

田口メソッドを用いた実験条件の最適化

清水顕史

生物研究を上手に進めるためには、実験条件¹の最適化は不可欠です。新たに実験を立ち上げる場合は当然のこと、従来法を改善する場合にも、十分な条件検討はその後の研究の進度を左右するといっても過言ではありません。例えば PCR 実験で、目的のバンドを上手に増幅できる条件を探したい場合を考えてみましょう。新たに設計したプライマーで思うような特異的バンドが増幅できなかった場合、PCR 条件を見直す必要があるはずで、その場合、アニーリング温度や鋳型 DNA 量、プライマー濃度、MgCl₂濃度などの複数種類の因子²について条件を検討することになるでしょう。期待する増幅産物を得るため、適切な反応条件を探索するにはどうすればよいでしょう？

複数の制御因子が関係する反応系について、最適条件を探索するための一番実直な方法は、各因子の組合せを総当たりで調べることです。例えば 4 種類の制御因子を 3 水準ずつで最適な組み合わせを探す場合、 $3^4=81$ 通りの実験を比較すればよいことになります(表 1)。

表 1 制御因子 (I ~IV) 各 3 水準 (A, B, C) の全組合せ数

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|----|---|---|---|---|----|---|---|---|---|----|---|---|---|---|----|---|---|---|---|
| 1 | A | A | A | A | 19 | A | C | A | A | 37 | B | B | A | A | 55 | C | A | A | A | 73 | C | C | A | A |
| 2 | A | A | A | B | 20 | A | C | A | B | 38 | B | B | A | B | 56 | C | A | A | B | 74 | C | C | A | B |
| 3 | A | A | A | C | 21 | A | C | A | C | 39 | B | B | A | C | 57 | C | A | A | C | 75 | C | C | A | C |
| 4 | A | A | B | A | 22 | A | C | B | A | 40 | B | B | B | A | 58 | C | A | B | A | 76 | C | C | B | A |
| 5 | A | A | B | B | 23 | A | C | B | B | 41 | B | B | B | B | 59 | C | A | B | B | 77 | C | C | B | B |
| 6 | A | A | B | C | 24 | A | C | B | C | 42 | B | B | B | C | 60 | C | A | B | C | 78 | C | C | B | C |
| 7 | A | A | C | A | 25 | A | C | C | A | 43 | B | B | C | A | 61 | C | A | C | A | 79 | C | C | C | A |
| 8 | A | A | C | B | 26 | A | C | C | B | 44 | B | B | C | B | 62 | C | A | C | B | 80 | C | C | C | B |
| 9 | A | A | C | C | 27 | A | C | C | C | 45 | B | B | C | C | 63 | C | A | C | C | 81 | C | C | C | C |
| 10 | A | B | A | A | 28 | B | A | A | A | 46 | B | C | A | A | 64 | C | B | A | A | | | | | |
| 11 | A | B | A | B | 29 | B | A | A | B | 47 | B | C | A | B | 65 | C | B | A | B | | | | | |
| 12 | A | B | A | C | 30 | B | A | A | C | 48 | B | C | A | C | 66 | C | B | A | C | | | | | |
| 13 | A | B | B | A | 31 | B | A | B | A | 49 | B | C | B | A | 67 | C | B | B | A | | | | | |
| 14 | A | B | B | B | 32 | B | A | B | B | 50 | B | C | B | B | 68 | C | B | B | B | | | | | |
| 15 | A | B | B | C | 33 | B | A | B | C | 51 | B | C | B | C | 69 | C | B | B | C | | | | | |
| 16 | A | B | C | A | 34 | B | A | C | A | 52 | B | C | C | A | 70 | C | B | C | A | | | | | |
| 17 | A | B | C | B | 35 | B | A | C | B | 53 | B | C | C | B | 71 | C | B | C | B | | | | | |
| 18 | A | B | C | C | 36 | B | A | C | C | 54 | B | C | C | C | 72 | C | B | C | C | | | | | |

この方法には因子数が増えると組合せ数が指数関数的に増える、という重大な欠点があります。因子の数を 2 倍にするだけで必要な実験数は 81 倍に増えてしまいます($3^8=6561$)。現実的には実験不可能になるでしょう。

こういう場合のありがちな対案は、調べる因子数を 1~2 個に減らすことですが、この方

¹ 培養・栽培実験や分子生物実験などおよそ全ての実験を含みます

² 条件検討の対象となる因子を、制御因子 (control factor) といいます。制御因子は実験者が制御できます。

法は因子の選び方に結果の良し悪しが左右されます。つまり、目の付けどころ（探し所）が拙いと、適切な実験条件を見つけ損なうこととなります。やはり、何か新しい研究成果や、斬新な最適化条件を探索するためには、広範な条件検討をしておくべきでしょう。

条件検討する因子数を減らさずに最適条件を効率よく検討するための方法に、田口メソッド³があります。田口メソッドでは（実験計画法を数理的な基礎とする）直交表を利用した実験配置を利用するため、より少ない実験数で網羅的な条件検討が可能になります。各因子3水準を探索する場合、田口メソッドで要する実験数は、因子数 k に対し $E=2k+1$ です（ E が3の倍数でないとき、必要な実験数 E より大きい直近の3の倍数とする）。例えば表1の場合は、田口メソッドなら9種の実験で済みます（表2a）。因子数を2倍にした場合でも、18通りの実験で済みます（表2b）。

表2 4因子の場合(a)と8因子の場合(b)の、各因子3水準(A, B, C) 試験用の直交表.

| a. | [1] | [2] | [3] | [4] | b. | [1] | [2] | [3] | [4] | [5] | [6] | [7] | [8] |
|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | A | A | A | A | 1 | A | A | A | A | A | A | A | A |
| 2 | A | B | B | B | 2 | A | A | B | B | B | B | B | B |
| 3 | A | C | C | C | 3 | A | A | C | C | C | C | C | C |
| 4 | B | A | B | C | 4 | A | B | A | A | B | B | C | C |
| 5 | B | B | C | A | 5 | A | B | B | B | C | C | A | A |
| 6 | B | C | A | B | 6 | A | B | C | C | A | A | B | B |
| 7 | C | A | C | B | 7 | B | C | A | B | A | C | B | C |
| 8 | C | B | A | C | 8 | B | C | B | C | B | A | C | A |
| 9 | C | C | B | A | 9 | B | C | C | A | C | B | A | B |
| | | | | | 10 | B | A | A | C | C | B | B | A |
| | | | | | 11 | B | A | B | A | A | C | C | B |
| | | | | | 12 | B | A | C | B | B | A | A | C |
| | | | | | 13 | C | B | A | B | C | A | C | B |
| | | | | | 14 | C | B | B | C | A | B | A | C |
| | | | | | 15 | C | B | C | A | B | C | B | A |
| | | | | | 16 | C | C | A | C | B | C | A | B |
| | | | | | 17 | C | C | B | A | C | A | B | C |
| | | | | | 18 | C | C | C | B | A | B | C | A |

田口メソッドでは、各因子の最適化の指標として S/N 比(signal-to-noise ratio)という 2 次の損失関数を考慮します。

$$\text{S/N 比} = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_i^n \frac{1}{y_i^2} \right)$$

ここで、 n は各因子の繰返し数で、 y は条件検討により最適化したい反応の最終収量です。

³ 日本では品質工学という分野名でも知られ、生産性の効率的向上を目指す応用的学問のこと。創始者の田口玄一博士の名をとって Taguchi method と呼ばれることもある。詳しい数理的理論を勉強したい場合は、田口玄一『第3版 実験計画法 上・下』（丸善）など

各因子の S/N 比を最大にする水準を最適値と見なします。つまり、各水準を x 軸とし S/N 比を y 軸とするプロットを考え、重回帰式 $S/N \text{ 比} = ax^2 + bx + c$ の最大値を与える x を最適水準とみなします。重回帰式が極大値を持たない場合、水準の探索範囲を変えて条件検討しなおすべきかもしれません。

田口メソッドを用いた PCR 実験の最適化例が幾つか論文発表されています (Ballantyne et al. 2008; Cobb and Clarkson 1994; Caetano-Anolles 1998)。以下では、Cobb and Clarkson(1994)で紹介されている田口メソッドの使用例をみてみましょう。ある特異的 PCR 産物の増幅効率を上げるための条件検討で、[1]プライマー濃度 (7.5, 15.0, 30.0 pmoles)、[2]鋳型 DNA 濃度(1.0, 2.0, 6.0ng)、[3]MgCl₂濃度 (0.5, 1.0, 5.0mM)、[4]dNTP 濃度(0.05, 0.2, 0.4mM)の、4 因子各 3 水準 (A,B,C とする) は、表 2a の直交表を使うと 9 種類の実験で比較できることになります。この実験を 3 反復行って、目的とする PCR 産物の収量(y_i)を定量すると表 3 のようになりました。

表 3 直交表に基づく実験結果(4 因子 3 水準) (Cobb and Clarkson 1994 の Fig. 1 より)。

| reaction | i | | | | | | | | |
|-------------|----------|----------|----------|-----|----------|-----|-----|-----|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 反復1 | 34 | 38 | 43 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 77 |
| 反復2 | 30 | 29 | 36 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 63 |
| 反復3 | 43 | 38 | 47 | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 69 |
| 平均(y_i) | 35.7 | 35.0 | 42.0 | 0.0 | 15.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 69.7 |
| $1/y_i^2$ | 0.000786 | 0.000816 | 0.000567 | 1 | 0.004444 | 1 | 1 | 1 | 0.000206 |

* y_i が 0 の場合、S/N 比の計算の都合上 $1/y_i^2=1$ としている。

反応 ($i=1\sim 9$) の $1/y_i^2$ (表 3) より、各因子各水準別に S/N 比を計算します。例えば Primer 濃度の水準 A (=7.5pmoles) の S/N 比は $-10 \times \log((0.000786+0.000816+0.000567)/3) = 31.41$ と計算します。4 因子 \times 3 水準の結果をまとめると表 4 のようになります。

表 4 各因子各水準の S/N 比

| | A | B | C |
|-------------------------|--------------|-------------|-------------|
| [1]Primer濃度 | 31.41 | 1.75 | 1.76 |
| [2]DNA濃度 | 1.76 | 4.75 | 4.77 |
| [3]MgCl ₂ 濃度 | 1.76 | 4.77 | 4.75 |
| [4]dNTP濃度 | 27.42 | 1.76 | 1.76 |

表 4 を因子毎にプロットすると図 1 のようになり、プロットに適合させた重回帰線の最大値から最適水準を探索します。Primer 濃度と dNTP 濃度は下に凸なので、それぞれ 2.5mM と 0.05mM を最適とみなし、DNA 濃度と MgCl₂濃度は極大値 4.0ng と 3.0mM を

最適水準とします。

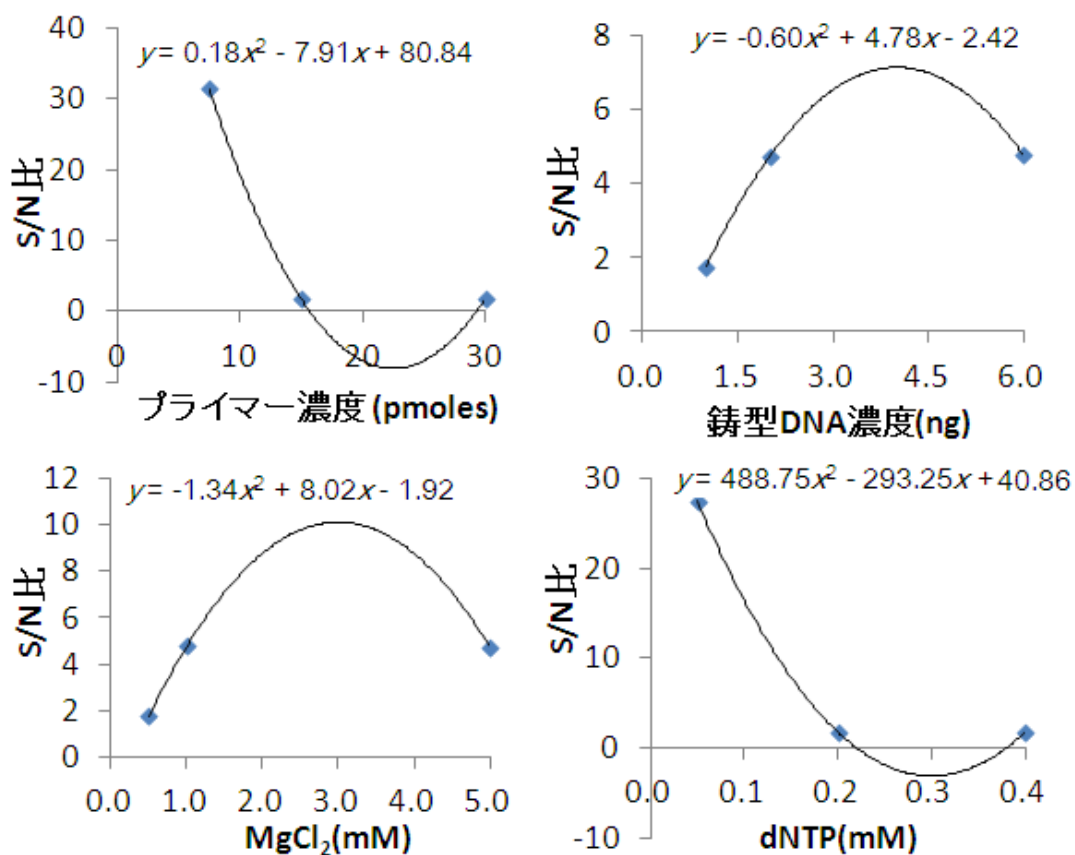


図1 因子別の水準の最適化 (Cobb and Clarkson 1994 の Fig. 2 より)

実験条件の検討をより詳細に行う場合には、水準の最適化を何段階かに分けて行います。つまり最初に広い範囲で水準をふりわけ最適化を行い、次に最適化水準の周りを細かく区切った水準で条件検討します。

因子数や水準数に応じた直交表は田口(1976,1977)や、品質工学についての解説書から手に入れることができるでしょう。

参考文献

- Ballantyne K, van Oorschot, R, Mitchell R (2008) *Forensic SciInt Genet Supple Ser* 1:7-8.
- Caetano-Anolles G (1998) *BioTechniques* 25:472-480.
- Cobb B.D. and Clarkson J. (1994) *Nucleic Acids Research* 22:3801-3805.
- Thanakiatkrai P. and Welch L. (2011) *Int J. Legal Med.* (Online First)
- 田口玄一『第3版 実験計画法 上』(1976 丸善)
- 田口玄一『第3版 実験計画法 上』(1977 丸善)