

# アッセイ系のバリデーションの手順

東京大学 創薬機構

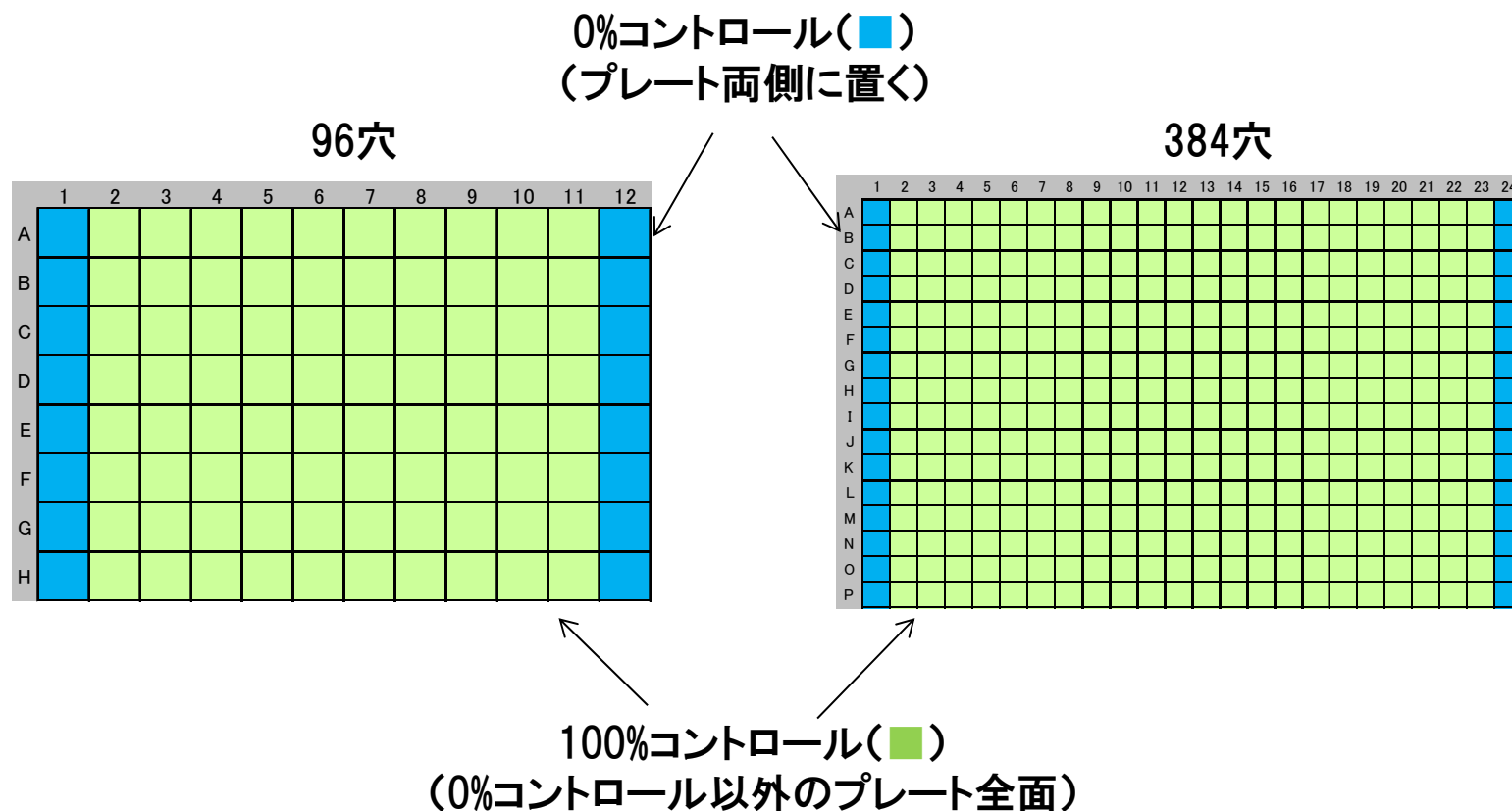


## アッセイ系のバリデーションの手順

- ① **一部のウェル**を使ってアッセイ条件の**最適化**を行う。コントロール(0%と100%)の値から、**S/B比、CV値、Z' 値**を算出する。陽性対照化合物がある場合は、その活性確認も行う
- ② **プレート全面**を使って(化合物の代わりに全てDMSOとして)反応を行う。全面の**CV値とZ' 値**を求めると同時に、測定値を**ヒートマップ**や**散布図**で表示してバラツキや偏りを検証する
- ③ **日を替えて②の実験を行い**、再現性を確認する

最低限、これらを確認してから、実際のサンプルのアッセイ(まずパイロットスクリーニングから)に移行

## 前項②の実験の際のプレートフォーマットの例



実際に化合物サンプルを用いたスクリーニングの際は、  
 96穴：2～11列  
 384穴：3～22列 にサンプルを置き、両端側の列は0%と100%のコントロールを  
 複数ウェルに置いて、プレート毎に化合物の活性値を算出できるようにする

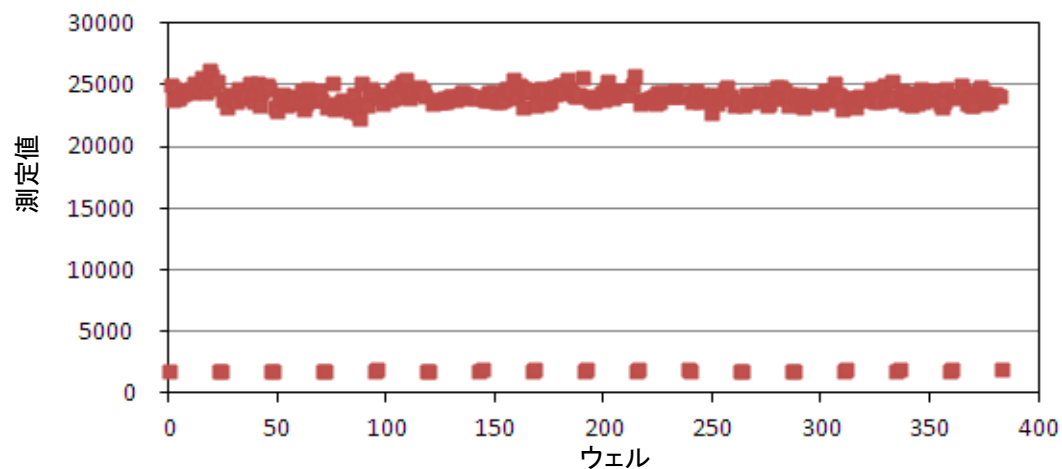
# 前項②の実験結果のヒートマップと散布図表示の例

## ヒートマップ表示

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1816	24953	23787	24685	23933	23905	24244	24445	24545	24585	24707	24375	25174	24695	24480	25554	25304	24389	24876	26201	25763	24728	25297	1860
B	1823	23708	23981	23185	24172	23860	23888	23681	24667	24456	23919	24102	24122	25138	23970	23665	24356	25080	23303	24446	24735	24991	24731	1870
C	1857	23114	22899	23954	24189	23671	23349	23601	23710	24106	23615	23948	23453	24538	23024	23479	24644	23706	24559	23826	23769	24530	23792	1799
D	1822	23168	23510	25052	22996	23193	23350	23490	23765	23509	23628	22817	23481	24282	23207	22757	22336	25150	23420	23337	24235	24716	24447	1799
E	1895	23863	23410	24064	24137	24163	23826	24512	23973	24794	24124	25281	24752	25411	24563	23961	24418	24557	24529	24817	24311	24471	24143	1773
F	1800	23417	23770	23833	23646	23555	23675	23954	23591	24062	24114	23878	23719	24068	23865	24442	24388	24176	24071	24011	23968	23865	24144	1867
G	1923	23764	23761	24310	23810	24357	24350	23548	23665	23983	23782	24657	24690	24383	24519	25415	23955	24975	24848	23128	24611	24382	24453	1782
H	1952	23354	24343	24704	24600	24478	23461	23655	24468	24763	24280	24465	24968	24913	24403	25356	24654	24304	24260	24111	24018	24171	25569	1817
I	1978	24018	23768	23878	23646	23907	23941	24415	23825	24722	25204	24377	24304	23930	24216	24324	24461	24598	24249	24263	24293	25024	25733	1830
J	1932	23529	23840	23704	23646	23923	23819	24011	23477	24353	23650	24350	24141	24172	24104	24368	24050	24481	24044	23998	24374	24101	24241	1914
K	1860	23566	23802	24549	23621	24188	24034	23702	23826	23941	22778	24152	23486	23860	24025	23984	24578	24792	23928	24128	23348	23558	23695	1808
L	1858	23308	24149	23883	23576	23785	23796	24092	24394	24213	23974	23348	23504	24343	23930	23901	24853	24034	24773	24453	23918	23344	24183	1841
M	1863	23940	24203	23330	23223	23833	23649	23725	24045	24133	23819	23966	23436	23851	24469	24250	23777	24535	25084	23710	24288	24146	23050	1852
N	1897	23872	23523	23992	23195	23960	24059	23931	23807	23854	23831	24724	24598	23629	24061	23644	24685	24926	23798	23904	23702	25350	24126	1801
O	1991	24473	23766	23472	24334	23660	23260	23692	23533	23899	24696	23627	24421	24174	24244	23719	24486	23951	23984	23518	23225	23601	24608	1858
P	1875	24136	24114	23978	24088	24917	24463	23451	23892	23246	23345	24246	24223	24493	24801	24405	23459	23743	23646	24127	24157	24268	24005	1960

0%コントロール: Av=1862、SD=58、CV=3.1%      100%コントロール: Av=24094、SD=552、CV=2.3%      S/B=12.9      Z'=0.92

## 散布図表示(行方向)



# アッセイの評価指標と計算方法

スクリーニングで使われる代表的な指標とその意味、計算方法を説明する

## ①CV値(変動係数、coefficient of variation)

計算式:  $CV(\%) = \text{標準偏差}(SD) / \text{平均}(Av)$  (← Excelで、SD算出はSTDEV.S関数を利用)

どれ位ばらつきがあるかの指標。例えば、分注機に分注液量やプレートリーダーの測定値のぶれ等。スクリーニングでは概ねCV値10%以内が求められる。

## ②S/B比(Signal/Background ratio)

計算式:  $S/B = Av_{100\%} / Av_{0\%}$

反応前後におけるシグナル強度の比。S/B比が大きいほど読み取り幅が大きくなるので活性有無を判定しやすくなる。通常、最低でもS/B比2以上、できれば3以上。

## ③S/N比(Signal/Noise ratio)

計算式:  $S/N = (Av_{100\%} - Av_{0\%}) / SD_{0\%}$

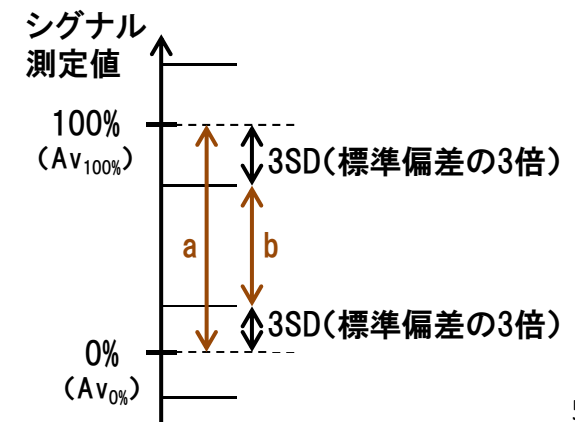
ベースのばらつきに対するシグナルの大きさの比。S/B比と混同されやすいので注意。

## ④Z'-factor

計算式:  $Z' = 1 - (3 \times SD_{100\%} + 3 \times SD_{0\%}) / (Av_{100\%} - Av_{0\%})$

データのばらつきやシグナル強度から計算されるアッセイ系の質の目安となる数字。アッセイ系の精度を表す最も重要な指標。一般に、Z'値が0.5以上あれば系として合格と見なされる。

(別法:  $Z' = b/a$  でも求められる(右図))



## Z' -factor (Z' 値) の計算例

①各プレートに、コントロールウェル(0%、100%)をそれぞれ4ウェル以上置く

②あるプレートのコントロールウェルの測定値が以下の通りであったとする。

0%コントロール	260、250、275、255
100%コントロール	1200、1300、1000、1100

③計算

0%コントロール	平均値260、標準偏差10.8
100%コントロール	平均値1150、標準偏差129.1

よって

$$Z' = 1 - (3 \times 129.1 + 3 \times 10.8) / (1150 - 260) = 0.53$$

**Z' 値が0.5以上であるので、このプレートは問題なしと判断できる**

参考: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/108705719900400206>