

これから創薬を始める方へ [Vol. 5] ～ 測定時間とシグナル ～

測定装置の測定時間をどのように設定されていますか。

Non-RI 測定法のなかで一般的な吸収度、蛍光、発光を比較すると、発光法が一番測定に時間がかかるという印象を持たれていませんか。

発光測定の場合、多くの測定装置ではフォトンカウンティングを行っており、この場合、測定値 N に対し、SD は \sqrt{N} 、CV% は $100/\sqrt{N}$ で得られます。たとえば 1 秒測定して 400 count、400 cps (count per second) であれば、SD=20、CV=5% となりますが、0.25 秒測定では、100 count、400 cps、SD=10 CV=10% となり、400 cps のサンプルの場合は測定時間を 1/4 にすると CV が 2 倍となります。

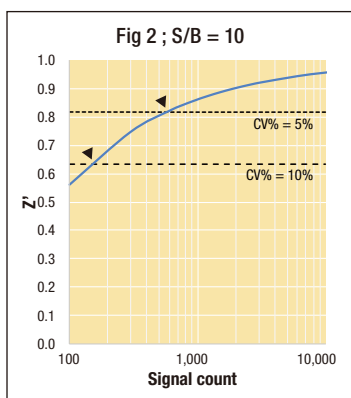
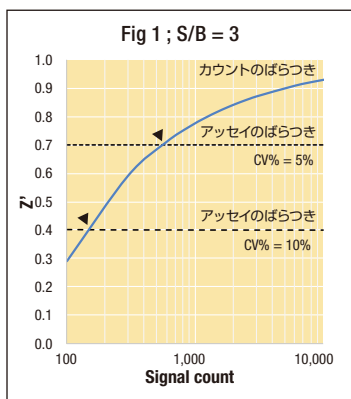
この考えを利用して、アッセイの S/B が 3 とした場合、Signal が 100 あるいは 1,000 の場合の SD、Background に対する SD およびそこから得られる Z' をシミュレーションしました (Table 1)。

Table 1: S/N = 3 の場合の Signal からのシミュレーション

Signal	100	1,000	S
Signal SD	10	32	$SD_s = \sqrt{S}$
BK	33	333	$B = S/3$
BK SD	6	18	$SD_B = \sqrt{B}$
Z'	0.29	0.78	$Z' = \frac{(S-3SD_s) - (B+3SD_B)}{S-B}$

さらに、さまざまな Signal に対して計算される Z' をグラフに示してみました (Fig 1)。比較対照として、CV% が 5% および 10% で固定した場合を、各点線で示しました。5% は cell free 系、10% は cell base 系と見立てています。アッセイのばらつき CV が 10% の場合、シグナルが 150 を超えた時点で、いくら測定を長くしてカウントを稼いでも、アッセイのばらつきの影響が大きく、 Z' は 0.4 を超えることはありません。また、アッセイ CV 5% の場合は、シグナルが 600 を超えたあたりから Z' は 0.7 をこえることはありません。

同様に、S/B が 10 の場合も考えました (Fig 2)。やはり 150 および 500 を超えたあたりで同様の現象が見られます。

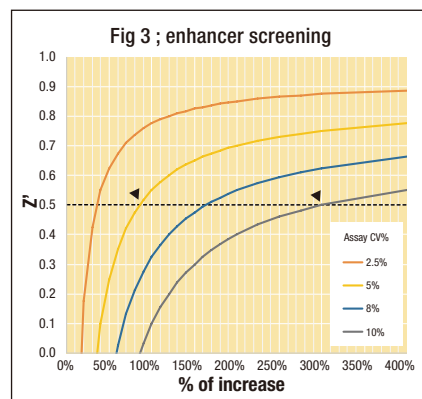


ここから推察すると、アッセイ CV% が 5% の場合は、600 カウント程度、CV% が 10% の場合は、150 カウント程度でよいこととなります。仮に 1,000 cps のサンプルの場合、計算上 0.6 秒あるいは 0.2 秒で充分であることとなります。

しかし、実際にはアッセイのばらつきと測定のばらつきは独立していませんし、装置には固有のノイズ等がありますので、こんなに単純にはいきません。

また、発光測定装置は一般的に RLU という単位が多用されており、実際の単位は cps なのか、count なのか、あるいは別の単位かもしれません。そこで、デフォルトでの 1 秒測定が遅いと感じられましたら、一度ご自分のアッセイ系で、1 秒、0.5 秒、0.2 秒測定を行い、アッセイ系固有の Z' を算出して、時間を短くすることも一法です。

今回、ばらつきを考えましたので、もう一題。 Z' は阻害剤探しのようになり 0-100 が決まっている場合はよいのですが、増強を見るばあいには、どのくらいの増強から有効かを考えてみます。Fig 3 は、コントロールよりものくらい増強したら、 Z' がどのよう



になるか変化を示しています。この場合、コントロールよりも明らかに高いかを示すのであれば、 $Z' = 0$ でよいのかもしれませんが。仮に $Z' = 0.5$ で見た場合、アッセイの CV 5% の場合は、90% (1.9 倍) 程度の増加から明らかに見分けることができますが、アッセイ CV 10% の場合は、300% 程度の増加 (およそ 4 倍) が必要です。エンハンサー探索の場合、どの程度の増強を期待するのか、またその期待を検出するのに十分なアッセイ系であるか知る必要があります。もちろん、ここでは十分なシグナルがあるという前提で計算をしています。

繰り返しますが、構築するあるいは構築したアッセイ系で大量にサンプルをかけるまえに、系の理解が必要です。(なおこれらのシミュレーションでは、データのばらつきはすべて単純な正規分布に従うという前提で行っています。)

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