

競合 ELISA 法の検出限界を B/B_0 曲線の傾きから求める方法林 讓,^{*a} 松田りえ子,^a 伊藤克敏,^b 今井一洋,^c 前田昌子^bEstimation of Detection Limit from Slope of B/B_0 in Competitive ELISAYuzuru HAYASHI,^{*a} Rieko MATSUDA,^a Katsutoshi ITO,^b
Kazuhiro IMAI,^c and Masako MAEDA^b*National Institute of Health Sciences,^a 1-18-1 Kami-Yoga, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University,^b 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa, Tokyo, 142-8555, Japan, and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University,^c 1-1-20 Shin-machi, Nishitokyo-shi, Tokyo, 202-8585, Japan*

(Received November 1, 2004; Accepted December 16, 2004)

A method has been proposed for determining the detection limit (L_D) from the slope of a semilogarithmic plot of a B/B_0 curve in competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). As an application, this paper describes a graphic determination of L_D from analogue data in the literature. The L_D obtained corresponds to the concentration at which the relative standard deviation of concentration estimates is 30%.

Key words—detection limit; uncertainty; precision; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

緒 言

検出限界の概念は定量分析においては重要であり、いくつかの国際機関で、その定義が与えられている。¹⁾ ISO 及び IUPAC の定義に基づく ICH の検出限界 L_D の定義を示す。^{2,3)}

$$L_D = 3.3 \frac{s}{a} \quad (\text{Eq. 1})$$

ただし、 s はブランク試料の測定値の SD、 a は検出限界付近の検量線の傾きである。

残念ながら、上記の国際的な定義は、検量線が直線である場合 (非競合 ELISA 法) に限られている。そのため、検量線が逆シグモイドである競合 ELISA 法には、この定義を用いることができない。そこで、非競合・競合 ELISA 法に統一的に適用できる検出限界の定義が提案された。⁴⁾

$$L_D = 3.3s_c \quad (\text{Eq. 2})$$

ここで s_c はブランク試料の濃度推定値の SD である。Equation 2 を $s_c/L_D = 1/3.3 = 30\%$ と変形すると分かるように、Eq. 2 は「検出限界は、濃度推定

値の RSD が 30% となる濃度である」を意味する。⁴⁾

Equation 1 と Eq. 2 は、 $s_c = s/a$ とすれば、同じであるが、主張は大きく異なる。Equation 1 は測定値の SD を基準にし、Eq. 2 は濃度推定値の SD を基準にしている。そのため、Eq. 2 では、検量線を参照する必要がないので、検量線が線形・非線型に関わらず、検出限界を求められる。しかし、30% RSD に対応する検出限界を見つけるためには、濃度推定値の RSD が連続曲線として与えられなければならない。この RSD vs 濃度のプロットを精度プロファイルと呼ぶ。もちろん、このようなケースは少なくはないが、⁵⁾ すべての競合 ELISA 法に当てはまる訳ではない。

本研究では、連続な精度プロファイルが得られない場合の方法論として、 B/B_0 曲線の片対数プロットから、作図により検出限界を求める方法を示す。この方法で求めた検出限界は、Eq. 2 の定義通りに、濃度推定値の RSD は 30% となる。また、この方法は、広い濃度範囲での精度プロファイルは必要ではないため簡便である。本論文では、過去の文献にあるアナログデータから検出限界を推定する作図法を提案する。

^a国立医薬品食品衛生研究所、^b昭和大学薬学部、^c武蔵野大学薬学研究所
e-mail: fumi@nihs.go.jp

理 論

競合 ELISA 法では、検量線は 4 係数ロジスティック関数

$$Y = \frac{C_0 - C_3}{1 + \left(\frac{X}{C_2}\right)^{C_1}} + C_3 \quad (\text{Eq. 3})$$

で表されることもあり、これを標準化した B/B_0 曲線

$$B/B_0 = \frac{1}{1 + \left(\frac{X}{C_2}\right)^{C_1}} \quad (\text{Eq. 4})$$

もよく用いられる。 B/B_0 曲線の片対数プロットは、検出限界で、次の傾きを持つことが既に導かれている。⁶⁾

$$\frac{B/B_0 \text{ 曲線の片対数}}{\text{プロットの傾き}} = \frac{\text{ブランク測定値の RSD}(\%)}{13} \quad (\text{Eq. 5})$$

以下、Eq. 5 の応用を示す。

結果と考察

冒頭で述べたように、30% RSD に当たる検出限

界濃度を見つけるためには、連続曲線として与えられている濃度推定値の RSD が必要である。濃度推定値の精度プロファイルは、測定値の精度プロファイルから、次のように求まる。^{4,5)}

濃度推定値の SD = (測定値の SD) ÷ (検量線の傾き)
そこで、連続な濃度推定値の精度プロファイルを得るためには、

A. 連続な測定値の SD ;

B. 実際に微分が可能な検量線 ;

が必要である。条件 A は、合理的に推定^{4,5)}又は SD を一定と仮定 (等分散の仮定) すれば満たされる。条件 B は、検量線がデジタルデータとして与えられていないと満たすことはできない。本研究では、条件 B が満たされない例として、文献のアナログデータを扱う。

ここに例として挙げる文献⁷⁾は、特徴のある生物活性を有する脳下垂体ペプチドホルモンである pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 38 (PACAP38) を定量分析するための競合 ELISA 法を扱っている。分析系は、第 2 抗体固相化法であり、luciferin-luciferase の生物発光反応を検出手段としている。文献には、 B/B_0 曲線の片対数プロット

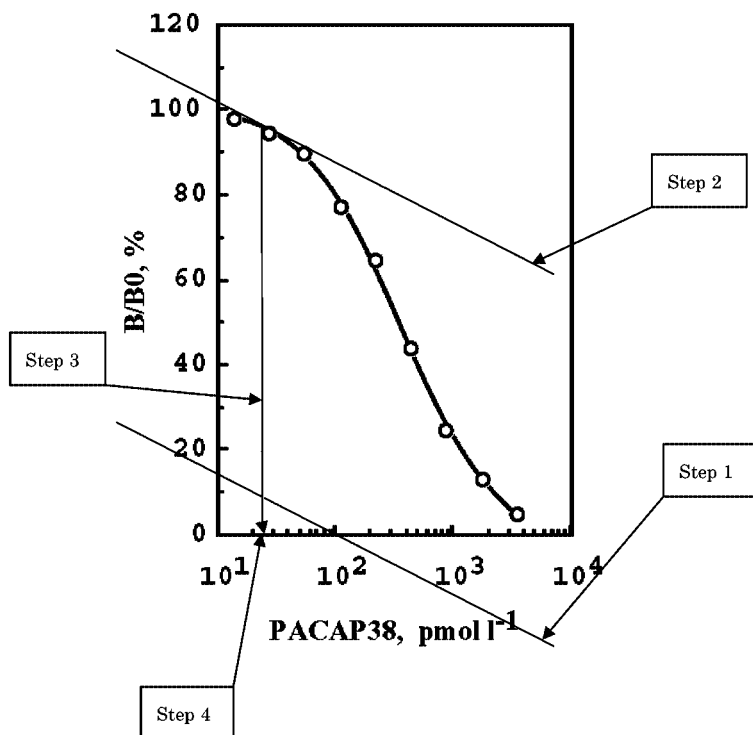


Fig. 1. B/B_0 Curve in Bioluminescent Enzyme Immunoassay for Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 38 (PACAP38)
Procedures 1–4 are explained in the text.

(Fig. 1) と低濃度サンプルの測定値の RSD が記載されている。Figure 1 は、原著論文のデータから新たに作成したものであり、原著論文の図 (Fig. 3)⁷⁾ と同等である。

Equation 5 によれば、検出限界濃度における B/B_0 曲線の片対数プロットの傾きは、ブランク測定値の RSD (%) を 13 で割った値である。文献 7 には、最も低濃度サンプルの測定値の RSD は 1.9% と記載されている。これをブランク測定値の RSD とみなすと、Eq. 5 より、 B/B_0 曲線の片対数プロットの傾きは $0.15 (=1.9 \div 13)$ となる。

この計算値に基づいて検出限界を求める方法を以下に記す (Fig. 1 参照)。

操作 1 B/B_0 の図の左下のスケールを利用して、Eq. 5 の傾きを持つ直線を引く。

操作 2 操作 1 の直線と平行で、 B/B_0 曲線に接する直線を求める。

操作 3 操作 2 の直線と B/B_0 曲線との接点から X 軸に垂線を下ろす。

操作 4 操作 3 の垂線が X 軸と交わった点を求める。

操作 4 で求めた交点が検出限界である。操作 1 はかならずしも必要ではないが、図のスケールを使うと目的の傾きを持つ直線を引くのが容易である。

Figure 1 より、検出限界濃度は 24 pmol/l となることが分かる。この推定値は、文献の値 ($=21$ pmol/l $=3.1$ pg/assay) と大変よい一致を示す。

上記の方法は、 B/B_0 曲線の片対数プロットの傾きを利用するため、微分法と呼ばれている。⁶⁾ 微分法では、 B/B_0 曲線と低濃度での RSD 値が 1 つあれば、国際基準に一致する検出限界を図形的に求められることを本論文では示した。従来の方法では、 B

$/B_0=90\%$ などとなる濃度を検出限界とすることもあるが、検出限界に特有な統計量との理論的關係は導かれない。微分法は、世界に共通な基準に基づいて分析法を評価できる。また、微分法は、広い濃度範囲での精度プロファイルは必要ではないため簡便であり、本論文で述べたように、過去の文献にあるアナログデータから検出限界を推定することも可能であるため、適用範囲は広いと考えられる。

謝辞 本研究は、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業の一環として行われた。

REFERENCES

- 1) Long G. L., Winefordner J. D., *Anal. Chem.*, **55**, 712A-724A (1983).
- 2) The Japanese Pharmacopoeia, Fourteenth Edition, 2001
- 3) ICH Harmonized Tripartite Guideline, "Validation of Analytical Procedures: Methodology," 14 November, 1996.
- 4) Hayashi Y., Matsuda R., Maitani T., Imai K., Nishimura W., Ito K., Maeda M., *Anal. Chem.*, **76**, 1295-1301 (2004).
- 5) Dudley R. A., Edwards P., Ekins R. P., Finney D. J., McKenzie I. G. M., Raab G. M., Rodbard D., Rodgers R. P. C., *Clin. Chem.*, **31**, 1264-1271 (1985).
- 6) Hayashi Y., Matsuda R., Ito K., Nishimura W., Imai K., Maeda M., *Anal. Sci.*, (in press).
- 7) Ito K., Goto T., Murakami S., Maeda M., Shioda S., Arimura A., *Anal. Chim. Acta*, **382**, 245-251 (1999).