

これから創薬を始める方へ [Vol. 3]

エヌイチ
～ N=1 の恐怖! ～

いわゆる High Throughput Screening (HTS) で行われるアッセイは通常、1 サンプル (化合物) につき 1 well (N=1) で行います。N=2 あるいは N=3 で行われることは極めて稀です。

アッセイの結果、Hit かどうかの判断をします。たとえば阻害剤探索の場合、仮に Hit としてのクライテリア (判定基準) を 50% 阻害と設定した場合、45% 阻害を示したものを捨ててしまってもいいか。もしかして N=3 でアッセイして平均したら 55%(45, 58, 62%) 阻害で、実は新規発見だったなんてことになるかもしれません。これぞまさに、**N=1 の恐怖**。

このようなことをできる限り少なくするために、ばらつきの少ない、Z' の大きいアッセイ系であることが望ましいと考えられます。N=3 でアッセイした濃度依存性曲線から IC₅₀ 算出実験を 3 回行っての平均... とは対極です。

ばらつきの小さい実験を組み立てる一つの方法が、ホモジニアスなアッセイを作ること。ホモジニアスという言葉はあまり正確ではなく、add-read あるいは mix and measure が正しいかもしれませんが、濾過、洗浄といった分離操作の入らないアッセイ系です。

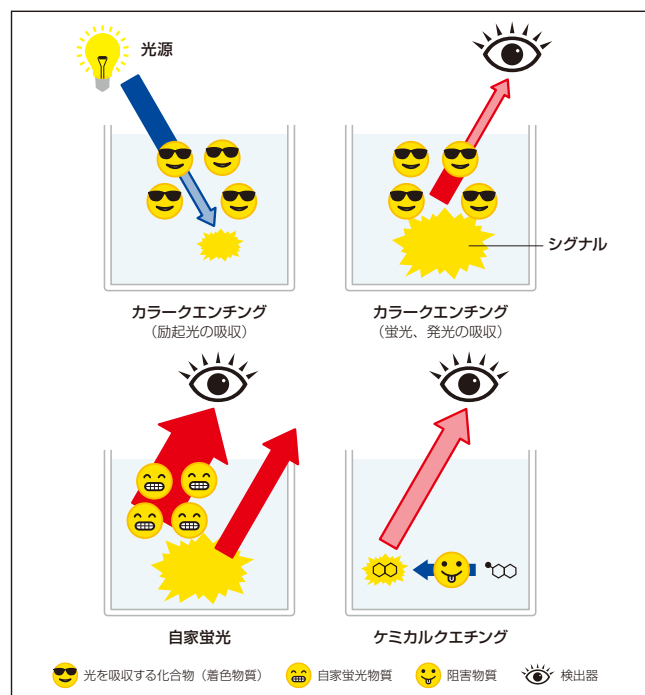
ホモジニアスなアッセイ系ですと、実験操作の観点からは、分注操作のばらつきのみがアッセイ系のばらつきの主因ですので、ばらつきが少ない系が構築できます。

ホモジニアスの他のメリットはアッセイ系のミニチュア化が容易になり、簡便化とスピードアップが可能になることです。ミニチュア化の最大のメリットは、一番貴重なサンプルを最低限にできることにあります。こんな背景のもと、多くのホモジニアスなアッセイ手法が確立されています。

ところが、ホモジニアスアッセイの選択肢が増えるに従い、ホモジニアスアッセイにおける注意事項が、忘れ去られていることがあります。たとえば、1990 年代前半には普通に使われていたラジオアイソトープを用いたフィルトレーション法。濾過操作により、検出の段階ではサンプルは洗い流されていて存在しません。したがってサンプルは検出には影響を与えません。ところがホモジニアスなアッセイ系では、検出のステップでもサンプルが存在します。そこで何が起こりうるか、を知っていることが重要です。

蛍光法でのホモジニアスアッセイの場合、もっとも問題になるのが化合物の**自家蛍光**です。蛍光法は感度が高い測定法ですが、これは目的とする蛍光物質以外のもの、つまり、サンプル自体の蛍光にも感度が高いことを意味します。阻害剤の場合、薬剤の入ったウェルのシグナルが、コントロールよりもはるかに高いといった結果になることさえあります。医薬品候補となる化合物は一般的に低波長に吸収があり、蛍光も比較的波長が短いため長波長の蛍光物質を検出に用いるのも自家蛍光を回避する一法です。この他蛍光の問題点を工夫した技術もありますが、蛍光物質あるいは測定装置が特殊なものになります。

次は**クエンチング**です。励起光が蛍光物質に届くまえに、あるいは蛍光 / 発光が検出器に届くまえにサンプルが光を吸収してしまういわゆる**カラークエンチング**。これは光吸収の問題で、吸光度測定が蛍光に比較して感度が悪いのと同様、サンプルの濃度が高い場合に影響を受けます。このカラークエンチングは測定前にウェルの色を見ると予想がつくことがあります。



もう一つが**ケミカルクエンチング**。検出反応系への影響 (多くの場合は阻害) です。たとえば検出反応に酵素を用いていれば、検出酵素阻害剤の影響です。ある目的の酵素の阻害剤探をする際、目的の阻害剤が存在するのであれば、検出に用いる酵素の阻害剤がないとは言いきれません。また検出系の反応時間等も長ければながいほど、影響が出る可能性も高まります。こういった問題は、サンプルの濃度は当然のこと、ライブラリーの性格にも依存するかもしれません。

こうしたことによる偽陽性は、求める活性ではないことを確認できるカウンターアッセイにより排除されるわけですが、偽陰性を最低限にすべく、やはり少しでも優れたアッセイ系が望まれます。

冒頭の「**N=1 の恐怖!**」から逃れるための一つの方法として、ホモジニアスアッセイをとりあげましたが、系を構築するにあたり、化合物の影響を十分認識せずにアッセイ系を構築し、実際にスクリーニングをはじめたらサンプルの影響に気がつくことがないように。せめて、「**N=1 の不安**」にしてスクリーニングを始めたいものです。

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

テクニカルサービス

Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982
E-Mail : promotec@jp.promega.com