ELISA の精度・検出限界推定法

林　譲

はじめに

この講義では，ELISA 法の不確かさ(標準偏差，SD)を誤差の原因の関数として記述する方法を示す．つまり，不確かさの式（Anal. Chem., 76 (2004) 1295）の誘導を解説する．必要な数学的知識は，平均と分散の式と意味だけである．ELISA の誤差の原因を，測定手順全体を考察して，同定する．

確率論の基礎

測定値 Y を真の値 $\bar{Y}$ と誤差 e の和と考える:

$$Y = \bar{Y} + e \tag{1}$$

誤差の性質として，平均はゼロ，分散は正の有限な値とする:

$$E[e] = 0 \tag{2}$$

$$E[e^2] = \tilde{e}^2 \tag{3}$$

$\tilde{e}$ は標準偏差（SD）を表す．もし測定を無限回くり返し行えるならば，測定値の平均は真の値に等しくなる:

$$\bar{Y} = E[Y] \tag{4}$$

ここで，式(1)と(2)より

$$\begin{aligned} E[Y] &= E[\bar{Y} + e] \\ &= E[\bar{Y}] + E[e] = \bar{Y} \end{aligned} \tag{5}$$

の関係を使っている．測定値の分散は，式(3)を使うと

$$E\left[(Y - \bar{Y})^2\right] = \tilde{e}^2 \tag{6}$$

となり，誤差の分散に等しくなる．

以上の考察により，モデル測定値の性質が得られる:

- 測定値の平均は真の値に等しい;
- 測定値の分散は誤差の分散に等しい．

この性質が，複数の誤差あるが場合にも同様に成り立つことを示す．測定値 Y を真の値 $\bar{Y}$ と k 個の誤差（$e_1, e_2, \ldots, e_k$）の和と考える:

$$Y = \bar{Y} + \sum_{i=1}^{k} e_i \tag{7}$$

誤差の性質として，どの誤差の平均もゼロとする:

$$E[e_i] = 0 \tag{8}$$

また，

$$E\left[\sum_{i=1}^{k} e_i\right] = \sum_{i=1}^{k} E[e_i] = 0 \tag{9}$$

分散は正の有限な値であるが，共分散はゼロとする（誤差が独立である条件）:

$$E\left[e_i e_j\right] = \tilde{e}^2 \delta_{ij} \qquad (10)$$

この式は次の意味を持つ:

$$i = j\text{のとき}E\left[e_i e_j\right] = \tilde{e}^2 \qquad (11)$$

$$i \neq j\text{のとき}E\left[e_i e_j\right] = 0 \qquad (12)$$

もし測定を無限回くり返し行えるならば，測定値の平均は真の値に等しくなる:

$$\bar{Y} = E\left[Y\right] = E\left[\bar{Y} + \sum_{i=1}^{k} e_i\right] \qquad (13)$$

ここでは，次の関係を使った:

$$E\left[\bar{Y} + \sum_{i=1}^{k} e_i\right] = E\left[\bar{Y}\right] + E\left[\sum_{i=1}^{k} e_i\right] = \bar{Y} + \sum_{i=1}^{k} E\left[e_i\right] = \bar{Y} \qquad (14)$$

測定値の分散は，誤差の分散（個々の誤差の分散の和）に等しくなる:

$$E\left[\left(Y - \bar{Y}\right)^2\right] = E\left[\left(\sum_{i=1}^{k} e_i\right)^2\right] = k\tilde{e}^2 \qquad (15)$$

式(15)の誘導は次の様になる:

$$E\left[\left(\sum_{i=1}^{k} e_i\right)^2\right] = E\left[\sum_{i,j=1}^{k} e_i e_j\right] = \sum_{i,j=1}^{k} E\left[e_i e_j\right] = \sum_{i=1}^{k} E\left[e_i^{\,2}\right] = k\tilde{e}^2 \qquad (16)$$

誤差が独立である（式(10)）ので，分散は(15)のように簡単になる．式(15)と(16)は分散の加法性と呼ばれている．

独立な誤差

誤差の分散は正の値であるが，異なった誤差の共分散はゼロであるという式(10)～(12)の意味を考える．誤差 e_i は，ゼロを中心（平均）に正と負の値をランダムに取る変数とする．つまり，ある事象では $e_i = 0.3$ であり，他の事象では $e_i = -0.7$．．．となると仮定する．この様にランダムな値を取る e_i は確率変数と呼ばれている．

簡単のために，事象 *l* は Ω 個あり，各事象は番号を付けられると仮定する．事象 1 では $e_i(1) = 0.3$ であり，事象 2 では $e_i(2) = -0.7$．．．，$e_i(\Omega) = -0.1$ などと考える．さらに，各事象の出現確率は全て $1/\Omega$ に等しいとする．

この様に考えると，e_i の平均

$$E\left[e_i\right] = \sum_{l=1}^{\Omega} e_i(l) \frac{1}{\Omega} \qquad (16)$$

はゼロになると想像できるだろう．平均は e_i の値の和であるので，正と負の色々な e_i の値が相殺され，総和はゼロになるからである．

一方，分散（$i \neq j$）

$$E\left[e_i^{\,2}\right] = \sum_{l=1}^{\Omega} \left\{e_i(l)\right\}^2 \frac{1}{\Omega} = \tilde{e}^2 \qquad (17)$$

は正の有限な値になる．e_i が正と負の色々な値を取っても，e_i^2 の値は必ず正になるので，その総和は正の値になる．

共分散

$$E[e_i e_j] = \sum_l e_i(l) e_j(l) \frac{1}{\Omega} = \tilde{e}^2 \delta_{ij} \quad (18)$$

は，ゼロになる．なぜならば，e_i と e_j が独立に正と負の色々な値を取るため，その積も正と負の色々な値を取るので，積の和は互いに相殺されてゼロになるからである．

不確かさを記述する数学的方法

分析化学において，測定値の誤差を計算する数学的方法には主に次の 4 つがある．

測定値の誤差（確率変数）は:

1. 独立な確率変数の足し算になっている;
2. 独立でない確率変数の足し算になっている;
3. 独立な確率変数の関数になっている;
4. 独立でない確率変数の関数になっている;

場合である．

競合 ELISA 法の不確かさの式は，場合 1 と 3 に基づいて誘導される．場合 1 と 3 は，誤差の伝播則として知られている．FUMI 理論は場合 2 である．ピペットとメスフラスコによる希釈の不確かさを表す数式は，場合 1 と 3 のどちらからも誘導できる．著者の知る限りでは，場合 4 はほとんど扱われていないので，以下では省略する．

場合 1 は，分散の加法性としても知られている．定量分析では，調製誤差と測定誤差は互いに独立である．これらを，それぞれ，X_1 と X_2 すると，測定値に含まれる誤差 Y は，

$$Y = X_1 + X_2 \quad (19)$$

となる．分散の加法性は次のように書くことができる:

$$E[Y^2] = E[X_1^2] + E[X_2^2] \quad (20)$$

式(15)と同じである．

場合 2 では，共分散がゼロにならないので，Y の分散は

$$E[Y^2] = E[X_1^2] + E[X_2^2] + 2E[X_1 X_2] \quad (21)$$

と書ける．FUMI 理論では，X_1 と X_2 をノイズの強度（観測値）とする．ノイズはマルコフ過程が含まれていると仮定しているので，X_1 と X_2 は独立ではなく，ゼロでない共分散が現れる．FUMI 理論は，式(21)の右辺をノイズの確率過程論から求め，ノイズが作る偽りの面積 Y の分散を計算する理論である．

場合 3 では，互いに独立な k 個の誤差 X_i の関数として，測定に含まれる誤差 Y が記述できる場合である:

$$Y = f(X_1, X_2, \ldots, X_k) \quad (22)$$

Y の分散を

$$(dY)^2 = \sum_{i=1}^{k} \left(\frac{\partial Y}{\partial X_i} \right)^2 (dX_i)^2 \quad (23)$$

と書くのが，誤差の伝播則である．$(dY)^2$ は Y

の分散であり，$(dX_i)^2$ は X_i の分散である．

誤差 Y の微分は

$$dY = \sum_{i=1}^{k} \frac{\partial Y}{\partial X_i} dX_i \qquad (24)$$

であり，式(24)を 2 乗して，交差項 $dX_i dX_j$ を除くと，式(23)が得られる（以下参照）．

微分の定義より，微分 dX_i の値は任意に設定できるので，dX_i を X_i からの変位を表す確率変数と考えよう．すると，式(24)の平均は

$$E[dY] = \sum_{i=1}^{k} \frac{\partial Y}{\partial X_i} E[dX_i] \qquad (25)$$

と書ける．dX_i を X_i の平均値からの変位と考えると，$E[dX_i]=0$ となるので，$E[dY]=0$ となり，式(9)と同じになる．ただし，微分係数を全て 1 とする．

微分（24）の 2 乗は，

$$(dY)^2 = \sum_{i=1}^{k} \left(\frac{\partial Y}{\partial X_i} \right)^2 (dX_i)^2 + 2 \sum_{i \neq j, i>j} \frac{\partial Y}{\partial X_i} \frac{\partial Y}{\partial X_j} dX_i dX_j \qquad (26)$$

となる．定義より，確率変数 X_i と X_j（$i \neq j$）は独立であり，これらの共分散はゼロであるから，式(26)の右辺第 2 項はゼロになる．分散 $E[(dY)^2]$ と $E[(dX_i)^2]$ の記号 $E[\ ]$ を省略し，$(dY)^2$ と $(dX_i)^2$ を分散と考えると，式(23)が得られる．

競合 ELISA の不確かさの式

ELISA の不確かさ予測の予測は，次の手順で行われる：

1：誤差原因の追究；

2：合成不確かさ（数式）の誘導；

3：不確かさの予測式の実験的検証．

ここでは，手順 2 の数式の予測を解説する．シンボルは，スライド 20 に示してある．

第 1 に，測定値の分散は，調製誤差の分散 ${\sigma_P}^2$ と測定誤差の分散 ${\sigma_M}^2$ の和とする：

$${\sigma_T}^2 = {\sigma_P}^2 + {\sigma_M}^2 \qquad (27)$$

ここでは，調製誤差と測定誤差は独立と仮定し，分散の加法性（式(20)）を使っている．${\sigma_P}^2$ と ${\sigma_M}^2$ は同じ次元（測定値（吸光度）の 2 乗）であるので，測定値の 2 乗で割れば，

$${\rho_T}^2 = {\rho_P}^2 + {\rho_M}^2 \qquad (28)$$

となり，相対標準偏差（RSD）による記述になる．便利なため，式(28)を以下では使う．

ここで扱っている競合 ELISA 法の測定手順はスライド 15 にある．分析対象物質の量を X，標識抗原の量を G，第 1 抗体（抗血清）の量を B とする．酵素反応により生成した色素の量 Z は，固相に結合した標識抗原の量に比例する：

$$Z = k \frac{G}{X+G} B \qquad (29)$$

ここで，k は比例定数である．

式(29)をX，G，Bについて微分してから2乗し，さらに，Zの2乗で割れば，次の式が得られる：

$$\rho_T{}^2 = \frac{X^2}{(X+G)^2}\left(\rho_G{}^2 + \rho_X{}^2\right) + \rho_B{}^2 \tag{30}$$

上式の誘導において現れる$(dZ/Z)^2$は Z の相対標準偏差（RSD）の 2 乗を表す．他の変数についても同様である．

他の調製誤差としては，反応基質の注入量があるので，この誤差を式(30)に加えると

$$\rho_T{}^2 = \frac{X^2}{(X+G)^2}\left(\rho_G{}^2 + \rho_X{}^2\right) + \rho_B{}^2 + \rho_S{}^2 \tag{31}$$

が得られる．ここで，分散の加法性（式(20)）を使っている．

測定誤差は，マイクロプレートのウェルの光吸収のウェル間でのバラツキと紫外・可視吸光度計のノイズによる誤差とを含んでいる：

$$\rho_M{}^2 = \left(\frac{\sigma_W}{Y}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_N(Y)}{Y}\right)^2 \tag{32}$$

測定値の誤差は，調製誤差と測定誤差の和であり（式(28)），その相対分散（RSD^2）は

$$\rho_T{}^2 = \frac{X^2}{(X+G)^2}\left(\rho_G{}^2 + \rho_X{}^2\right) + \rho_B{}^2 + \rho_S{}^2 + \left(\frac{\sigma_W}{Y}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_N(Y)}{Y}\right)^2 \tag{33}$$

となる．

おわりに

今回の講義では，数式の誘導を主に扱った．分析化学の不確かさの構造を理解するのに役立てば幸いである．