

2. 2. 非競合 ELISA 法の不確かさ

2.2.1 誤差原因の追究

分析における個々の操作に伴う誤差を考察し、その中から測定値の誤差に大きく影響を与える操作をび、測定値の不確かさを表す式を誘導する。

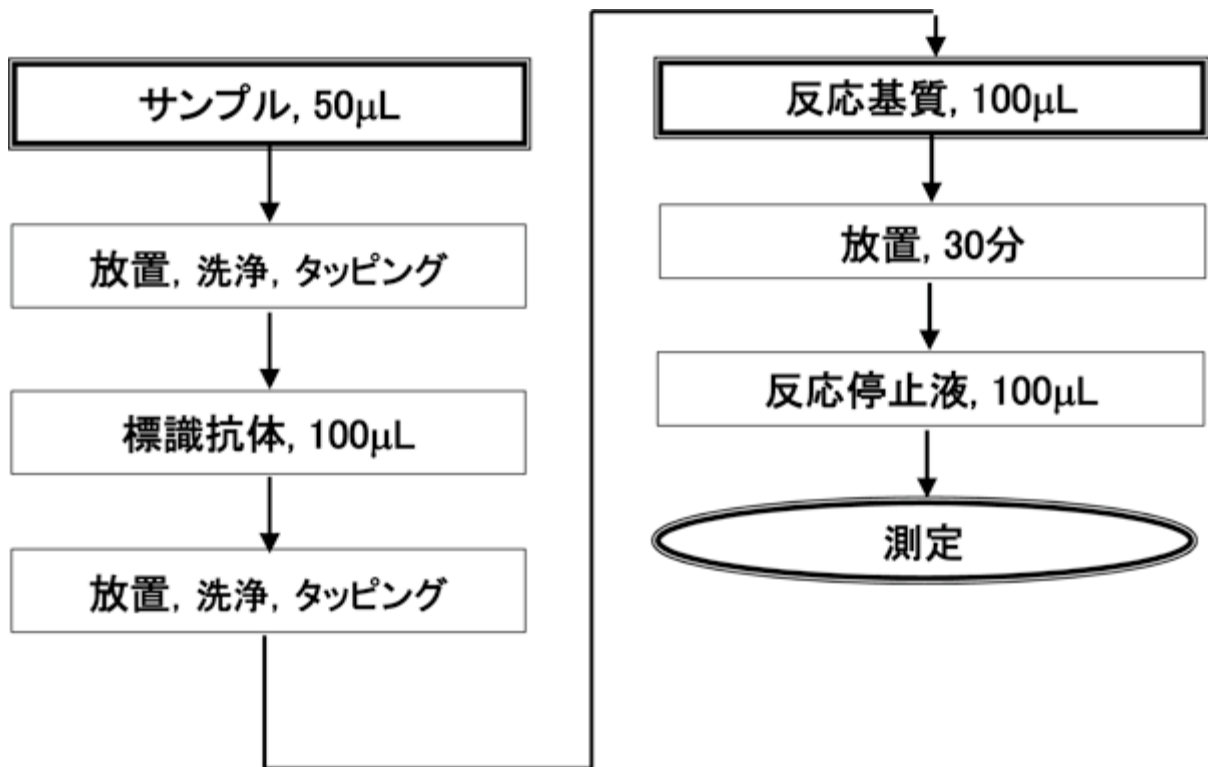


Figure 2 非競合 ELISA 法の測定手順

Fig.2 に、非競合（サンドウィッチ）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、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。

例えば、標識抗体は、サンプルに比べて過剰にあるので、そのピペットでの採取量のバラツキは、測定値の誤差（最終的にプレートに結合する標識抗体量の誤差）にほとんど影響しない。同一プレート上で、適切に操作すれば、ウェル間の放置時間のバラツキの影響も少ないだろう。一方、反応停止液の量は測定値に影響しない。これは、吸光度測定はウェルの鉛直線方向に行われるため、光路にある色素の分子数は、反応停止液の量とは無関係に一定だからである（Fig. 3 参照）。

測定は、96 穴プレートを用いて行われるため、ここで問題にしている不確かさは、ウェル間の測定値のバラツキに相当する。各ウェルには、僅かではあるが吸収があるため、この吸収の SD を考慮する必要がある。

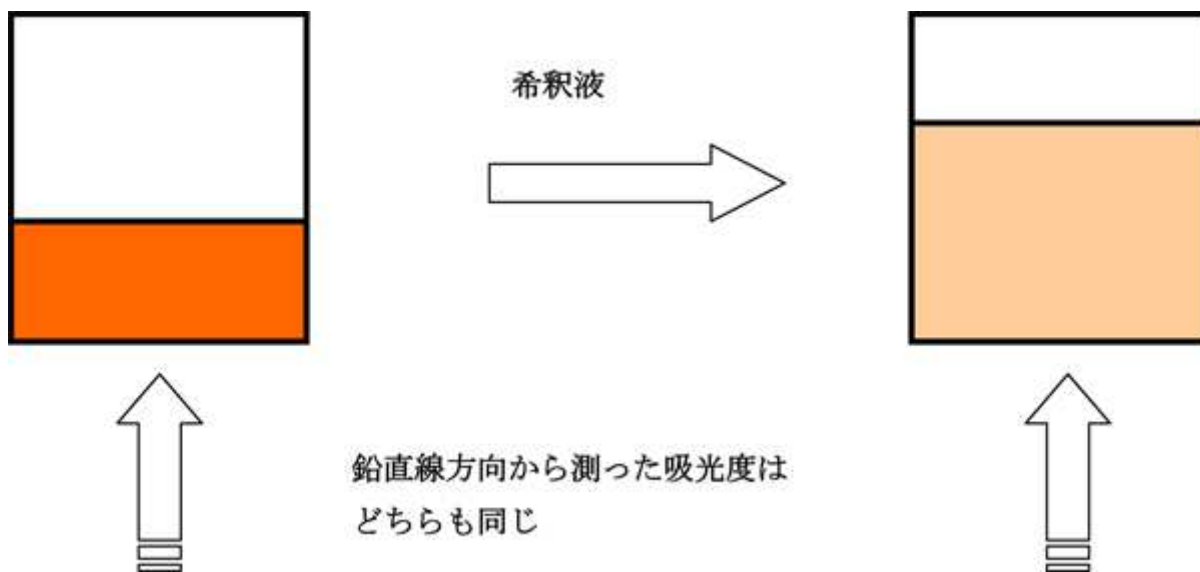


Figure 3 反応停止液量の影響

2.2 合成標準不確かさの推定

GUM によれば, 合成分散 [1]

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial x_i} \right]^2 u^2(x_i) \quad (\text{式 1})$$

の正の平方根が合成不確かさ $u_c(y)$ である。ここでは, x_i は互いに独立であると仮定している。GUM では, 式 1 を不確かさの伝播則と呼んでいる。

上の非競合 ELISA 分析において, y_0 を真の吸光度とすれば, 実験から求めた測定値 y は, 3 つの誤差の和が加わったものであると考えられる:

$$Y = Y_0 + Y_1 + Y_2 + Y_3$$

ただし,

y_1 : サンプルの採取量の誤差;

y_2 : 反応基質溶液の採取量の誤差;

y_3 : ウェルの吸収;

である。個々の操作の誤差が, 最終的な測定値に, 上の式のように伝播するのである。

これに式 1 と同じ操作（全微分）をすると、

測定値の分散 = y_1 の分散 + y_2 の分散 + y_3 の分散

となる。この様に、3 つの誤差、 y_1 、 y_2 、 y_3 は独立であると仮定すれば、全体の誤差は、それぞれの誤差の分散の和となる。

上の式を y_0 の 2 乗で割ると、相対分散として表せる、記号を変えて、非競合 ELISA 分析の不確かさを予測する式を次の様に記述する [4] :

$$\rho_T^2 = \rho_X^2 + \rho_S^2 + \left(\frac{\sigma_W}{f(X)} \right)^2$$

(式 2)

ただし、

ρ_T : 測定値の RSD;

ρ_X : 分析対象物質の注入量の 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、

$\rho_S = (\text{ピペットによる注入量の RSD}) \cdot (2/3)$;

σ_W : ウェル自体の吸光度の SD (ウェル間の吸光度の SD) ;

$f(X)$: 吸光度を表す検量線 (X は、分析対象物質の濃度) .

σ_W は標準偏差であるので、その濃度での分析対象物質の吸光度($f(x)$)で割って RSD に変換してある。標識抗体は、ウェルの底と側面に結合しているため、反応基質溶液の採取誤差の約 2/3 が、発色量の誤差になることが、理論的考察から導かれる。

以上の誘導から分かるように、式 2 は、GUM の定める合成標準不確かさである。右辺の量は、全て実験から求めることができる。 ρ_S 、 ρ_S はピペットで注入した水の重量の標準偏差から推定できる。 σ_W は、空のプレートがプレートリーダーで測定して求められる。

2.3 不確かさの予測式的実験的検証

Fig.4 は、非競合 ELISA 法の検量線 (左上) , 測定値の RSD vs 濃度のプロット (右上) , 検量線から推定した濃度の RSD のプロット (右下) を示す。●は 1 濃度につき 8 回の測定を行い、得られた吸光度の RSD 及び検量線により推定した分析対象濃度の RSD である。実線は式 2 から計算した値である。計

算に使用した値は、 $\rho_x = 0.9\%$, $\rho_s = 0.6\%$, $\sigma_w = 0.0025$ Abs である。これらの値は全て実験から求めることが可能であり、式 2 の右辺には任意定数が無いことが、この推定法の特長である。

Fig.4 (左上) では、片対数プロットで分かりにくいですが、検量線は原点を通る直線である。そのため、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) は同じ形である。左下の図は、式 2 の各項の寄与率を示す。これより、非競合法における、最も重要な誤差要因は、吸光度の小さい低濃度領域ではウェルの吸収のバラツキ (σ_w) であり、高濃度では試料の注入誤差 (ρ_x) であることが分かる。

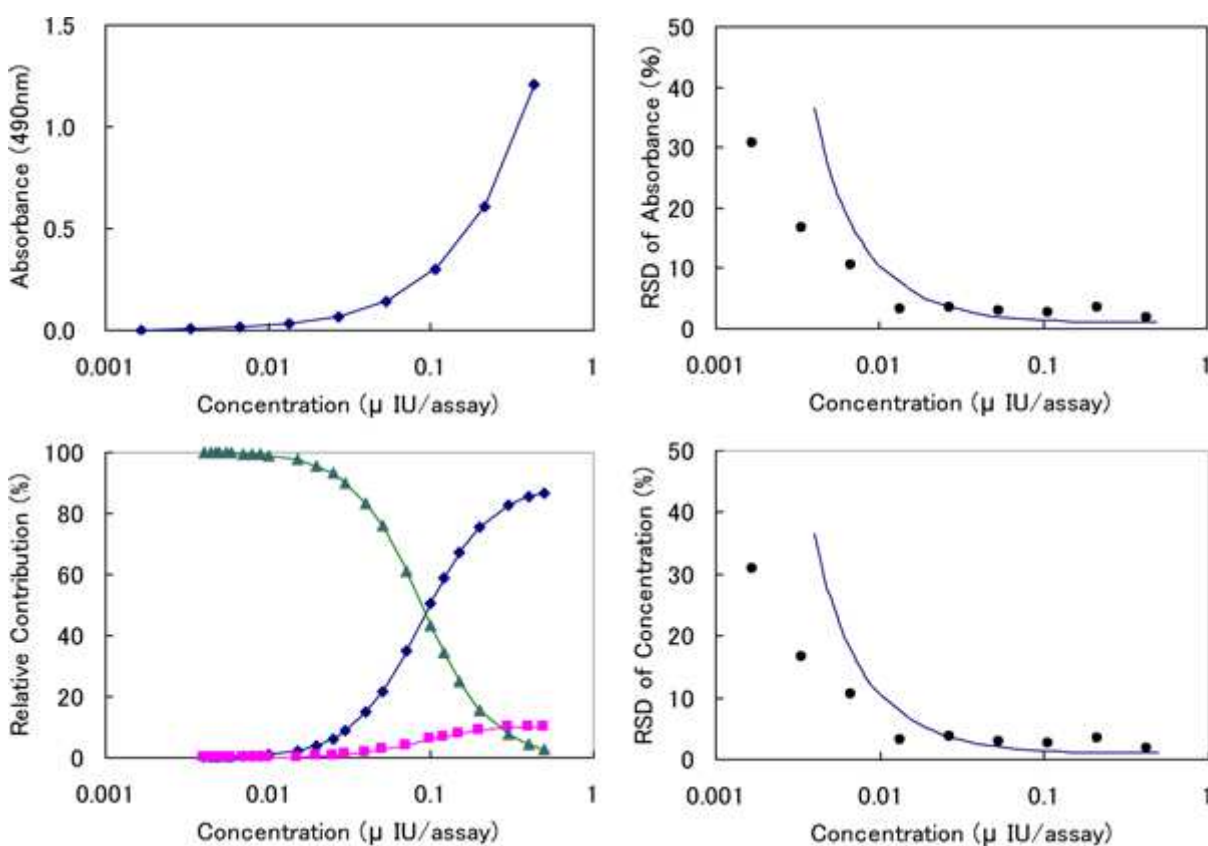


Figure 4 サンドウィッチ ELISA の検量線 (左上) , 測定値の精度プロファイル (右上) , 定量値の精度プロファイル (右下) , 式 2 の項の寄与率 (左下)

◆ 試料の注入誤差 (ρ_x) ; ■ 基質の注入誤差 (ρ_s) ; ▲ ウェルの吸収 (σ_w) . クレチン

TSH ELISA II, 栄研を用いた. 文献 [4] より引用.