μ L でも十分な注入精度を有し、微量検体の測定のための性能を確保できていることを確認した。

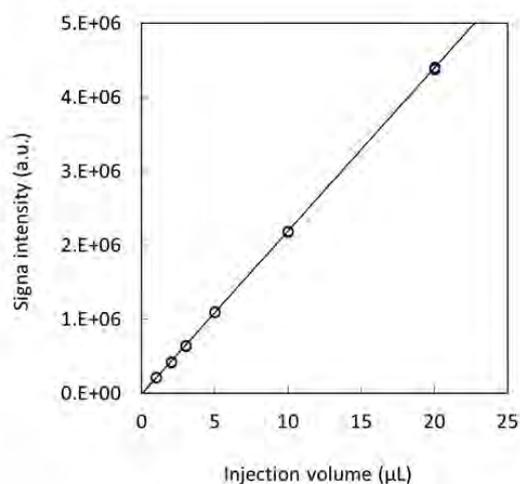


図 7 注入量と信号値

表 2 注入量と信号値 (Ni フタロシアニン 10⁻⁴M)

Injection volume (μL)	Mean value of signal area (-)	SD (-)	CV (%)	Relative value (uL)
1	2.17×10 ⁵	4.9×10 ³	2.2	1.0
2	4.25×10 ⁵	5.5×10 ³	1.3	1.9
3	6.43×10 ⁵	5.7×10 ³	0.9	2.9
5	1.10×10 ⁶	3.2×10 ³	0.3	5.0
10	2.19×10 ⁶	7.7×10 ³	0.4	9.9
20	4.39×10 ⁶	1.6×10 ⁴	0.4	20.0

2. 検出感度 (LOD・LOQ) の検討

(1) 標準品

測定対象とするマーカーの測定領域において十分な感度を有することを確認する必要がある。そこで、標準品を用いて、LOD と LOQ について検討した。標準品を段階希釈し、緩衝液をブランクとして各濃度 5 回ずつ測定した結果を図 8 に示す。相関係数 $R^2=0.8338$ 、回帰式 $y=82.671x+8.7309$ 、ブランクの標準偏差 (SD) は 1.1 であった。LOD は、標準偏差と検量線の傾きに基づく方法の基準に基づいて、以下のように定義されている。

$$LOD=3.3\sigma/a$$

ここで、 σ はブランクの標準偏差 SD、 a は検出限界付近の検量線の傾きを現す。測定結果から、 $\sigma=1.1$ 、傾き $a=82.67$ より、LOD は、0.044 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と求められた。

また、同様に、LOQ は次式により定義されている。

$$LOQ=10\sigma/a$$

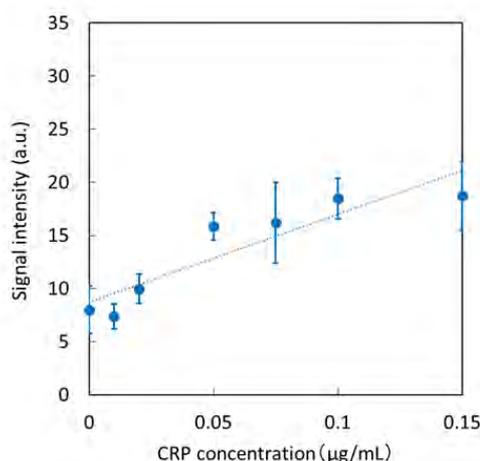


図 8 標準品の検量線 (検出限界付近)

これより、LOQ は 0.133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と求められ、装置の性能として十分な検出感度を有することを確認

認した。なお、CRP 値による冠動脈疾患の予知因子や新生児の感染症早期診断のための高感度 CRP 測定として、アメリカ食品医薬局 (FDA) が定めている条件は、LOD が $0.150\mu\text{g/mL}$ 以下であり、今回求めた LOD はこの条件を満たしていることが分かった。

(2)患者血清

次に、患者検体について LOD と LOQ を検討した。中値の患者血清 (従来法による濃度既知) を段階希釈し、緩衝液をブランクとして、5 回ずつ測定した結果を図 9 に示す。相関係数 $R^2=0.9137$ 、回帰式は $y=120.97x+10.901$ 、ブランクの $SD=1.6$ となった。標準品の場合と同様に、測定結果から、 $\sigma=1.6$ 、傾き $a=120.97$ より、LOD は、 $0.044\mu\text{g/mL}$ と求められた。また、LOQ は同様に $0.132\mu\text{g/mL}$ と求められた。

標準品の LOD、LOQ はそれぞれ $0.044\mu\text{g/mL}$ 、 $0.133\mu\text{g/mL}$ であることから、患者検体でも標準品とほぼ同じ値が得られることを確認した。なお、患者検体の測定においても、高感度 CRP 測定として、FDA が定めている、検出限界 $0.150\mu\text{g/mL}$ 以下の条件を満たしている。

以上の検討により、微量の患者検体の採血部位依存性を評価するための十分な検出感度を有していることを確認した。

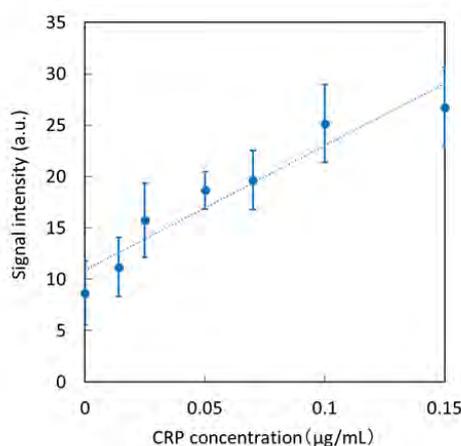


図 9 患者血清の検量線 (検出限界付近)

3. 再現性試験 (同時再現性、日差再現性)

複数の患者検体を測定することを考慮し、微量検体測定での装置と分析プロセスの再現性についても検討しておく必要がある。

① 同時再現性

初めに、標準品 $0.1\mu\text{g/mL}$ 、 $0.5\mu\text{g/mL}$ 、 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $4\mu\text{g/mL}$ 、 $16\mu\text{g/mL}$ を、各 3 回ずつ連続測定した結果を表 3 に示す。

表 3 標準品の同時再現性 (n=3)

concentration ($\mu\text{g/mL}$)	mean value of signal intensity (—)	SD (—)	CV (%)
0.1	2.1×10^1	1.8	8.5
0.5	8.9×10^1	8.1	9.1
1	1.6×10^2	1.8	1.2
4	3.2×10^2	10.6	3.3
16	4.4×10^2	5.1	1.2

同時再現性 (CV) は、それぞれ 8.5%、9.1%、1.2%、3.3%、1.2%と良好であった。

②日差再現性

次に、血清 L コンセーラ I EX, II EX (日水製薬、精度管理用凍結プール血清、表示濃度 $3.7\mu\text{g/mL}$ 、 $20\mu\text{g/mL}$) を測定したときの再現性について検討した。

L コンセーラ I EX、II EX を小分けに分注して -20°C での凍結保存をおこない、これを使用ごとに溶かして測定する方法を 10 日間実施して、シグナル値より日差再現性 (CV) について評価した結果、それぞれ、2.8%、6.1%と良好であった。(表 4)

表 4 L コンセーラの再現性 (n=10)

	mean value of signal intensity (—)	SD (—)	CV (%)
L-Consela I EX	318.0	8.9	2.8
L-Consela II EX	448.6	27.4	6.1

以上の結果により、微量検体測定での日内および日差再現性は共に良好であることを確認した。

4. 正確性 (外部精度管理)

ELISA 法では外部検量線により目的物質の検体濃度を求める。既知濃度の標準物質を含む標準溶液を用いて、目的物質の測定値と標準物質の測定値との関係性により、目的物質の濃度を求めることができる。微量検体の測定で得られた濃度の妥当性を評価するために、外部精度管理物質を用いる必要がある。ここでの正確性の定義としては、値付けされた試料の真の濃度 (表示値) と測定値の真の値からの偏りの程度を示したものである。

そこで、精度管理用の凍結プール血清 L コンセーラ I EX、II EX を 10 回ずつ測定したときの測定値と表示値から正確性について評価した。結果を表 5 に示す。それぞれ、表示値に対する測定値は 105%、95%と求められ（許容範囲 80~120%）、良好な結果となった。

表 5 L コンセーラ測定値の正確性 (n=10)

	mean value of signal intensity (—)	SD (—)	CV (%)	certified value (μg/mL)	measured value (μg/mL)	Trueness (%)
L-Consela I EX	318.0	8.9	2.8	3.7	3.9	105
L-Consela II EX	448.6	27.4	6.1	20.0	18.9	95

外部精度管理物質を用いた標準溶液の検量線の評価は、日常の装置性能管理として必須である。

5. キャリーオーバー

重症度の異なる複数の患者検体を測定する場合、濃度範囲は比較的広範囲になると想定されるため、装置のキャリーオーバーについて検討しておく必要がある。そこで、緩衝液をブランクとして、標準品で、Blank→0.01μg/mL→0.5μg/mL→1000μg/mL（高濃度）→Blank→Blank、と連続的に、高濃度 CRP 測定に続く Blank 測定を実施した。

高濃度の測定後、アルカリ洗浄なしの通常洗浄の場合（図 10）と、1M アルカリ洗浄後（図 11）のシグナルの違いについて比較検討した。

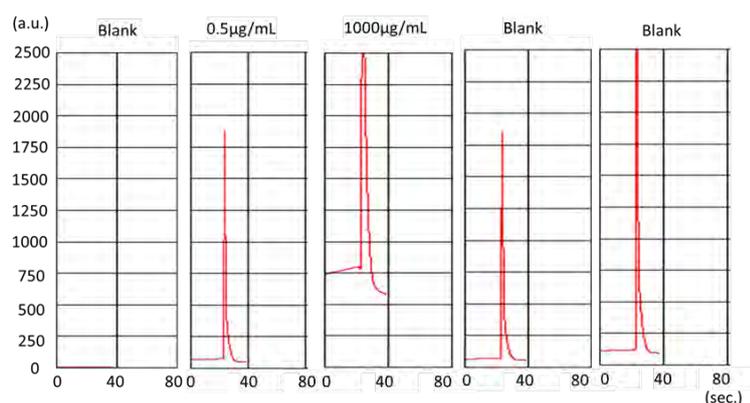


図 10 アルカリ洗浄なし（キャリア液による洗浄）

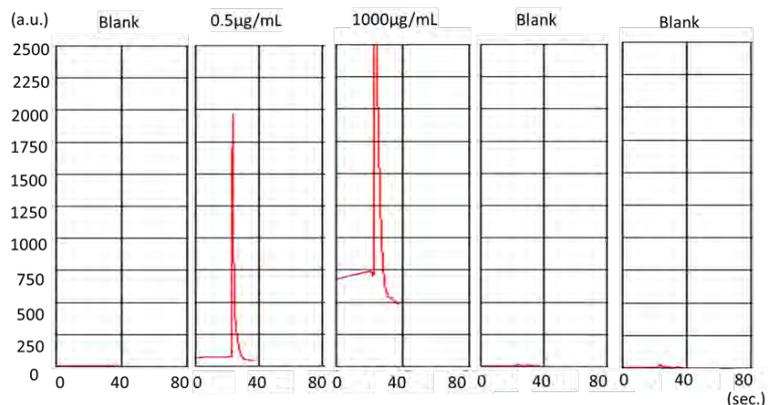


図 11 アルカリ洗浄後、ブロッキング

アルカリ洗浄なしの場合では、キャリーオーバーが確認されたが、1M アルカリ洗浄を実施した場合は、キャリーオーバーがほとんど確認されなかった。(1ppm 以下)

しかしながら、機器のメンテナンスの状態に応じて異なる可能性があるため、日常メンテナンス実施後と定期メンテナンス後(チューブやバルブの交換後)による影響度合いについても比較・検討が必要になると考える。

6. 共存物質の影響

測定時に、ELISA の一連の反応を妨害する可能性がある物質の影響度合いを評価する必要がある。そこで、患者から作製したプール血清およびプール血漿に、抱合型ビリルビン、遊離型ビリルビン、乳ビ、ヘモグロビンの各共存物質を添加した試料(プール血清(血漿):添加物=9:1)を作製した。添加物の濃度を変化させ、CRP 測定値を比較し、共存物質の影響度合いについて評価した。(図 12)

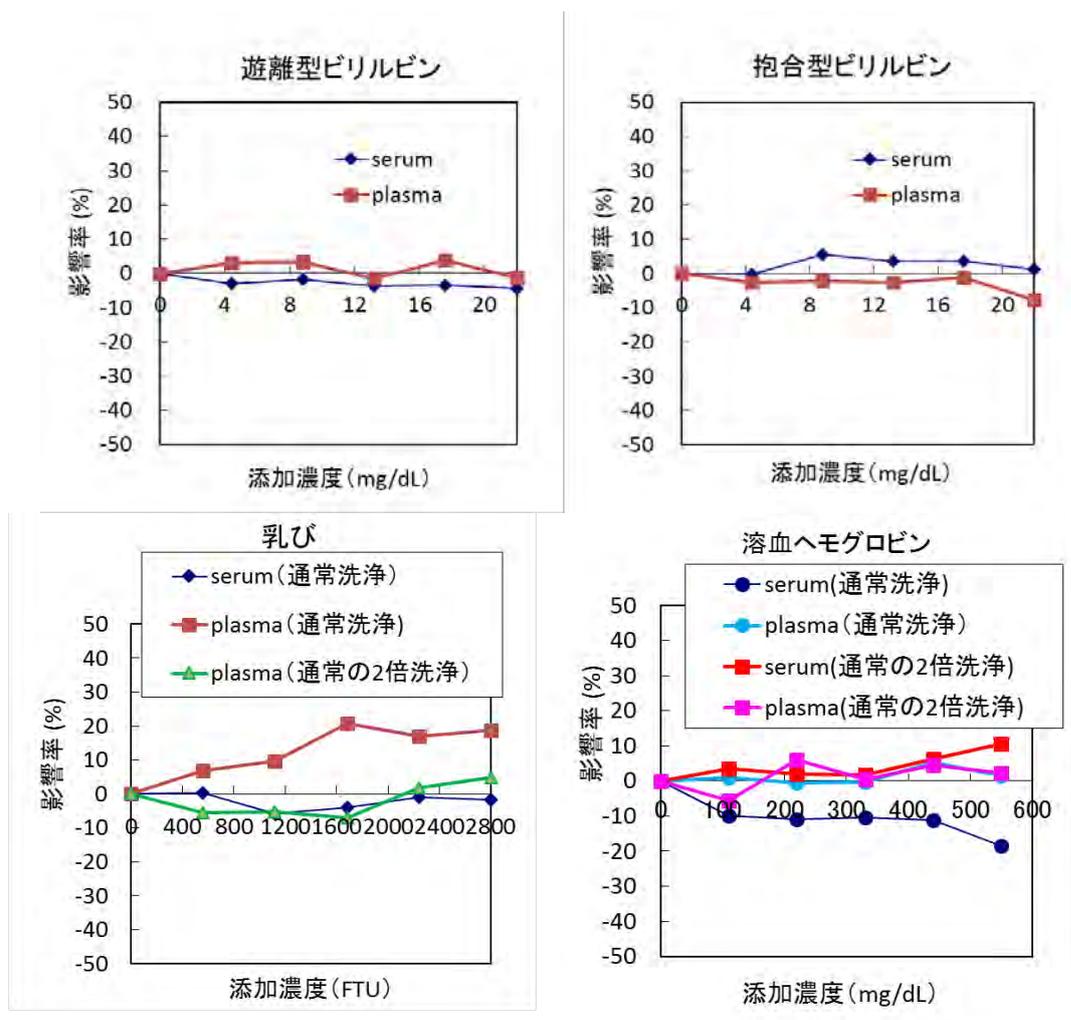


図 12 共存物質の影響

遊離型ビリルビン 22mg/dl、抱合型ビリルビン 22mg/dl まで影響は 10%未満となった。乳びは血清では 2800FTU まで影響は 10%未満であったが、血漿では、通常の洗浄量では影響率が高くなったため抗原抗体反応および酵素反応の際の洗浄量を 20 μ L から 2 倍量の 40 μ L に増やしたところ、影響率は 10%未満に抑えることができた。また、溶血ヘモグロビンについても、550mg/dL までの添加濃度において従来の洗浄量 20 μ L の場合では影響率が 10%を超えたのに対し、洗浄量を 2 倍量としたところ、影響率は 10%以下となった。したがって、検体中に、目視で判断不可能な濃度で溶血や乳びが共存している可能性を考慮し、十分な洗浄量にて実施することとする。

7. 希釈直線性

濃度既知の検体を段階的に希釈し、希釈倍率と測定値が比例関係にある事を確認するため、CRP濃度で中値（測定値 2.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、高値（測定値 35.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、43.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の患者検体を 5 段階希釈し、各希釈率に対し 5 回ずつ測定した。（図 13）

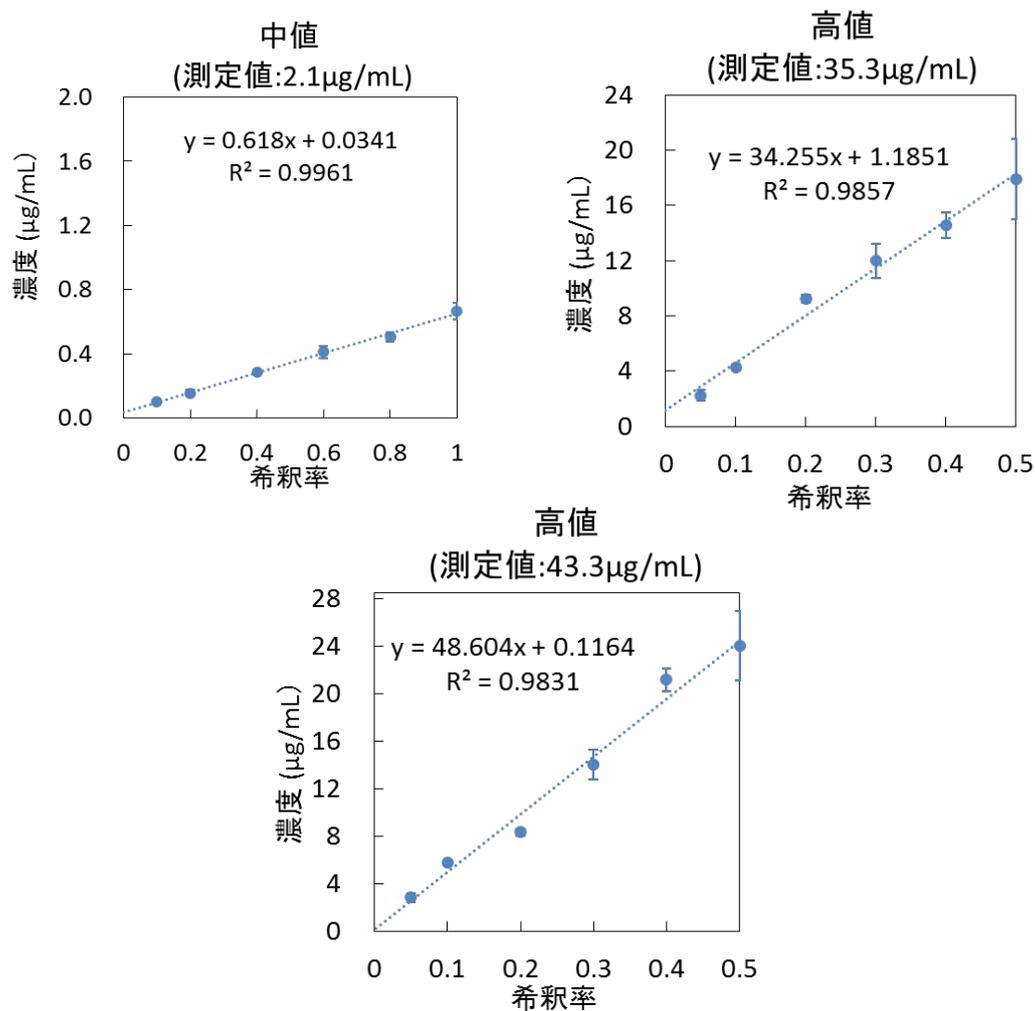


図 13 希釈直線性

中値、高値いずれの濃度でも希釈倍率と測定値は比例関係にあることを確認した。

8. ダイナミックレンジ

作製した標準品(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、256 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を各3回ずつ測定した結果を図14に示す。

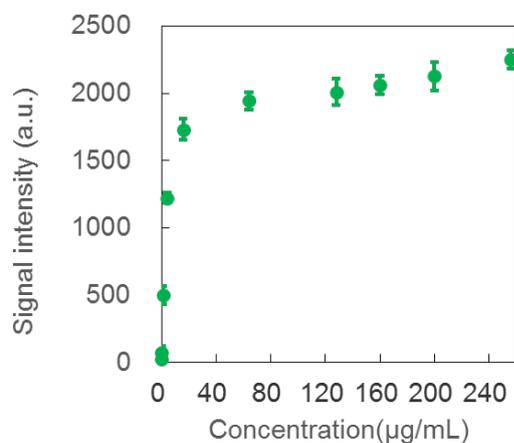


図14 検量線 (0~256 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

いずれの濃度においても CV は 10%未満となり、再現性の良い検量線が得られた。また 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では検量線が横ばいになる傾向にあることから、今回の条件下での測定レンジは、0.133 (定量限界) ~256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

9. 添加回収試験

濃度既知の患者血清（1%BSA/PBS で 5 倍希釈）に 3 濃度の標準 CRP（0.5 μ g/mL、4.0 μ g/mL、32 μ g/mL）を量比で、5 倍希釈患者血清：標準 CRP=9:1 となるように添加し、回収濃度から回収率を求めた結果を表 6 に示す。なお、算出には全て同一検量線を用いた。

表 6 添加回収試験

検体	基準濃度 (μ g/mL)	添加濃度 (μ g/mL)	測定値 (μ g/mL)	理論濃度 (μ g/mL)	回収率 (%)
A (3.1 μ g/mL)	0.56	0.5	0.95	1.06	89.8
		4.0	4.17	4.56	91.5
		32.0	29.2	32.6	89.5
B (1.8 μ g/mL)	0.32	0.5	0.88	0.82	106.4
		4	3.84	4.32	88.8
		32	32.9	32.3	101.8
C (33.4 μ g/mL)	6.0	0.5	8.66	6.51	133.3
		4	9.69	10.1	96.6
		32	37.3	38.0	98.1
D (1.9 μ g/mL)	0.34	0.5	0.92	0.84	109.3
		4	5.20	4.34	119.8
		32	25.6	32.3	79.3
E (74.9 μ g/mL)	13.5	0.5	16.5	14.0	118.1
		4	16.8	17.5	95.9
		32	36.6	45.5	80.5
F (22.6 μ g/mL)	4.1	0.5	4.7	4.6	101.8
		4	9.2	8.1	113.7
		32	32.3	36.1	89.6

回収率は全ての検体で 79.3~133.3%となり（許容範囲 80-120%）、許容範囲外となる 2 濃度を除き、良好な結果が得られた。

【微量検体の測定における評価項目】

測定条件に関する検討

抗原抗体反応時の流量の検討

マイクロフレイディクスでの微量(1.0 μ L)の検体測定の場合は、抗原抗体反応の流量、すなわち流れの特性が測定値へ影響を与える可能性がある。そのため、標準品を用いて、抗原抗体反応の流量の検討をおこなった。微量検体(1.0 μ L)での流量を、2.0 μ L/min.、5.0 μ L/min.、10 μ L/min. (反応時間はそれぞれ、30 秒、12 秒、6 秒) として各 5 回ずつ測定し、シグナル値の再現性 (CV) を評価した結果を図 15 に示す

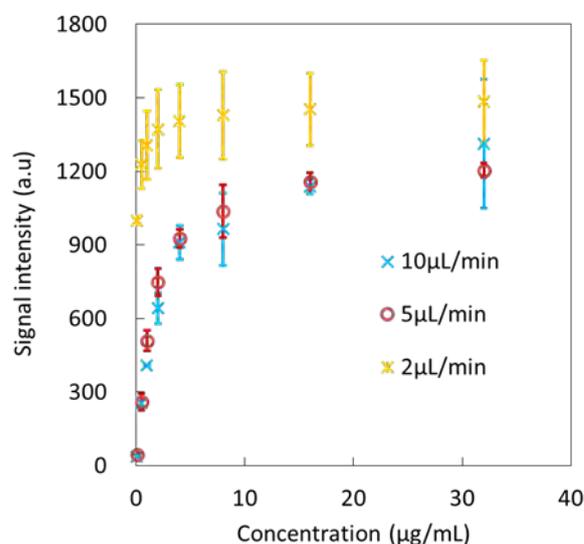


図 15 抗原抗体反応時の流量検討

各流速でのシグナル値の CV 平均値はそれぞれ、9.6%、8.1%、8.5%となり、CV 平均値が最も小さいのは流速 5.0 μ L/min.であった。よって、本研究における測定条件は、検体の注入量 1.0 μ L、抗原抗体反応の流量 5.0 μ L/min.とした。

マイクロフレイディクスによる微量検体での ELISA 分析には、抗原抗体反応における流量などの影響を考慮したうえで、条件検討をする必要があることを確認した。

保存条件に関する検討

① 保存温度についての検討

検量線を作成するための標準溶液の保存方法についての検討が必要となる。はじめに、保存温度の違いによる測定値への影響について（4℃、-20℃）評価した。作製した標準品、0.1μg/mL、0.5μg/mL、1μg/mL、2μg/mL、4μg/mL、8μg/mL、16μg/mL、32μg/mL をそれぞれ4℃と-20℃で保存した。4℃保存には1.5mLの容量の蛋白質低吸着チューブに1.0mL入れ、-20℃保存には0.5mLの容量の蛋白質低吸着チューブを使用し、測定の際に融解して使用した。作製後、約12ヶ月経過した標準品を微量検体ELISAにて測定した結果を図16に示す。

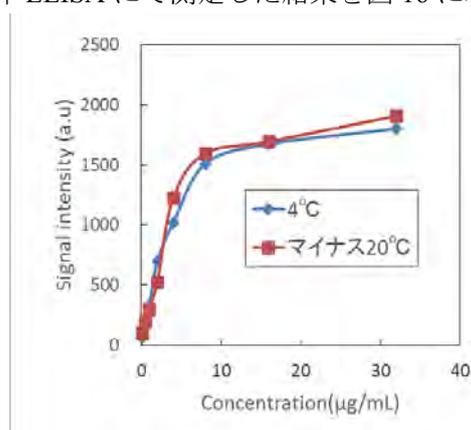


図16 保存温度と測定値（保存期間12か月）

この結果により、容量1.5mLの蛋白質低吸着チューブで1.0mL保存した場合、4℃保存でも-20℃保存と変わらず、12カ月間安定して保存が可能であることが分かった。

② 保存容器と保存液量の検討

さらに、標準品（濃度32μg/mL）の4℃における保存容器と保存液量の違いによる測定値への影響について評価した結果を図17に示す。保存容器に蛋白質低吸着チューブを用いた場合は、保存液量50μLでも4か月間安定しているのに対し、未処理の通常容器を用いた場合は、14日間で信号値の低下がみられた。原因として、容器内壁への吸着の可能性が考えられる。

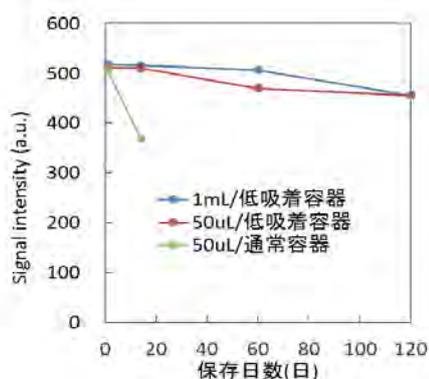


図17 容器の素材と保存液量と保存日数（120日保存）

③ 保存液量と長期保存安定性についての検討

また、標準品（0.1～32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）について、蛋白質低吸着チューブを使用し、保存液量をそれぞれ 50 μL 、1mL としたときの長期保存安定性について評価した。結果を図 18 に示す。これより、蛋白質低吸着チューブを用いた場合には、液量 50 μL で液量 1mL とほぼ同じ保存安定性を 13 ヶ月保持することを確認した。

以上の結果により、標準溶液の保存には、蛋白低吸着チューブを使用することが望ましく、長期保存の際の最低液量は 50 μL とする。保存液量によって安定性が異なる可能性があるため、試用期間を加味した管理が必要となる。特に、保存液量が少量の場合には、容器の内壁への吸着の問題があるため、容器の内壁の素材と保存方法について長期保存安定性を評価する必要がある。

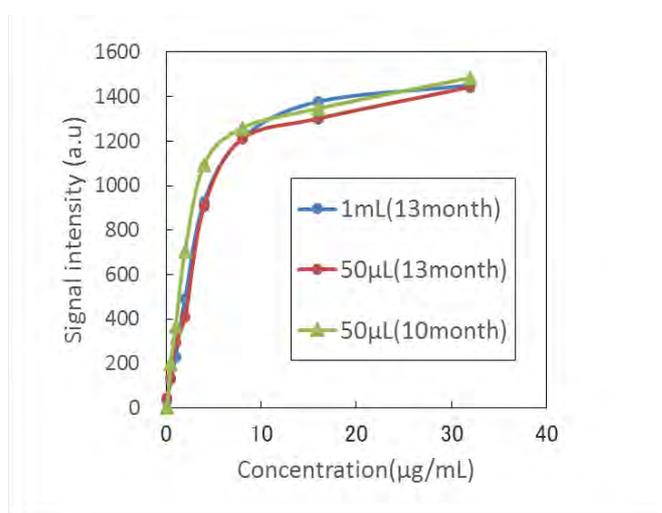
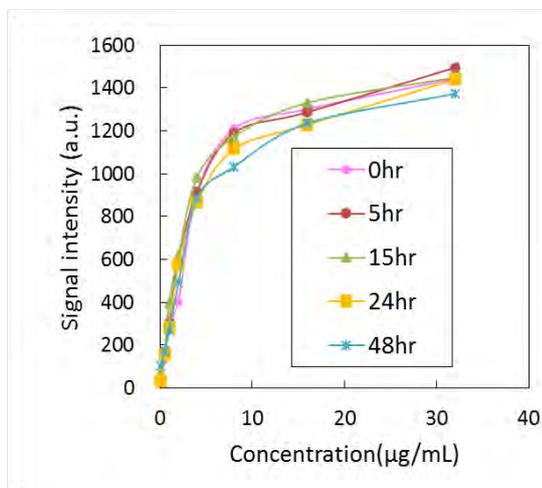


図 18 保存液量と保存安定性（保存期間 13 か月後）

④ 微量保存での室温（25 $^{\circ}\text{C}$ ）における保存安定性

リスク管理の一部として、室温（25 $^{\circ}\text{C}$ ）にさらした場合の標準品の安定性について検討した。蛋白質低吸着チューブに標準品 0.1～32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をそれぞれ 40 μL ずつ入れ、0、5、15、24、48 時間経過ごとに測定した結果を図 19 に示す。さらに、直後（0 時間）と 24 時間経過後の測定値に対して有意差検定をおこなったところ、有意差は認められなかった。（表 7）この結果により、蛋白低吸着チューブに保存した場合、標準品は液量 40 μL で、24 時間、25 $^{\circ}\text{C}$ の条件下で比較的安定しているが、48 時間後には信号値の低下が起ることを確認した。したがって、標準品を室温に放置した場合でも、24 時間以内であれば信頼できる測定値が得られると考える。

表 7 標準品 25°Cでの保存安定性



Concentration (µg/mL)	0hr (a.u.)	24hr (a.u.)
0.1	46.5	31.0
0.5	135.7	157.2
1.0	295.2	279.8
2.0	407.3	578.0
4.0	905.7	866.8
8.0	1209.1	1115.1
16.0	1302.0	1229.0
32.0	1443.3	1440.2

図 19 標準品 (25°C保存、液量 40µL) の保存安定性

以上、標準物質に対する検討結果により、将来的に在宅で使用する場合においても、液量や容器内部の素材などに考慮し、簡便な取り扱いが可能となる標準品の保存方法、測定の際の装置への導入方法などの開発に役立てることが出来ると思われる。

検体調整および測定条件に関する検討

1. 患者実検体の測定条件の検討

患者血清を測定し、従来法（ラテックス免疫比濁法）による測定値と比較した。

(図 20)

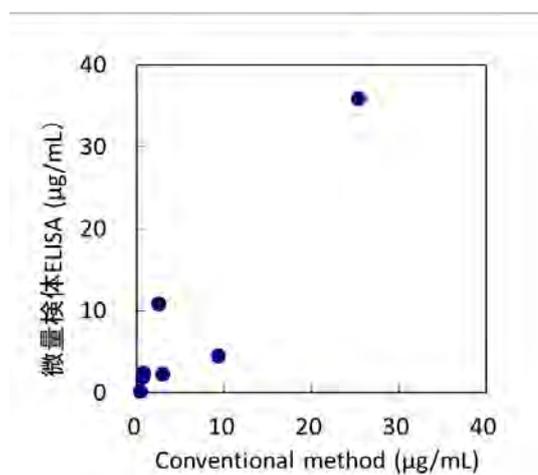


図 20 患者血清の従来法と微量検体 ELISA（希釈なし）測定値

その結果、患者血清をそのまま測定した（希釈なしの）場合には、従来法との相関が低い結果となった。この要因として、今回の標準品や精度管理用プール血清での検討より、患者検体の成分による影響ではないことを確認しているため、患者血清の場合、検体ごとに異なる粘度などの液性の違いなどが反応や測定系に影響を及ぼし、正確な測定値が得られないことが推測される。

そこで、液性の違いによる影響をなるべく小さくするため、緩衝液で希釈することを検討した。患者血清を 2 倍希釈、5 倍希釈、10 倍希釈としたときの測定値と従来法による測定値との比較を図 21 に示す。

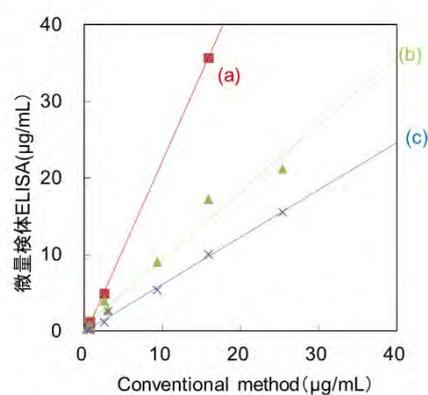


図 21 従来法と微量検体 ELISA 測定値 (a) 2 倍希釈 (b) 5 倍希釈 (c) 10 倍希釈

これより、2 倍希釈の場合は、相関係数 $R^2=0.9999$ 、回帰式 $y=2.2977x-0.8397$ となり、従来法と比較して測定値が高めとなる傾向にあった。また、10 倍希釈の場合は、相関係数 $R^2=0.9955$ 、回帰式 $y=0.6163x-0.0532$ となり、低濃度領域で定量性が劣る。5 倍希釈の場合は、相関係数 $R^2=0.9734$ 、回帰式 $y=0.8791x+0.5939$ となり、従来法と最も相関性が良い結果となった。

結論として、微量検体 ELISA による患者血清の CRP 測定の際には、希釈をしない場合は検体の液性の違いによるばらつきが生じるが、希釈をすることにより個体差によるばらつきが小さくなることが分かった。さらに、2 倍希釈では個体差による液性の違いがまだみられるが、10 倍希釈では、低濃度領域の定量性が下がり、5 倍希釈の場合は低濃度領域でも従来法と良好な相関性が得られた。したがって、マイクロフルイディクスでの微量検体での ELISA 測定においては、検体ごとの液性を揃えることで信頼性のある測定値を得られることが立証できた。

2. 従来法との相関性

以上の結果をふまえ、実際の患者血清 27 検体を緩衝液で 5 倍希釈し、微量検体 ELISA による測定値と、従来法による測定値の相関性について検討をおこなった結果を図 22 に示す。

従来法との相関性は、相関係数 $R^2=0.9314$ 、回帰式 $y=1.0009x+0.3768$ となり、微量 ($1.0\mu\text{L}$) の患者血清でも良好な相関性が得られた。

以上から、検体ごとの液性のばらつきを希釈により抑制することができ、微量検体 ELISA は $1.0\mu\text{L}$ の微量の患者検体に対しても高精度で実用的な装置であることを確認した。

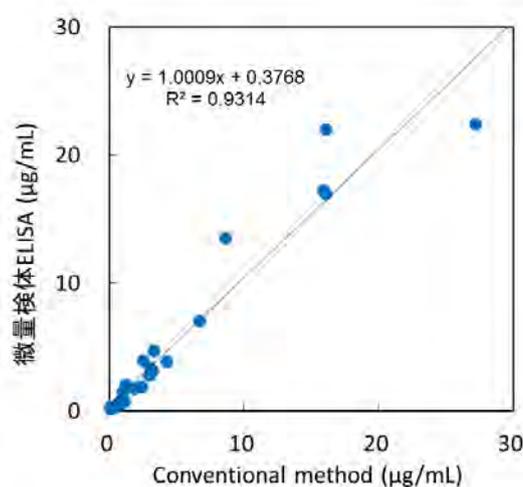


図 22 従来法と微量検体 ELISA 法 (n=27)

3. 血清、血漿、全血の測定値評価

患者検体を採血後、直ちに、全血、血清、血漿用の採血管に入れ転倒混和し、血清用、血漿用については 1700G で 10 分間遠心した。緩衝液 1%BSA/PBS にてそれぞれ 5 倍希釈した後、採血から 1 時間以内に測定を行った。結果を以下に示す。(表 8 および図 23)

採血管

全血用：3.13%クエン酸 Na 水溶液 (採血量：1.8mL)
 血清用：凝固促進剤 (採血量：5mL)
 血漿用：EDTA-2K (採血量：2mL)

表 8 全血、血清、血漿の測定値

患者 sample		μELISA (μg/mL)	従来法 (μg/mL)
A	serum	16.9	16.1
	plasma	16.4	
	whole blood	11.8	
B	serum	51.9	69.9
	plasma	44.9	
	Whole blood	22.7	
C	serum	341.0	482
	plasma	368.0	
	Whole blood	158.0	
D	serum	31.8	38.5
	plasma	27.2	
	Whole blood	13.2	
E	serum	4.7	3.3
	plasma	4.4	
	Whole blood	1.2	
F	serum	0.5	0.5
	plasma	0.5	
	Whole blood	0.2	
G	serum	1.2	1.3
	plasma	1.3	
	Whole blood	0.7	

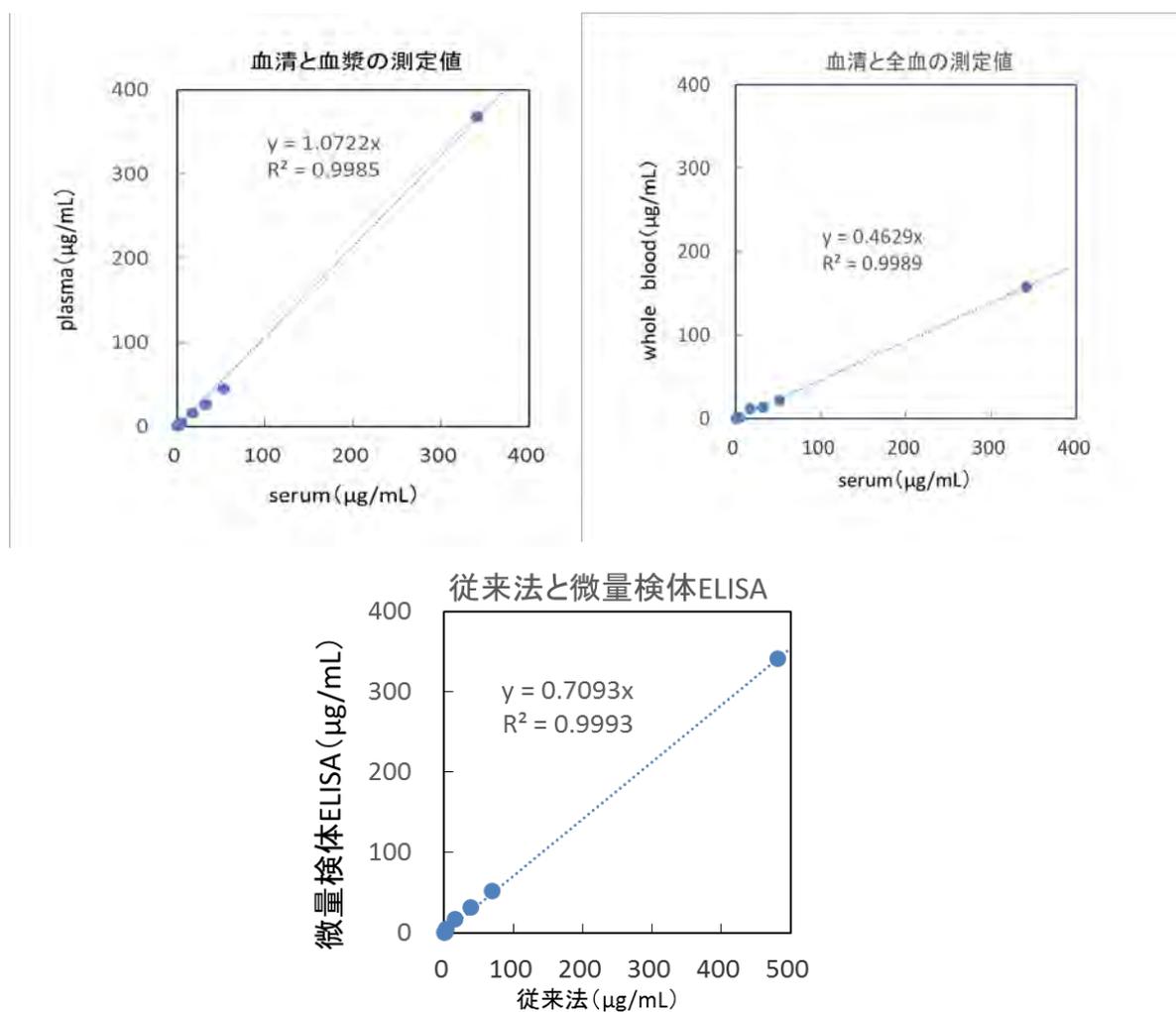


図 23 全血・血漿・血清の測定値比較

以上の結果より、全血では血漿と血清に比べ、測定値が下がる傾向にある。血漿と血清はほぼ同じ測定値が得られた。したがって、微量測定の際には、前処理をし、血清または血漿にておこなうこととする。しかしながら、血漿検体を扱う際には、凍結融解後にフィブリンが発生する可能性があるため、取り扱いに注意が必要である。

4. 微量採血管の血液量の違いによる測定値への影響

あらかじめ採血した全血（採血管：EDTA-2K）を、微量採血管（BD マイクロチューブ凝固促進剤入り）に 20 μ L、30 μ L、40 μ L、50 μ L 入れ、10 分遠心した後、血清とし、緩衝液にて 5 倍希釈後、測定を比較した結果を表 9 に示す。この結果により、微量採血管への採血量は最低 30 μ L 必要であることを確認した。ただし、微量採血管の種類に依存するため、メーカーごとの検討は必須である。

表 9 微量採血管の血液量と測定値

血液量 (μ L)	20 (μ L)	30 (μ L)	40 (μ L)	50 (μ L)	通常量 (1mL)
A	1.0	1.1	1.2	1.2	1.2
B	35.0	35.2	34.4	31.5	31.4
C	unmeasurable	2.1	2.2	1.8	2.2
D	unmeasurable	1.6	1.9	1.8	2.2

5.採血部位依存性

(1)腕（通常量）と指（微量）からの測定値比較

将来、在宅での使用において微量の自己採血をすることを考慮し、採血部位依存性について検討する必要がある。自己採血用の穿刺器具として、メディセーフファインタッチプロ（テルモ株式会社）を使用し、指からの微量採血（30~40 μ L程度）をした後、血清用の微量採血管（BD マイクロチューブ 凝固促進剤入り）に入れ、1700G、10分間遠心し、微量の血清検体を得た。全ての検体は緩衝液にて5倍に希釈した。腕（通常採血：採血量3mL以上）と指（微量採血）の微量検体ELISAによる測定値を表10に示す。この結果をもとに、有意差検定（t-検定：等分散を仮定した2標本による検定）を実施したところ、 $t(20)=2.0$ 、 $P=0.06 > 0.05$ となり、有意差は認められなかった。したがって、指から採血した微量血液により身体の状態を把握することが出来ることを確認した。なお、耳からの微量採血は困難であり、自己採血する箇所としては不向きであると考ええる。

表 10 採血部位依存性

患者	腕(1mL~) (μ g/mL)	指(微量) (μ g/mL)
A	0.5	0.8
B	1.7	2.2
C	1.2	1.4
D	3.1	2.5
E	1.1	1.0
F	1.3	1.1
G	31.4	29
H	14.5	14.5
I	47.0	49.2
J	18.3	17.0
K	36.5	40.5
L	50.2	43.6
M	4.2	5.9
N	37.8	38.3
O	24.4	30.1
P	2.23	1.5
Q	43.3	38.3
R	149.3	158.5
S	148	153
T	10.4	11.2

(2) 腕（通常採血量）の従来法による測定値と指（微量採血）の微量検体 ELISA による測定値比較

腕（通常採血：採血量 3mL 以上）の従来法による測定値、指（微量採血）の微量検体 ELISA による測定値を表 12 および図 24 に示す。この結果、非常に良好な相関性が得られたことから、微量検体 ELISA 装置は、指からの微量検体でも臨床用装置としての性能を十分に兼ね備えていることを確認した。

表 12 採血部位依存性（従来法と微量検体 ELISA）

患者	指(微量) ($\mu\text{g/mL}$)	従来法 ($\mu\text{g/mL}$)
A	0.8	0.5
B	2.2	1.9
C	1.4	1.3
D	2.5	2.9
E	1.0	0.9
F	1.1	1.0
G	29	33.4
H	14.5	18.0
I	49.2	37.6
J	17.0	16.4
K	40.5	40.1
L	43.6	40.0
M	5.9	6.5
N	38.3	43.3
O	30.1	22.6
P	1.5	3.3
Q	38.3	97.7
R	158.5	157.4
S	153	155.6
T	11.2	11.3

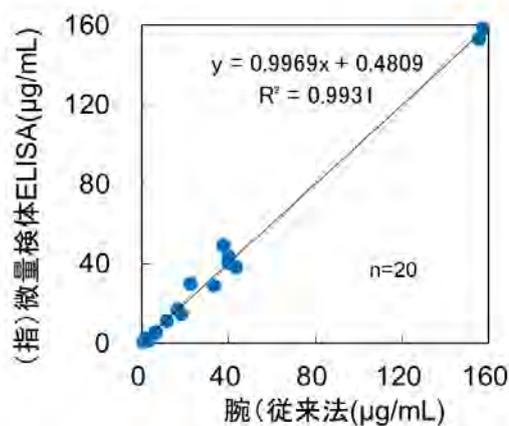


図 25 腕（従来法）と指（微量検体 ELISA）

6.患者実検体の保存安定性についての検討

患者実検体（19 検体）を遠心分離して血清とし、それぞれ、5 倍に希釈した直後の検体を検体 A とする。希釈後、24 時間-20℃にて凍結し、再融解した検体を検体 B とし、希釈後、25℃にて 24 時間保存した検体を検体 C、25℃で 3 日間保存した検体を D（B,C,D いずれも 保存容器は蛋白低吸着チューブ、液量は 50μL）として、東大病院測定値（従来法）との相関性について検討した結果を図 24、図 25、に示す。さらに、検体 A と検体 B、検体 A と検体 C の測定値の比較をそれぞれ表 11、12 に示す。有意差検定を実施したところ、いずれも有意差は認められなかった。

これにより、蛋白低吸着チューブを使用した場合、1 回の凍結融解では測定値にほとんど影響がないことが分かった。凍結融解を繰り返した場合などの検討は更に必要となる。また、25℃で保存した場合、3 日間後には希釈直後と比較して測定値に顕著な低下がみられるが、24 時間後の測定値は、若干低下するもののほとんど影響しないことが分かった。したがって、実検体を 5 倍に希釈後、室温に放置した場合でも、24 時間以内であれば、測定値に大幅に影響を与えることはないことが確認できた。ただし、測定対象とするマーカーによって保存安定性が異なるため、検討が必要である。

表 12 保存条件の異なる実検体の測定値
(A：希釈直後 B：希釈後、-20℃保存、再融解)

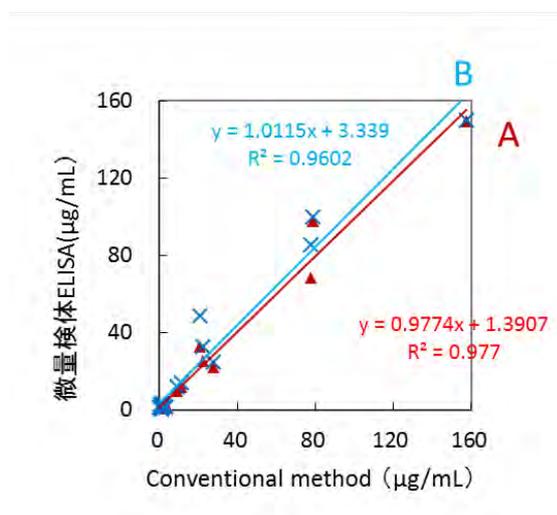


図 25 保存条件の異なる実検体の従来法と微量検体 ELISA 測定値

(A：希釈直後 B：希釈後、-20℃保存、再融解)

(A)	(B)	Conventional method
2.2	2.9	3.1
0.8	1.8	1.0
49.0	33.0	20.8
0.6	1.7	1.2
149.9	149.7	157.4
32.9	25.6	22.6
1.6	3.2	3.3
14.1	11.9	11.3
100.0	97.6	78.9
24.7	22.1	27.8
3.1	1.4	1.9
11.9	9.9	8.9
85.3	68.3	77.8
2.8	1.3	0.6
2.9	1.6	0.4
3.5	2.9	1.7
1.3	1.1	0.2
1.8	1.3	1.8
1.6	1.2	0.9

表 13 保存条件の異なる実検体の測定値
(A : 希釈直後 C : 希釈後 25℃保存、24 時間)

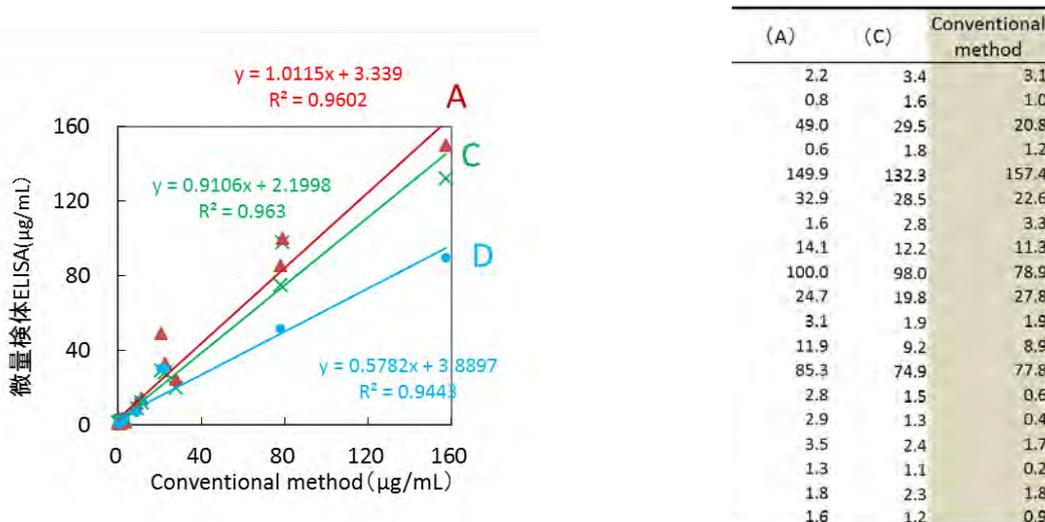


図 26 保存方法の異なる実検体の従来法と
微量検体 ELISA 測定値

(A : 希釈直後 C : 希釈後 25℃保存、24 時間 D : 希釈後 25℃保存、3 日間)

7.患者実検体の抗凝固剤による影響

患者検体をセラムチューブ、ヘパリンチューブ、EDTA-2K チューブ、EDTA-2Na チューブに採血し、それぞれ 3 回ずつ測定し、抗凝固剤の影響について検討した。セラムチューブの測定値を 100 としたときの各チューブの検体の測定値を求めた結果を図 26 に示す。これより、各抗凝固剤の影響は 10%未満であることがわかった。

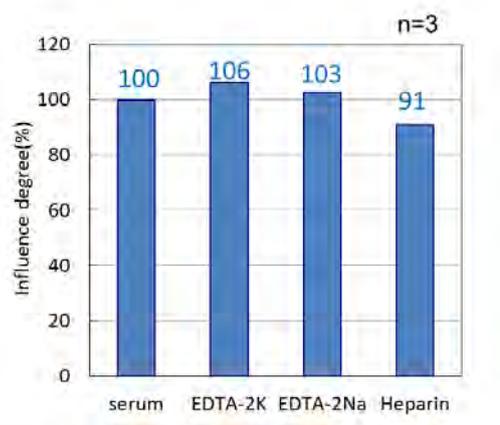


図 27 抗凝固剤の影響