

2. 1. くり返し分析による不確かさ推定の問題点

ELISA 分析は、感度、特異性などに優れ、操作が簡便であるため、環境汚染物モニタリング、疾病スクリーニング等に有用な方法であり、広く使用されている。ELISA 分析においても、他の定量分析法と同様に、分析値の信頼性評価のため、分析法をバリデートし、真度・精度などを求めることが国際的に求められている。ICH 等のバリデーションのガイドラインによれば、適切な試料の分析をくり返し、その結果の標準偏差 (SD) 又は相対標準偏差(RSD)により、精度を推定する [2]。これは、GUM における A タイプの不確かさの推定法である。しかし、くり返し実験からの不確かさ推定には、以下に示すようないくつかの欠点がある。

(1) 少数のくり返しから求めた標準偏差は変動が大きく、正しい精度が推定できない。

Fig. 1 は標準偏差 1 の正規分布からランダムにサンプルを取り、そのサンプルから求めた標準偏差推定値の 95%信頼区間を示す。横軸はくり返し数 (サンプル数) を示している。分析法バリデーションでよく行われる 5 回のくり返しから求められる標準偏差の信頼区間は約 0.4~1.6 であり、非常に信頼性が低いことがわかる。30 回以上という多数のくり返しを行っても、信頼区間は±25%程度 (0.75~1.25) である。

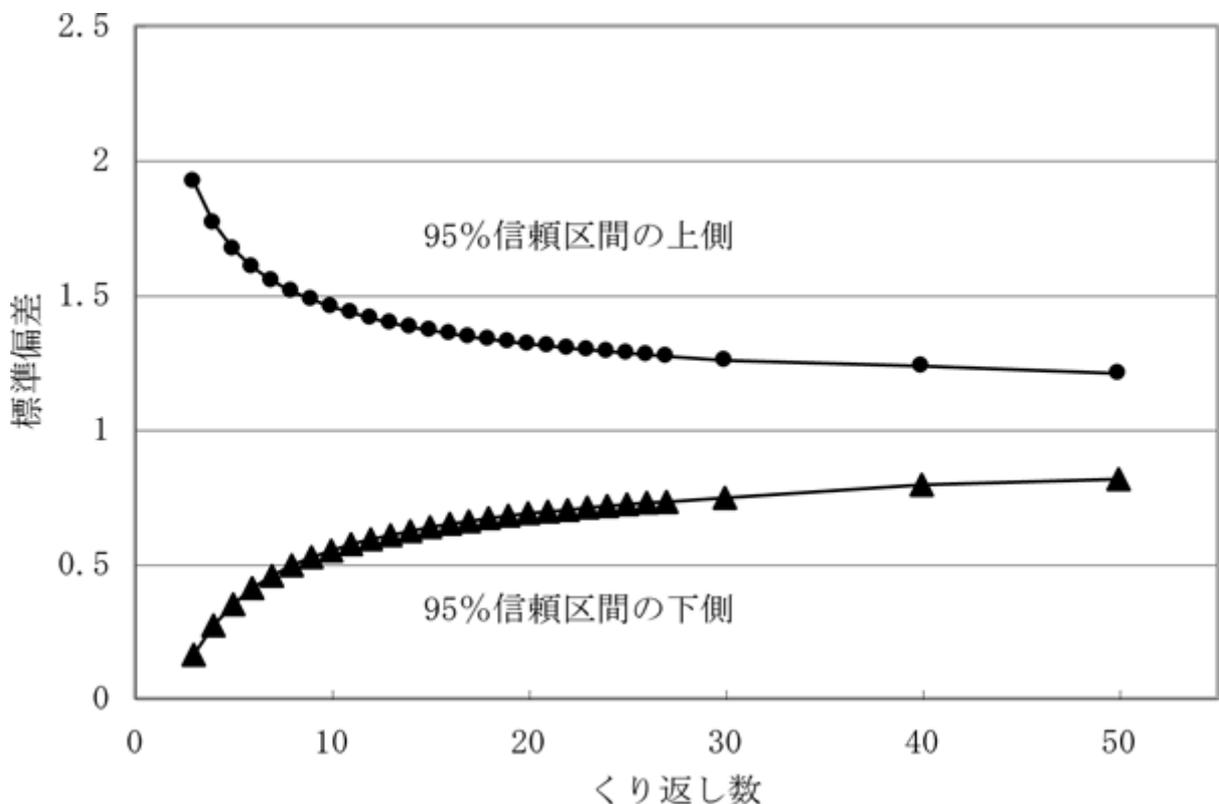


Figure 1 くり返し実験による SD 推定値の 95%信頼区間
文献 [3] より引用.

(2) 特定の試料のくり返しを多数回行って不確かさを推定しても、その濃度における不確かさしか推定できない。

一般に、分析の不確かさは全ての濃度範囲で一定ではなく、濃度の関数である。多くの分析系では、濃度が高くなると信号も増大し、RSD は低下する傾向にある。つまり、濃いサンプルほど、精度良く分析できるという経験則が存在している。

以上に挙げた、くり返し分析による不確かさ推定の 2 つの問題点は、ELISA 分析においては特に重要である。ELISA 分析は測定濃度範囲が広く、濃度により不確かさがかなり異なることが予想されるため、多くの濃度での不確かさの推定が必要である。一方、通常 96 穴プレート上で行われる ELISA 分析においては、同一プレート上で行う場合のくり返し数には自ずから限界がある。さらに、一つの条件（プレート、操作者、環境条件などの組み合わせ）で推定した不確かさが、他の条件に適用できるとは限らない。

以下、B タイプの方法を用いて、ELISA 分析の不確かさを推定する方法を述べる。この方法では、上にあげた 2 つの問題点が解決されている。