

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5567567号
(P5567567)

(45) 発行日 平成26年8月6日(2014.8.6)

(24) 登録日 平成26年6月27日(2014.6.27)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/72 (2006.01)	GO 1 N 33/72 A
GO 1 N 30/86 (2006.01)	GO 1 N 30/86 J
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 Q
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 V
	GO 1 N 30/88 D

請求項の数 22 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-523882 (P2011-523882)	(73) 特許権者 591099809
(86) (22) 出願日 平成21年8月13日 (2009.8.13)	バイオーラッド ラボラトリーズ, インコーポレイティド
(65) 公表番号 特表2012-500401 (P2012-500401A)	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハーキュルズ, アルフレッド ノーベル ドライブ 1000
(43) 公表日 平成24年1月5日 (2012.1.5)	(74) 代理人 100099759
(86) 国際出願番号 PCT/US2009/053746	弁理士 青木 篤
(87) 国際公開番号 W02010/021914	(74) 代理人 100092624
(87) 国際公開日 平成22年2月25日 (2010.2.25)	弁理士 鶴田 準一
審査請求日 平成24年8月13日 (2012.8.13)	(74) 代理人 100114018
(31) 優先権主張番号 12/196, 132	弁理士 南山 知広
(32) 優先日 平成20年8月21日 (2008.8.21)	(74) 代理人 100165191
(33) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 河合 章

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析物の比を決定する校正表面方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の異なる分析物の濃度の比を決定する方法であって、
二つ以上の分析物の二つ以上の個別の分析物反応を取得するために、選択した測定プロセスを用いてサンプル中の二つ以上の分析物の反応を測定し、

前記選択した測定プロセスを用いて取得した前記二つ以上の個別の分析物反応の一次関数として前記二つ以上の分析物の濃度の比を規定する一つ以上の変換法を選択し、前記一次関数は、前記濃度の比を出力する多変数回帰モデルを有し、前記回帰モデルの複数の変数は、前記二つ以上の個別の分析物反応を有し、

選択した前記一つ以上の変換法と、前記二つ以上の個別の分析物反応とを用いることによって、前記サンプル中の前記二つ以上の分析物の濃度の比をプロセスにより算出することを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記一次関数から出力される比は、ある分析物の濃度を他の分析物の濃度で除算したものと規定される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記一次関数は、回帰変数としての測定された個別の分析物反応を有する多変数回帰モデルを用いることによって前記測定された個別の分析物反応を前記分析物の比に関連させる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

前記多変数回帰は、変数が整数の乗数となる分析物の反応の積である多項回帰である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記一つ以上の変換法で用いられる前記二つ以上の個別の分析物反応は、前記一つ以上の変換法の一部として変換が行われる請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記変換によって、回帰モデルで用いられる回帰項の数を減少させる請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記変換によって、長い実験校正間隔(longer laboratory calibration interval)を容易にする請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記変換によって、実験校正(laboratory calibration)に必要な校正数を減少させる請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記変換は、前記個別の分析物反応の二つを算術的に組み合わせる請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

前記変換は、

【数 1】

20

$$x_1 = [(z_1 - a_{12})^{a_{11}} - a_{13}] + [(z_2 - a_{22})^{a_{21}} - a_{23}]$$

$$x_2 = [(z_2 - b_{12})^{b_{11}} - b_{13}] + [(z_1 - b_{22})^{b_{21}} - b_{23}]$$

として規定され、この場合、 z_1 及び z_2 は、前記測定された分析物反応であり、 x_1 及び x_2 は、変換された反応であり、 a_{11} 、 a_{12} 、 a_{13} 、 a_{21} 、 a_{22} 及び a_{23} は、校正することができる係数である請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記変換は、規則的なユーザ校正スケジュールで決定されない一つ以上の係数を用いる請求項 5 に記載の方法。

【請求項 12】

前記変換は、ユーザロットスケジュールで決定される一つ以上の係数を用いる請求項 5 に記載の方法。

【請求項 13】

前記選択した測定プロセスは HPLC である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 14】

前記選択した測定プロセスは免疫測定法である請求項 5 に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記選択した測定法は、電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、分光法、クロマトグラフィ、表面プラズモン共鳴のうちの一つである請求項 5 に記載の方法。

【請求項 16】

前記分析物の一つ以上は、タンパク質、炭水化物又は核酸である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 17】

前記分析物は、糖タンパク質である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 18】

前記分析物の一つは、ヘモグロビン A1c である請求項 17 に記載の方法。

50

【請求項 19】

前記二つの分析物は、ヘモグロビンのグリコシル化形態及びトータルヘモグロビンである請求項 5 に記載の方法。

【請求項 20】

二つ以上の分析物の濃度の比を測定する装置であって、
 サンプル中の二つ以上の分析物の反応を測定することができる測定モジュールと、
 前記測定モジュールからの測定された分析物反応を格納するメモリと、
 前記測定モジュールから取得した分析物の測定された反応の一次関数として二つ以上の分析物の濃度の比を規定する一つ以上の変換方法を実行する命令を有するコンピュータ読取可能コードを含み、前記一次関数は、前記濃度の比を出力する多変数回帰モデルを有し、前記回帰モデルの複数の変数は、前記二つ以上の個別の分析物反応を有する、コンピュータ読取可能媒体と、

10

前記一つ以上の変換法を用いて前記二つ以上の分析物の濃度の比を計算するために前記コンピュータ読取可能媒体の前記コンピュータ読取可能コードを実行するプロセッサと、
 を備える装置。

【請求項 21】

前記測定モジュールは、前記分析物の反応を測定するために多重(multiplex)免疫測定法を用いる請求項 20 に記載の装置。

【請求項 22】

サンプル中の異なる分析物の濃度の比を決定する命令を有するコンピュータ読取可能なコードを有する非一時的コンピュータ読取可能媒体であって、前記コンピュータ読取可能なコードは、

20

二つ以上の分析物の二つ以上の個別の分析物反応を取得するために、選択した測定プロセスを用いてサンプル中の二つ以上の分析物の反応を測定するコードと、

前記選択した測定プロセスから取得した分析物の二つ以上の個別の反応の一次関数として二つ以上の分析物の比を規定する変換法を選択し、前記一次関数は、前記濃度の比を出力する多変数回帰モデルを有し、前記回帰モデルの複数の変数は、前記二つ以上の個別の分析物反応を有する、コードと、

前記選択した変換法及び前記サンプルからの測定された分析物反応を用いて前記サンプルの二つ以上の分析物の濃度の比を算出するコードと、

30

を備えることを特徴とするコンピュータ読取可能媒体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2008年8月21日に出願された米国非仮特許出願第12/196,132号(代理人整理番号02558B-082500US)の継続出願であり、その利益を主張し、その内容は、参照によりそのままここに組み込まれる。

【0002】

1. 発明の分野

【0003】

本発明は、一般的に、サンプル中の分析物の比を測定する方法に関する。その方法は、一般的に、結果を比で表現する分析物の任意の対に適用することができる。さらに、複数の比を、分析物の複数の対の比で表現することができる。

40

【背景技術】

【0004】

2. 従来技術の説明

【0005】

サンプル中の2以上の分析物の比を算出することは、様々な状況において有用な比較である。比は、サンプル中の分析物の組成又は濃度の変動を補償するために頻繁に用いられる。例えば、尿に存在する分析物を測定するとき、所定のサンプルの分析物の濃度が著し

50

く変動する可能性がある。これらの濃度変動を、サンプル中に存在する異なる分析物間の比を作り出すことによって正規化することができる。例えば、比を、尿の分析物の濃度と尿のクレアチニンの濃度との間で作り出すことができる。サンプル中の二つの分析物の間でこのような関係を作り出すことによって、濃度の変動を考慮した更に有意義な測定を行うことができる。総タンパク質又はアルブミンのような特定のタンパク質の濃度に対する組織中の所望の分析物の濃度を正規化することもできる。比は、測定中の相関誤差、例えば、希釈誤差を補償することもできる。

【 0 0 0 6 】

分析物の濃度比を計算する最も一般的な従来の方法の簡単な説明を、図 1 に示す。

【 0 0 0 7 】

ステップ 1 0 1 において、検体を患者から取り出す。検体の例は、血液、尿又は他の体液を含む。検体は、分析物の比を測定し及び算出するサンプルの基(basis)を形成する。検体は、患者から直接来る必要はない。検体は、他のソースから利用することができる。

【 0 0 0 8 】

ステップ 1 0 2 において、検体を予処理サンプルに変換する。予処理サンプルを、テストサンプルと称することもできる。このステップは、任意の分析物の測定が行われる前に検体に対して行われることから成る。例えば、所定の例において、検体を標本化し、特定量によって希釈することができる。他の例において、抗凝血剤を検体に加えることができる。このステップは、全体が変質しない検体(entire unaltered specimen)を予処理サンプルとして用いるときには任意である。

【 0 0 0 9 】

ステップ 1 0 3 及び 1 0 4 においてサンプルが測定される。これら二つのステップにおいて、サンプルの関心の量は、反応で表現される。ステップ 1 0 3 は、表示用の予処理サンプルの準備ができていない機器によって行われる全ての処理から成る。サンプルの処理は、様々なステップを含むことができる。一例として複数の分析物のサンドイッチ免疫測定法(multi-analyte sandwich immunoassay)を用いることによって、サンプルは、固相に付着する抗体又は結合試薬(binding reagents)と反応し、固相は、非結合物質(unbound material)を除去するよう洗浄され、1 以上の標識抗体又は結合試薬に反応し、次の反応の表示のために非結合標識抗体を除去するよう洗浄される。他の例は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、免疫測定法、電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、紫外/可視/赤外分光法、ラマン分光法、表面増感ラマン分光法、質量分析、ガスクロマトグラフィー等を含む。サンプルに対して処理ステップを行う必要がない場合があってもよい。

【 0 0 1 0 】

ステップ 1 0 4 において、比に用いられるサンプル中の各分析物の反応を決定するために、選択した表示(reading)法を用いる。ステップ 1 0 4 を、分析物(反応)表示と称する。適切な表示法は、蛍光、吸光度、反射率、イオン電流、電気化学ポテンシャル、光学密度、色、表面プラズモン共鳴等を含む。選択した処理法及び表示法は、測定されるサンプル及び分析物の性質に依存する。選択した測定法を用いて測定される分析物の反応を、選択した方法に適切な任意の単位とすることができる。これらの単位を、蛍光単位(fluorescence units)、光学密度、色、イオン電流、化学発光単位(chemiluminescence units)、電気信号等とすることができる。分析物を、多重化形式(multiplexed format)で測定することもでき、この場合、複数の分析物が 1 回(single pass)で測定され、又は複数の分析物を複数の個別的分析において測定することができる。

【 0 0 1 1 】

その後、分析物の反応は、対応する濃度に変換される。このステップをステップ 1 0 5 及び 1 0 6 に示す。典型的には、この変換は、較正曲線のような手段(device)を用いることによって行われる。

【 0 0 1 2 】

分析物の濃度の比を計算する前に各分析物の反応を個別に濃度値に変換する必要がある。分析物の濃度値は、所定の分析物の測定された反応だけでなくサンプル中の他の分析物

10

20

30

40

50

の反応にも依存しうる。その理由は、分析物間の交差反応のような相互作用があるからである。選択した測定法を用いて測定されたサンプル中の分析物の反応と同一サンプル中の分析物の濃度との間の関係は、典型的には非線形的である。このような非線形的な関係のために、分析物の反応の比は、分析物の濃度の比とは全く異なる。したがって、分析物の濃度の比を計算すべき場合に比を計算する前に各分析物の濃度を個別に算出する必要がある。

【 0 0 1 3 】

較正曲線は、典型的には、分析物の反応を濃度値に変換するために用いられる。分析物の較正曲線は、曲線のモデルを選択し、任意の測定を行う前に分析物の濃度が既知であるサンプルのセットから分析物の反応を測定してモデル係数の値を決定することによって作り出すことができる。これらの既知のサンプルから得られた分析物の反応を、濃度が未知であるサンプル中の分析物の濃度を推定するために用いられる較正曲線を作り出すためにグラフ化することができる。濃度値に変換すべき各分析物の反応に対して個別の較正曲線を作り出す必要がある。実際には、決定された係数値を有するモデルの式を、グラフ化することなく濃度を直接決定するために用いることができる。較正曲線に対する参照が一般的に用いられる。その理由は、較正曲線に対する参照が較正式に対する参照よりも説明に役立つからである。

10

【 0 0 1 4 】

ステップ 1 0 7 において、所望の分析物の比を決定するために、較正曲線を用いて計算された個別の濃度を用いる。これを、除算のような簡単な数学演算によって行うことができる。分析物の比は、典型的には単位がない(unitless)。

20

【 0 0 1 5 】

測定した比を、異なる測定法を用いて測定した比に整合させるために、ステップ 1 0 7 で取得した比を調整することが時々必要となる。このステップをステップ 1 0 8 に示す。比が特定の測定法を用いて決定されるように比を表すことが多くの場合に一般的であり、このような特定の測定法はステップ 1 0 3 及び 1 0 4 で用いられる方法と同一でないことがあるので、このような追加の変換が行われる。これらの異なる測定法によって取得した分析物の比の間に顕著な違いが存在することがあり、値を、二つの形式間で変換することができる。ステップ 1 0 8 は、特定の分析物の比を最終的にどのように表すかに応じた任意のステップである。標準化された比の測定の追加の情報を、2 0 0 7 年 5 月に刊行された「I D V 技術」の「H b A 1 c を説明するために提案された変更」("Proposed changes for reporting HbA1c", IVD Technology (May 2007))及び 2 0 0 8 年に刊行された「臨床化学」の 5 4 : 6 号の 1 0 9 8 ~ 1 0 9 9 頁の「ヘモグロビン A 1 c 測定の標準化の実現」("Implementation of Standardization of Hemoglobin A1c Measurement", Clinical Chemistry, 54:6, 1098-1099 (2008))で見つけることができ、両方の参考文献は、参照によりそのままここに組み込まれる。

30

【 0 0 1 6 】

分析物の比を決定するこのような既知の方法は、多数の問題を有する。サンプル中の分析物間の相互作用により、既知の方法に誤りが生じうる。第 1 の分析物の反応は、第 2 の分析物の反応に影響を及ぼし、第 2 の分析物の反応を変化させることがある。例えば、免疫測定法のような一部の測定法において、第 1 の分析物の反応を測定するために用いられる第 1 の抗体は、サンプル中の第 2 の分析物と相互作用することもある。このような交差反応は、第 2 の分析物の異なる値の各々に対して第 1 の分析物の異なる較正曲線を必要とする。単一の平均的な較正曲線が第 1 の分析物に対して作り出されるが、これは、当該分析物に対して得られる反応に不正確さ(inaccuracy)が生じうる。さらに、第 2 の抗体がサンプル中の第 1 の分析物に反応することもある。このことは、問題を悪化させる。

40

【 0 0 1 7 】

既知の方法の他の問題は、各分析物に対して較正曲線を作り出し及び維持する必要があることである。これは、各曲線に対する適切な較正モデル及びキャリブレーションの選択を伴う。

50

【0018】

既知の方法の他の問題は、反応レベルで関連付けられる雑音を除去する機会が比較的小さいことである。このような除去は、濃度の比の決定中にのみ行われる。

【0019】

分析物の比を決定する提案方法は、方法の一部としてもはや個別の分析物の濃度を直接用いなくすることによって、分析物の比を決定する従来の方法を改善する。使用を更に簡便にするのに加えて、提案方法は、更に正確な分析物の比を生成する。その理由は、提案方法が本質的にはサンプル中の分析物間の相互作用からの表示に導入される相互作用を処理するからである。提案方法は、単一の校正モデルしか必要とせず、反応レベルで関連付けられる雑音を更に良好に除去することによって、追加の利点を提供することができる。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

新しい提案方法は、分析物の比を取得するために測定方法からの反応を直接用いることによって従来技術を改善する。個別に測定された分析物の反応を濃度値に変換するための校正曲線の使用のような中間変換は、所望の比を取得するために必要とされない。

【課題を解決するための手段】

【0021】

分析物の比を、校正曲線の対を用いることによって反応から決定される濃度の比を取り出すのではなく単一の校正表面(calibration surface)を用いて反応から直接決定する。校正曲線と同様に、表面に内在する校正式を、表面をグラフ化することなく用いることができる。ここで使用するように、表現「校正表面」は、表現「反応表面」(response surface)と同義である。校正表面は、所望の分析物の比を、従属y軸として有し、反応の適切な組合せを、独立 x_1 軸及び x_2 軸として有する。 x_1 軸及び x_2 軸に対して用いられる反応の組合せが、データに適合する簡単なモデルを提供するために最初に選択される。しかしながら、それは、二つの分析物の反応の相関誤差によって生じた最終的な分析物の比の誤差を減少することもできる。良好な適合(good fit)により不適合誤差(lack-of-fit error)を減少し、校正表面を維持するのに必要なキャリブレーションの数を減少させることができる。良好な適合により校正間の時間間隔を増大することもできる。異なるタイプの校正を異なる間隔で行うことができる。例えば、特定ロット(specific lot)の試薬に対してロット特定校正(lot specific calibration)を試薬製造者によって行うことができ、それに対し、実験校正(laboratory calibration)を、患者の標本化及び管理を行う実験室によって比較的短い間隔で行うことができる。

20

30

【0022】

新たな方法は、多くの点で従来技術を改善する。新たな方法は、分析物の反応を分析物の濃度に変換する中間変換をもはや必要としない。校正曲線のような手段は、必ずしも分析物の比を算出するのに特別に適合されておらず、その結果、中間ステップとしてのそのような手段の使用は、従来既知の方法における不正確さの多くにおいて重大な要因となる。

【0023】

中間変換を除外することによって、分析物の測定に導入されるあらゆる雑音も良好に処理する。分析物の反応を、分析物の反応に共通の雑音を減少するように組み合わせることができる。反応の組合せを、変換法の回帰モデルの独立変数として役立てるために用いることができる。

40

【0024】

さらに、測定された分析物の反応を潜在的に妨げうるサンプル中の分析物間のあらゆる相互作用は、この方法において更に良好に説明される。このような不正確さの潜在的な原因は、回帰モデルを作り出すために用いられる既知のサンプルにも存在し、したがって、不正確さは、このモデルにおいて本質的に説明される。特定の分析物にそれぞれ適合した校正曲線の対は、これらの妨害を処理することができず、したがって、このような不正確

50

さの原因を処理することができない。

【0025】

提案方法の他の利点は、(係数において)線形的な回帰モデルを後に説明するように一部の実施の形態で用いる場合に回帰モデルが最小二乗平均誤差を最小にする更に一般的な方法ではなく連立方程式の最小二乗平均解(least-mean-square solutions)を許容することである。これは、更に一般的な方法に関連した大域的最小点ではなく極小を見つけることの問題を回避することによって更に迅速かつロバストな計算を許容する。

【0026】

最後に、新たな方法は、従来の方法よりも簡便である。回帰モデルを作り出した後、反応に対する濃度の校正曲線のような手段を通じて中間値に変換することは必要とされていない。その理由は、新たな方法が測定プロセスを通じて取得した反応を直接用いるからである。一度回帰モデルが作り出されると処理に伴うステップ数が更に少なくなるので、所望の比を見つけるために新たな方法を実行する人にとって更に都合がよくなる。

10

【0027】

一実施の形態は、サンプル中の分析物の一つ以上の比を決定する方法を対象にする。方法は、先ず、二つ以上の個別の分析物の反応を取得するために、選択した測定プロセスを用いてサンプル中の二つ以上の分析物の反応を測定する。次に、一つ以上の変換法を選択する。これらの変換法は、分析物の比を、選択した測定プロセスを用いて取得した個別の分析物の反応の一次関数として規定する。最後に、サンプル中の分析物の一つ以上の比を、選択した一つ以上の変換法及び選択した測定プロセスを用いて取得した個別の分析物の

20

【0028】

他の実施の形態は、二つ以上の濃度比を測定する装置を対象とする。装置は、サンプル中の分析物の反応を測定することができる測定モジュールと、測定モジュールからの測定された分析物の反応を格納するメモリと、分析物の分析物比を測定モジュールから取得した分析物の個別の反応の一次関数として規定する変換法を実行する命令を有するコンピュータ読取可能コードを含むコンピュータ読取可能媒体と、変換法を用いて分析物の濃度比を計算するためにコンピュータ読取可能媒体のコンピュータ読取可能コードを実行するプロセッサと、を備える。

【0029】

他の実施の形態は、分析物の分析物値の比を測定プロセスから取得した分析物の個別の反応の一次関数として規定する変換法を計算する方法を対象とする。方法は、変換法を演算するために用いられる統計的に十分な数の適切なキャリアプレートを選択し、キャリアプレートは、分析物の既知の比を有し、キャリアプレートの分析物の反応を測定するために用いられる測定プロセスを選択し、測定プロセスを用いてキャリアプレートの分析物の反応を測定し、変換法を演算するために用いられる回帰モデルを選択し、変換法を作り出すために回帰モデルを使用し、回帰モデルは、分析物の反応を独立変数として使用し、既知の分析物比を従属変数として使用する。

30

【0030】

他の実施の形態は、選択した測定プロセスを用いてテストサンプル中の分析物の反応を測定するコードと、選択した測定プロセスから取得した分析物の個別の反応の一次関数として分析物の比を規定する変換法を選択するコードと、選択した変換法及びテストサンプルからの測定した分析物の反応を用いてテストサンプルの分析物の比を計算するコードと、を備えるコンピュータ読取可能媒体を対象とする。

40

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、サンプル中の二つの一般的な分析物の比を計算する既知の方法を示すフローチャートである。

【図2】図2は、サンプル中の二つの一般的な分析物の比を計算する提案方法を示すフローチャートである。

50

【図3】図3は、本発明を実施するために用いることができるコンピュータシステムのブロック図である。

【図4】図4は、HPLC測定法によって%A_{1c}を計算する提案方法を示すフローチャートである。

【図4a】図4aは、複数の分析物の免疫測定法によって%A_{1c}を計算する提案方法を示すフローチャートである。

【図5】図5は、HPLC測定法によって生成されたクロマトグラムである。

【図6a】図6aは、HPLCによって取得した反応に対する校正表面法の適用の変動1の校正表面(Calibration Surface)の表示を与えるコンタープロットである。

【図6b】図6bは、図6aの校正表面のパラメータ表示である。

10

【図6c】図6cは、決定された%A_{1c}値と既知の値との間の差を既知の値に対してプロットした、図6aに対応する差のプロットである。

【図7a】図7aは、HPLCによって取得した反応に対する校正表面法の適用の変動2の校正表面の表示を与えるコンタープロットである。

【図7b】図7bは、図7aの校正表面のパラメータ表示である。パラメータ値から独立した結果、単一のラインとなる。

【図7c】図7cは、決定された%A_{1c}値と既知の値との間の差を既知の値に対してプロットした、図7aに対応する差のプロットである。

【図8a】図8aは、HPLCによって取得した反応に対する校正表面法の適用の変動3の校正表面の表示を与えるコンタープロットである。

20

【図8b】図8bは、図8aの校正表面のパラメータ表示である。

【図8c】図8cは、決定された%A_{1c}値と既知の値との間の差を既知の値に対してプロットした、図8aに対応する差のプロットである。

【図9a】図9aは、HPLCによって取得した反応に対する校正表面法の適用の変動4の校正表面の表示を与えるコンタープロットである。

【図9b】図9bは、図9aの校正表面のパラメータ表示である。

【図9c】図9cは、決定された%A_{1c}値と既知の値との間の差を既知の値に対してプロットした、図9aに対応する差のプロットである。

【図10a】図10aは、複数の分析物の免疫測定法によって取得した反応に対する校正表面法の適用の変動5の校正表面の表示を与えるコンタープロットである。

30

【図10b】図10bは、図10aの校正表面のパラメータ表示である。

【図10c】図10cは、決定された%A_{1c}値と既知の値との間の差を既知の値に対してプロットした、図10aに対応する差のプロットである。

【図11a】図11aは、複数の分析物の免疫測定法によって取得した反応に対する校正表面法の適用の変動6の校正表面の表示を与えるコンタープロットである。

【図11b】図11bは、図11aの校正表面のパラメータ表示である。

【図11c】図11cは、決定された%A_{1c}値と既知の値との間の差を既知の値に対してプロットした、図11aに対応する差のプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0032】

40

多様な分析物を対象とした多様な実施の形態で実現することができる分析物の比を計算する改善方法を、種々の実施の形態に従ってここに開示する。特に、異なる実施の形態に対するあり得る分析物は、タンパク質、ペプチド、炭水化物、小分子、核酸、又は計算し及び比として表現することができるその他の物質を含むことができる。

【0033】

2. 提案方法の一般的な説明

【0034】

図2は、一実施の形態による二つの分析物の濃度比の計算を伴う一般的なステップを示す。この説明から明らかのように、プロセス中に異なる変換法を作り出し及び用いることによって、他のタイプの分析物比を生成するためにこの提案方法の他の実施の形態を容易

50

に変更することができる。

【0035】

ステップ201～204は、図1に示したステップ101～104とほぼ同一である。ステップ201において、患者標本を取得する。ステップ202において、この患者標本を予処理又はテストサンプルに変換する。ステップ203及び204は、共に測定プロセスを備える。サンプルは、ステップ203において表示のために処理され、サンプル中の各分析物に対する反応を生成するステップ204において表示される。既知の方法に関連して説明したように、上記ステップの一部を、標本の性質及び分析物の反応を測定するために用いられる測定法に応じて任意にすることができる。

【0036】

図2のステップ203及び204において、サンプル中の分析物の反応を測定するために、選択した測定法を用いる。このステップで測定法を選択するための考察は、ステップ103及び104における考察と同様である。ステップ204における分析物の反応の表示を、サンプル中の結合又は非結合抗体に関連した蛍光タグから発する蛍光の定量化のような種々の技術によって行うことができる。選択した測定法から結果的に得られる反応は、図2の分析物反応1及び分析物反応2としてリストされる。

【0037】

ステップ205において、分析物の比を計算する既知の方法と提案方法との差が明らかになる。図2に示す実施の形態において、このステップは、測定した分析物の反応を所望の分析物の比に直接変換する変換法を用いる。図2で概説したプロセスを開始する前に変換法が作り出される。変換法を、後に更に説明するように一連のステップから構成することができる。複数の分析物の比を取得するために、複数の変換法を、測定された分析物の反応において用いることができる。分析物の反応を所望の分析物の比に変換するための変換を用いた後、プロセスが完了する。

【0038】

図2の実施の形態の変換法を、分析物の反応を分析物の比に変換する任意の数学的関係とすることができる。提案方法の一実施の形態において、変換法は2ステップからなる。第1のステップは、二つ以上の回帰変数(regression variables)を取得するために分析物の反応を組み合わせ又は変換する。第2のステップは、所望の分析物の比を取得するために回帰モデルの回帰変数を用いる。回帰モデルを、多重線形回帰モデルとすることができる。回帰モデルは、更に複雑な回帰モデルを用いることもできる。

【0039】

第1のステップは、二つ以上の回帰変数を取得するために、表示された分析物の反応を機能的に組み合わせる。例えば、一実施の形態において、第1の回帰変数を、二つの分析物の反応の比に設定し、第2の回帰変数を、それ自体独立した(standing on its own)分析物の反応の一つに設定することができる。他の多くのあり得る変換が可能であり、他の変換の例を、この開示で後に更に詳細に与える。

【0040】

変換法の本実施の形態の第2のステップは、所望の比を二つの回帰変数の関数として見つけるために回帰モデルを用いる。回帰の独立変数を、所望の分析物の比とする。この分析物の比を、濃度比又は濃度比に数学的に関連した比とすることができるが、そうである必要はない。変換及び回帰モデルを作り出す必要があり、これらの係数の値は、未知のサンプルの分析物の比を決定するのに用いられる前に決定される。

【0041】

この変換は、所望の分析物の比を決定するために回帰モデルとともに用いられる。この変換は、図1のステップ108を組み組むことができ、したがって、図1の示すような濃度の比を計算する必要を回避する。変換の目的の一つは、データに十分適合する必要のある回帰項の数を減少することである。一部の実施の形態において、定数項、線形項及び必要な場合の線形項の積しか必要としない。一実施の形態において、変換係数と回帰係数の組合せは、係数値の決定を分離する時間間隔によって規定される複数のレベルにグループ

10

20

30

40

50

分けされる。例えば、3レベルのグループ化は、以下の3レベルからなることができる：
1) 間隔がユーザ校正スケジュールによって決定され、2) 間隔が試薬製造者による新たな試薬ロットのリリースによって規定され、3) 間隔が方法又はモデルの変更によって決定される。

【0042】

HbA1cの実施の形態に対する変換及び回帰モデルを一緒に作り出す一方法の一実施の形態の概要を、以下説明する。

【0043】

1. HbA1c値の臨床範囲及び方法によって適合される全Hb濃度の範囲をカバーするサンプルセットを生成。サンプルセットを、範囲をカバーする等しく間隔を開けた値のグリッドとする。そのようなグリッドを、低い値及び高い値で開始するとともに希釈のセットを実行することによって取得することができる。変換及び回帰モデルが複雑でない場合には5×5グリッドが適切であり、それに対し、変数及び回帰モデルが複雑である場合には9×9グリッドが適切である。所望の濃度範囲をカバーするサンプルが利用できない場合、このステップで概説したような一連の希釈を用いる必要がない。

【0044】

2. 3組の(in triplicate)サンプルを処理(run)する。反応の全ては、ここでは自動校正と称されるプロセスにおけるキャリブレーション及び未知なもの(unknowns)の両方として用いられる。

【0045】

3. 不適合許容基準(Lack-of-Fit acceptance criteria)を満足し、変換係数を最適化し、かつ、回帰モデル係数値を決定すると予測することができる最少の数の項を含む変換及び回帰モデルを用いた開始。

【0046】

4. 不適合許容基準を満足するまで変換又は回帰モデルに項を系統的に追加する。

【0047】

このHbA1cの実施の形態の更なる詳細は、この開示において後に含まれる。

【0048】

図3は、本発明に一実施の形態を実施するために用いることができるコンピュータシステム300のブロック図である。コンピュータシステム300は、複数の入力モジュールを有する。分析物測定モジュール301は、テストサンプル中の分析物の反応を測定するために用いられる。このモジュールは、分析の反応を測定するために選択された測定法に応じて本発明の異なる実施の形態間で変更される。標準的なキーボード302及びマウス303も示す。コンピュータシステム300は、コンピュータ内に種々の典型的なコンピュータ部品を有する。これらの部品は、システムバス304、一つ以上のディスクドライブ305、RAM306及びプロセッサ307を有する。実施の形態の正確な性質に応じて他の部品が存在してもよい。図3は、システムのユーザに情報を表示することができるモニタ308も示す。

【0049】

本発明の実施の形態において、ステップ202の場合ように作成された予処理サンプルが分析物測定モジュール301に配置され、この場合、サンプルが更に処理され、サンプル中の分析物の反応が測定される。その後、この情報は、システムバス304に沿ってコンピュータシステムに転送され、プロセッサ307を用いることによって、適切な変換法が分析物反応データに適用される。変換法を実現するためにプロセッサ307が実行する命令は、RAM306やディスクドライブ305のようなコンピュータ読取可能媒体に格納される。変換法をこの同一媒体に格納することもできる。結果的に得られる比をモニタ308に表示することができる。本発明の他の実施の形態は、他の通信手段を用いて分析物の比を出力することができる。例えば、コンピュータシステムは、測定された比を、プリンタを用いて印刷し、又は、測定された比をネットワーク上の他のコンピュータに送信することができる。

【 0 0 5 0 】

ヘモグロビンの実施の形態

【 0 0 5 1 】

提案方法の一実施の形態として、HbA1cの測定に着目する。HbA1cは、糖尿病患者において最も一般的に測定される一つの特定タイプのグリコシル化ヘモグロビンである。人間の赤血球は、ブドウ糖が自由に通過するのを許容し、グリコシル化ヘモグロビンHbA1cは、ブドウ糖を添付することによってヘモグロビン分子の鎖N末端バリンを形成したヘモグロビン成分を参照する。非糖尿病患者において、90%を超えるトータルヘモグロビンはグリコシル化していない。HbA1cそれ自体は、典型的には約4~7%のトータルヘモグロビンを構成する。糖尿病患者において、HbA1cの濃度の割合は、
10

【 0 0 5 2 】

グリコシル化ヘモグロビンは、血液中の環境ブドウ糖濃度(ambient glucose concentration)に正比例する割合で形成される。ブドウ糖とヘモグロビンとの間の反応は、最終的には不可逆かつ低速である。その結果、人間の赤血球の120日の生存期間中にトータルヘモグロビンのごく一部しか糖化されない。この結果、血液中のグリコシル化ヘモグロビンの濃度は、長期間血糖値をモニタするために用いることができる血糖値の重み付けされた移動平均を提供する。2~3ヶ月の期間をカバーするこの移動平均は、糖尿病患者の血糖管理を評価することができる。トータルヘモグロビンに対するHbA1cの比は、糖尿病を患った患者の健康状態を測定する共通方法となる。
20

【 0 0 5 3 】

HbA1cレベルを、多数の方法で表現することができ、そのように行うために許容される方法の一つは、トータルヘモグロビンの割合(%HbA1c)として全米グリコヘモグロビン標準化プログラム(NGSP)単位でHbA1cを表現することである。他の許容される方法は、mmol HbA1c/mol トータルHbの国際臨床化学連合(IFCC)単位でHbA1cを表現することである。これらの単位における10倍の差の因子に加えて、二つの規格で用いられる異なる基準方法による違いもある。HbS, HbC, HbE, HbA2及びHbFのような他のヘモグロビン変異タンパク質(hemoglobin variant protein)を、トータルヘモグロビンの割合として表現することもできる。
30

【 0 0 5 4 】

HbA1cを測定するHPLC法

【 0 0 5 5 】

提案方法の一実施の形態は、HbA1cを測定するHPLC法を用いる。

【 0 0 5 6 】

図4は、一実施の形態によりHbA1cを測定するHPLC法によるトータルヘモグロビンに対するHbA1cの比の計算を伴うステップを示す。

【 0 0 5 7 】

ステップ401~404は、図1に示すステップ101~104及び図2のステップ201~204とほぼ同一である。ステップ401において、患者検体を取得する。ステップ402において、この患者検体は予処理サンプルに変換され、この予処理サンプルを、
40
時系列のピークとしてクロマトグラフィーカラムから溶出した成分に分けるために、HPLCが用いられる。ステップ404において、成分は吸光度検出器のフローセルを順次通過し、吸光度検出器は、溶出の濃度を、クロマトグラムとして視覚化することができる吸光度値に変換する。クロマトグラムのピークは、予処理サンプルの個別の成分に対応する。その後、ピークのエリアを決定する。ヘモグロビンのグリコシル化成分(glycosylated component)HbGrに対する反応は、単一ピークのエリアとして決定され、それに対し、全成分HbTrに対する反応は、選択したピークのエリアの和である。

【 0 0 5 8 】

表1は、準備した5x5x3サンプルセットからの反応データの表である。最初の二つの列は、mAU-秒におけるHbGrの反応及びHbTrの反応を含み、三番目の列は、
50

5 × 5 × 3 サンプルグリッドの配置に従ってサンプルを識別するために三つの数字の組合せを用いる。IDの一番目の数字は、% A 1 c レベルに対応し、IDの二番目の数字は、H b T c (トータルヘモグロビン濃度) レベルに対応し、IDの三番目の数字は、反復数である。レベル 1 1 は、% A 1 c = 5 . 3 6 5 % お呼び H b T c = 0 . 4 2 g m / L に対応する。レベル 5 5 は、% A 1 c = 1 7 . 4 2 0 % 及び H b T c = 2 . 1 g m / L に対応する。残りのレベルは、レベル 1 1 とレベル 5 5 との間の値で等間隔に配置されている。このサンプルセットに対して、希釈は、処理ステップではなく予処理ステップ中に行われる。

【表 1】

HbGr mAU-sec	HbTr mAU-sec	ID
27.874	825.532	11.1
28.142	835.368	11.2
27.789	828.799	11.3
57.043	1641.812	12.1
56.932	1643.280	12.2
55.839	1638.694	12.3
86.996	2467.903	13.1
87.044	2459.777	13.2
86.062	2445.601	13.3
117.456	3256.589	14.1
119.026	3261.055	14.2
118.241	3258.822	14.3
153.309	4102.811	15.1
156.254	4108.235	15.2
153.971	4087.014	15.3
46.377	831.970	21.1
46.392	833.943	21.2
46.363	829.997	21.3
96.064	1647.040	22.1
95.818	1644.891	22.2
95.366	1635.990	22.3
150.889	2500.300	23.1
150.066	2471.254	23.2
151.467	2469.004	23.3
208.266	3248.588	24.1
210.694	3245.441	24.2
210.551	3245.939	24.3
275.539	4055.995	25.1
280.188	4056.226	25.2
280.449	4063.896	25.3
65.376	835.830	31.1
64.936	835.760	31.2
65.002	832.391	31.3
136.513	1652.592	32.1
137.408	1660.416	32.2
137.788	1654.845	32.3
216.058	2467.202	33.1
218.470	2491.033	33.2
217.267	2484.372	33.3
303.501	3297.756	34.1
307.621	3297.322	34.2
309.769	3299.064	34.3
406.586	4149.740	35.1
403.200	4117.404	35.2
405.964	4084.984	35.3
82.488	830.766	41.1
82.900	829.330	41.2
83.236	827.317	41.3
175.422	1636.971	42.1
175.380	1632.871	42.2
176.416	1632.987	42.3
285.797	2496.466	43.1
285.513	2491.663	43.2
287.114	2490.088	43.3
396.906	3294.759	44.1
399.981	3304.702	44.2
399.531	3299.483	44.3
519.127	4145.395	45.1
521.490	4140.787	45.2
524.599	4149.083	45.3
103.458	841.094	51.1
103.671	841.246	51.2
103.402	838.941	51.3
198.905	1518.828	52.1
199.666	1513.088	52.2
201.716	1519.143	52.3
323.081	2311.261	53.1
324.312	2307.017	53.2
326.948	2310.868	53.3
475.945	3247.011	54.1
477.792	3243.755	54.2
479.228	3245.260	54.3
636.777	4201.339	55.1
640.934	4190.424	55.2
638.855	4195.881	55.3

表 1

10

20

30

40

【 0 0 5 9 】

図 5 は、この分離を示すクロマトグラムである。それは、ID = 24.3として表 1 の三番目の列にラベルを付したサンプルに対応する。列 1 の H b G r 値は、m A U - 秒の単位で表現される、504 を付したピークのエリアに対応する。そのピークは、第 2 のピークであり、単一のピークの頂点によって識別される二つの重なり合ったピークのうちの大きいほうである。対となる小さい方のピークは、非常に小さいので識別することができな

50

い。列 2 の H b T r 値は、m A U - 秒の単位で表現される、5 0 1 , 5 0 2 , 5 0 4 及び 5 0 5 を付したピークのエリアの和に対応する。これらは、ヘモグロビンの全ての A (大人) 成分である。ピーク 5 0 3 は、F (胎児) 成分として識別され、従って和に含まれない。

【 0 0 6 0 】

四つの異なる実施の形態を表す四つの変形例を、以下説明する。各変形例は、モデル及び変換によって規定される。各変形例は、モデル及び変換において表 1 の H P L C データを用いることによって構成される。モデルの式は、形態

【 数 1 】

$$y = \beta_{00} + \beta_{10}x_1 + \beta_{01}x_2 + \beta_{11}x_1x_2 + \dots + \beta_{mn}x_1^m x_2^n$$

を有する。この場合、 x_1 及び x_2 は、分析物の反応に関連して規定される変換された変数である。この式は、多項回帰を表し、この場合、変数は、整数の乗数 (integer powers) となる分析物の反応の積である。

【 0 0 6 1 】

(z_1 で表される) H b G r 及び (z_2 で表される) H b T r は、変換

【 数 2 】

$$x_1 = \left[(z_1 - a_{12})^{a_{11}} - a_{13} \right] \div \left[(z_2 - a_{22})^{a_{21}} - a_{23} \right]$$

$$x_2 = \left[(z_2 - b_{12})^{b_{11}} - b_{13} \right] \div \left[(z_1 - b_{22})^{b_{21}} - b_{23} \right]$$

を用いて変換される。

【 0 0 6 2 】

これらの式は、校正表面を規定する。これらの式に対する係数は、サンプルを用いて決定され、この場合、 y の値は既知である。反応 z_1 及び z_2 は、測定によって決定される。一度係数が決定されると、未知のサンプルに対する y の値を決定するために、測定された反応を用いることができる。ヘモグロビン法における H b A 1 c の測定に対して、 y は、% A 1 c と通常称される % H b A 1 c に対応する。

【 0 0 6 3 】

これらの変形例を説明するために用いられる計算は、M A T L A B

【 数 3 】

(©The MathWorks, Inc.)

で開発されたスクリプトを用いて行われる。他のアプリケーションをこのモデリングに用いることもできる。したがって、これらの変形例で用いられる特定のモデル及び変換は、行列を表す M A T L A B フォーマットに基づいた表記で表現される。モデルに対して、含まれる用語は、モデルに対する式の添字に対応する整数の対によって指定される。対の要素はコンマによって分離される。異なる対はセミコロンによって分離される。ペアのセットを識別するために角括弧が用いられる。変換に対して、標準的な M A T L A B 行列の表記は、行列 A によって指定された第 1 の変換及び行列 B によって指定された第 2 の変換が

10

20

30

40

50

用いられる。

【 0 0 6 4 】

例えば、 $A = [5, 5, 1; 1, -5, 3]$ は、 $a_{11} = 5$ 、 $a_{12} = 5$ 、 $a_{13} = 1$ 、 $a_{21} = 1$ 、 $a_{22} = -5$ 及び $a_{23} = 3$ に対応する。モデル項は、モデルの所定の項に対する x_1 又は x_2 の乗数に対応する。例えば、モデル = $[0, 0; 1, 0; 0, 1; 1, 1; 1, 2; 1, 3]$ は、モデル： $y = a_{00} + a_{10}x_1 + a_{01}x_2 + a_{11}x_1x_2 + a_{12}x_1x_2^2 + a_{13}x_1x_2^3$ に対応する。B の項は、同様に生じる。

【 0 0 6 5 】

モデル係数の値を決定するに際し、変換されたデータは、丸め誤差を防止するためにスケール化(scaled)される。スケール化された係数値は、これらがモデル中に出現するとともに H b G r データをスケール A で除算するとともに H b T r データをスケール B で除算することによって行われる。スケール化された値は、係数値とともに存在する。

10

【 0 0 6 6 】

全ての変形例において、自動校正と称されるプロセスが用いられる。データ行列中の 75 サンプルの全ては、キャリブレーションとして用いられ、未知のものとして用いられる。このように決定された誤差は、実行誤差(run error)内にある。「分散成分分析」(Analysis of the Components of Variance)と称される標準的な技術を用いることによって、実行誤差内の誤差は、分散として表現され、成分に分割される。関心のある二つの成分は、(純粋誤差(pure error)とも称される)反復誤差(replicate error)及び不適合(L O F) 誤差(lack-of-fit error)である。反復誤差は、データの品質のインジケータであり、不適合誤差は、データ及びモデルを変換データにするのに用いられる変換及びモデルの品質のインジケータである。不適合誤差の二つの成分がある。高レベル成分は、モデルが % A 1 c の異なる値に良好に適合する方法に関連し、低レベル成分は、モデルが % A 1 c の個別の値に対してトータルヘモグロビン濃度 H b T c の異なる値に良好に適合する方法に関連する。

20

【 0 0 6 7 】

変形例 1 : 変数の変換を伴わない x_1 の線形性

【 0 0 6 8 】

スケール A = 3 0 0 及びスケール B = 2 5 0 0 に対して、
 $A = [1, 0, 0; 0, 0, 0]$ $B = [1, 0, 0; 0, 0, 0]$
 モデル = $[0, 0; 1, 0; 0, 1; 1, 1; 1, 2; 1, 3]$
 係数 = $[1.6899; 84.6864; -0.4049; -154.6571; 110.0661; -27.0000]$

30

【 0 0 6 9 】

図 6 a は、結果的に得られる校正表面のコンタープロットである。コンタープロットの曲線(contours)は、曲線ラベル(contour label)で示した % A 1 c の定数値を表す。“+”の記号は、 x_1 及び x_2 のデータ値である。

【 0 0 7 0 】

図 6 b は、結果的に得られる校正表面のパラメトリックプロットである。パラメトリックプロットの異なるラインは、コンタープロットにおいて等間隔に配置した水平線に対応する x_2 の定数値に対応する。プロットを有する説明文(legend)は、これら x_2 の値を示す。上から下まで、説明文の値は、ラインと同一のオーダーである。

40

【 0 0 7 1 】

図 6 c は、決定された値と既知の値との間の差を既知の値に対してプロットした差のプロットである。既知の値は、データセットを準備するために用いられる希釈の順序から決定される。絶対値が正確でない間、相対値の不正確さは、希釈の不正確さによってのみ決定される。2本の水平方向の破線は、平均からの 1.96 の標準偏差である。表 2 でバイアスと称するこの平均は、0 と僅かに異なる。

【 0 0 7 2 】

50

変形例 2 : 変数の変換を伴う x_1 の線形性及び x_2 の非依存性

【 0 0 7 3 】

スケール A = 1 及びスケール B = 1 に対して、

A = [1 , 0 , 5 ; 1 . 2 , - 4 2 , 0] B = [1 . 2 , - 4 2 , 0 ; 0 , 0 , 0]

モデル = [0 , 0 ; 1 , 0]

係数 = [1 . 5 7 4 ; 5 5 3 . 8 1 6]

【 0 0 7 4 】

図 7 a は、コンタープロットであり、図 7 b は、結果的に得られる校正表面のパラメトリックプロットである。反応が x_1 において線形であり、 x_2 に依存しないので、このパラメトリックプロットは、単一の直線を減少させる。図 7 c は、図 6 c で説明したような差のプロットである。

10

【 0 0 7 5 】

変形例 3 : 変数の変換を伴う x_1 の線形性及び x_2 の線形性

【 0 0 7 6 】

スケール A = 1 及びスケール B = 2 5 0 0 に対して、

A = [1 , 0 , 0 ; 1 , 0 , 0] B = [1 , 0 , 2 5 0 0 ; 0 , 0 , 0]

モデル = [0 , 0 ; 1 , 0 ; 0 , 1 : 1 , 1]

係数 = [1 . 2 3 8 2 ; 1 1 6 . 3 0 1 2 ; 0 . 1 0 6 1 ; - 1 9 . 7 3 2 1]

【 0 0 7 7 】

図 8 a は、コンタープロットであり、図 8 b は、結果的に得られる校正表面のパラメトリックプロットである。モデルは x_1 において線形的であるので、 x_2 の異なる値に対応する図 8 b のラインは直線である。上から下まで、図 8 b の説明文の値は、ラインと同一のオーダーである。 x_2 が線形的である結果、同一の値の x_1 に対してライン間のスペースが等しくなる。交差項 x_1 , x_2 により、ラインは、 x_1 が減少するに従って収束することができる。図 8 c は、図 6 c で説明したような差のプロットである。

20

【 0 0 7 8 】

変形例 3 において、A 及び B の値の結果、 $x_1 = H b G r / H b T r$ 及び $x_2 = H b T r - 2 5 0 0$ となる。第 1 の変換は、反応の比として x_1 を規定し、第 2 の変換は、H b T r の値の予測される範囲の中央に $x_2 = 0$ を置く。この後者の変換は、単なる便宜のためである。

30

【 0 0 7 9 】

変形例 3 は、モデル係数を異なる時間間隔で決定される係数に分割できる方法を示す。行列 A 及び B で表される変換係数を、方法の進展中に設定することができ、その後に変化させる必要はない。四つのモデルパラメータを、試薬製造者により異なるロットの試薬に対して校正することができる。最初の二つの係数を、二つのキャリブレーションのみを用いて短期間で製造所によって校正することができる。キャリブレーションは、好適には、2 5 0 0 のミッドレンジ値付近で H b T r 反応を有する。しかしながら、当該値からの任意の差を、 $x_2 = 0$ に対応する H b T r = 2 5 0 0 に対応した値にキャリブレーションのラベル値を適合させるために現在の係数値を用いることによって適合させることができる。

40

【 0 0 8 0 】

以下の式はこの技術を示す。

モデルの第 1 の式を、

【数 4】

$$K = K_0 + \beta_{01}x_2 + \beta_{11}x_1x_2 \dots\dots\dots (1)$$

と書き直すことができ、この場合、K は、校正（係数の決定）に対する % A_{1c} の既知の値であり、(1) に既知の係数が適用されたときの % A_{1c} の決定された値である。また

50

【数 5】

$$K_0 = \beta_{00} + \beta_{10}x_1 \dots\dots\dots (2)$$

である。校正中、既知の値は、(1)から取得される式により、 $x_2 = 0$ に対して既知の値が有する値に調整される。

10

【数 6】

$$K_0 = K - \beta_{01}x_2 + \beta_{11}x_1x_2 \dots\dots\dots (3)$$

この場合、

【数 7】

$$x_1'$$

20

及び

【数 8】

$$x_2'$$

30

は、非プライム値(unprimed value)が決定されたときからのシステムの変化のために x_1 及び x_2 とは異なる新たに変換された反応である。二つ(以上の) K の既知の値を用いることによって、(3)が K_0 に対して解かれる。これらの K_0 の値は、新たな β_{00} 及び β_{10} が決定される連立方程式を作るために(2)に代入される。これらの新しい値を区別するためにプライム記号を用いることによって、(2)を

【数 9】

$$K_0 = \beta_{00}' + \beta_{10}'x_1' \dots\dots\dots (4)$$

40

と書くことができる。(2)及び(4)の右辺を等しくすることによって、 x_1 と

【数 10】

$$x_1'$$

との間に線形的な関係を与える。

【数 1 1】

$$x_1 = \frac{\beta_{00}' - \beta_{00}}{\beta_{10}} + \frac{\beta_{10}'}{\beta_{10}} x_1' \dots\dots\dots (5)$$

式(5)は、プライムパラメータ(primed parameter)が決定されたときの現在の条件及び非プライムパラメータ(unprimed parameter)が決定されたときの元の条件の下で同一サンプルが測定された場合の x_1 と

10

【数 1 2】

$$x_1'$$

との間の実際の関係に対する線形的な推定である。% A_{1c} を決定するための更新された式は、

【数 1 3】

$$\%A_{1c} = \beta_{00}' + \beta_{10}' x_1' + \beta_{10} x_2 + \beta_{11} x_1 x_2 \dots\dots\dots (6)$$

20

となり、この場合、 x_1 は、(5)により

【数 1 4】

$$x_1'$$

30

から決定される。 x_2 と

【数 1 5】

$$x_2'$$

との間関係が良好でないことが知られている場合、これらの二つを、(6)での使用の際に同等にすることができる。

【数 1 6】

$$x_2 = x_2' \dots\dots\dots (7)$$

40

x_1 の元の電流値と現在の電流値との間に線形的な関係が存在するように変化するとともに x_2 の元の電流値と現在の電流値との間に変化がない条件に対して、(5)、(6)及び(7)は変化を正確に反映する。実際には、線形的な関係が持続し、 x_2 を含む(6)の項は、小さい補正率を表す。したがって、% A_{1c} の変化は、 x_2 の大きさが小さいときには特に x_2 の小さい変化を感知しない。当業者に対して、この説明に対する種々の改善を行うことができる。例えば、繰返しを行うことができる。一度新たなプライム係数が

50

決定されると、新たなプライム係数は、非プライム係数に対して(3)に代入され、結果を改善するために残りのステップを繰り返す。

【0081】

変形例4：変数の変換を伴う x_1 の線形性及び2次の x_2 の依存性

【0082】

スケールA = 1及びスケールB = 2500に対して、

A = [1, 0, 0; 1, 0, 0] B = [1, 0, 2500; 0, 0, 0]

モデル = [0, 0; 1, 0; 0, 1; 1, 1; 1, 2]

係数 = [1.24000; 114.6677; 0.2489; -21.4608; 7.6198]

10

【0083】

図9aは、コンタープロットであり、図9bは、結果的に得られる校正表面のパラメトリックプロットである。 $x_1 x_2^2$ 項の追加により、図9bの直線の間隔を、 x_2 値の異なる対に対して異なるものとするができる。上から下まで、図9bの説明文の値は、ラインと同一のオーダーである。図9cは、図6cで説明したような差のプロットである。図8と、モデルを更に複雑にした図9cとの比較から明らかなように、モデルの追加の項により不適合(LOF)誤差が減少する。 x_2 を含まない項が二つしか存在しないので、短期間の校正を行うために二つのキャリブレーションしか必要としない。しかしながら、更に複雑にしたことによって、モデルの長期間の安定性が落ちるおそれがある。変形例3に対して与えられる形態に従う実例を、この変形例として与えることもできる。

20

【0084】

分散成分の分析

【0085】

表2は、前節で示した四つの変形例に対する分散成分の編集である。表中、LOFは不適合度の略記であり、反復は、反復反応の差から決定される分散成分である。それは、純粋誤差(Pure Error)とも称される。

【表2】

成分	変形例1	変形例2	変形例3	変形例4
%A1cに対するLOF	無視できる	無視できる	無視できる	無視できる
HbTcに対するLOF	0.205139	0.011589	0.034847	0.0141014
反復	0.005328	0.003738	0.003835	0.003736
全体的に補正	0.173475	0.012869	0.032115	0.015009
バイアス	無視できる	無視できる	無視できる	無視できる
全体的に補正なし	0.171162	0.012869	0.031687	0.014809

30

表2

【0086】

変形例1は、他の三つの変形例より大きい反復誤差を有する。変形例3及び4は、両方の反応に共通の誤差の大部分を取り除く変形例1に対する反応の比を用いる。この共通の誤差は、反復に対して用いられるサンプルサイズの差に起因する。 $\%A_{1c}$ の異なる値に対する不適合分散は負であり、したがって、無視しうるものとして報告される。トータルヘモグロビン濃度HbTcの異なる値に対する不適合誤差は、最も重要な要因である。変形例1は、複雑であるだけでなく、この誤差に対して最も大きな値を有する。変形例3は

50

、著しく小さい誤差を有し、変形例 3 が単純であるために、変形例 3 は、更に複雑な変形例 4 及び 2 よりも好ましい。

【 0 0 8 7 】

全ての変形例のバイアスは、 10^{-12} 未満であり、したがって、重要でないものとして報告される。この小さい値は、キャリブレーション及び患者標本と同一のサンプルが用いられる自動校正に固有のものである。この小さい値のために、全体的に補正された分散に対する全体的に補正されていない分散の比は、全部で 75 サンプルが存在するので単純に関連の自由度の比の逆である $74/75$ となる。

【 0 0 8 8 】

これら四つの変形例を説明のために示した。この HPLC データセット及び / 又は異なる HPLC データセットに対しては、他の変形例が更に適切になりうる。

【 0 0 8 9 】

HbA1c の測定のための複数の分析物の免疫測定法

【 0 0 9 0 】

提案方法の他の実施の形態は、HbA1c の測定のための複数の分析物の免疫測定法を用いる。

【 0 0 9 1 】

図 4 a は、HbA1c を測定する複数の分析物の免疫測定法によるトータルヘモグロビンに対する HbA1c の比の計算を伴うステップを示す。

【 0 0 9 2 】

ステップ 404 ~ 409 は、図 1 に示すステップ 101 ~ 104 及び図 2 のステップ 201 ~ 204 とほぼ同一である。ステップ 406 において、患者検体を取得する。ステップ 407 において、この患者検体を、予処理又はテストサンプルに変換し、ステップ 408 において、標識ビーズの集団を生成するために複数の分析物の免疫測定法が用いられ、この場合、トータルヘモグロビン (HbT) ビーズとして標識付けされたビーズに対するグリコシル化ヘモグロビン (HbG) ビーズとして標識付けされたビーズの割合は、グリコシル化ヘモグロビン (HbGc) 及びトータルヘモグロビン (HbTc) の濃度に関連する。これらのビーズは、HbG 及び HbT に対する抗体と、HbG ビーズ又は HbT ビーズとして識別することができる対応する蛍光タグとを有する。これらのビーズは、定量化することができる他の個別の蛍光タグも有する。識別及び定量化のためのこれらのビーズの表示はステップ 409 である。この表示は、識別及び表示のために異なる色の蛍光を発するようビーズを励起する二つのレーザにビーズを通すことによって行われる。HbG ビーズ及び HbT ビーズとして識別されるビーズからの量子化された蛍光の量は、“HbGr = HbG 抗体を有するビーズからの蛍光” 及び “HbTr = HbT 抗体を有するビーズからの蛍光” として示される。

【 0 0 9 3 】

データセットを生成するために $9 \times 9 \times 3$ サンプルが用いられた。最高レベルの %A1c が顕著な飽和量 (amount of saturation) を示したので、それを使用しなかった。サンプルセットを $8 \times 9 \times 3$ サンプルセットまで減少した。残りの最高レベルの %A1c における残りの飽和に加えて、このサンプルセットは、HPLC データセットと比べて反復誤差が約 2 倍になった。免疫測定法に固有の非線形性に加えて、データは、対の一方に対する抗体と対の他方の濃度との間に交差反応を示す。校正表面法の用途の二つの変形例を、このデータセットに対して提供する。これらの変形例を、変形例 5 及び変形例 6 と称する。HPLC データを提供するために用いられる同一の定義及びフォーマットを用いる。多量の未加工データのために、それを表として提供しない。しかしながら、変動成分の分析のテーブルを提供する。

【 0 0 9 4 】

変形例 5 : 6 個の項及び $x_1 = HbGr / HbTr$ を有するモデル

【 0 0 9 5 】

スケール A = 1 及びスケール B = 10000 に対して、

10

20

30

40

50

$A = [1, 0, 0 ; 1, 0, 0]$ $B = [1, 0, 0 ; 0, 0, 0]$
 モデル = [0, 0 ; 1, 0 ; 2, 0 ; 0, 2 ; 2, 1 ; 1, 2]
 係数 = [4 . 1 2 0 2 ; 9 . 5 7 9 3 ; - 1 . 8 6 3 2 ; - 0 . 5 6 6 7 ; 1 . 1 3 5
 3 ; - 0 . 6 7 3 8]
 【 0 0 9 6 】

図 1 0 a は、コンタープロットであり、図 1 0 b は、結果的に得られる校正表面のパラ
 メトリックプロットである。上から下まで、図 1 0 b の説明文の値は、0 . 5 未満の x_1
 の値に対する曲線と同一のオーダーである。図 1 0 c は、決定された値と既知の値の間の
 差を希釈によって決定した既知の値に対してプロットした差のプロットである。水平方向
 の二つの破線は、平均からの 1 . 9 6 の標準偏差である。

10

【 0 0 9 7 】

変形例 6 : 変換によってモデルは x_1 及び x_2 において線形になる

【 0 0 9 8 】

スケール $A = 0 . 0 0 3$ 及びスケール $B = 1 0 0 0 0$ に対して、
 $A = [0 . 7 5 , 0 . 3 6 ; 1 . 5 , 0 , - 5 0 0]$ $B = [0 . 9 3 , 0 , 0 ; 0 ,$
 $0 , 0]$
 モデル = [0 , 0 ; 1 , 0 ; 0 , 1 ; 1 , 1]
 係数 = [5 . 4 0 7 7 ; 0 . 8 3 6 4 ; - 5 . 4 1 8 8 ; 5 2 . 9 5 7 1]

【 0 0 9 9 】

図 1 1 a は、コンタープロットであり、図 1 1 b は、結果的に得られる校正表面のパラ
 メトリックプロットである。上から下まで、図 1 1 b の説明文の値は、0 . 0 0 0 3 未満
 の x_1 の値のラインと同一オーダーであり、0 . 0 0 3 を超える x_1 の値のラインと逆の
 オーダーである。図 1 1 b においてラインの全てが交差する x_1 の値は、図 1 1 a の垂直
 コンター (vertical contour) に対応する。図 1 1 c は、決定された値と既知の値との間の
 差を既知の値に対してプロットした差のプロットである。

20

【 0 1 0 0 】

分散成分の分析

【 0 1 0 1 】

表 3 は、前節で示した二つの変形例に対する分散成分の編集である。用語の使い方は表
 2 と同一である。

30

【表 3】

成分	変形例5	変形例6
%A1cに対するLOF	0.022141	0.002226
HbTcに対するLOF	0.014924	0.042328
反復	0.078614	0.080017
全体的に補正	0.112862	0.123908
バイアス	無視できる	無視できる
全体的に補正なし	0.112339	0.123335

表 3

40

【 0 1 0 2 】

バイアスが無視できるので、全体的に補正された分散に対する全体的に補正されていな
 い分散の比は、全部で 7 2 サンプルを 3 回反復するので単純に関連の自由度の比の逆であ

50

る 2 1 5 / 2 1 6 となる。

【 0 1 0 3 】

これら二つの変形例は、同程度の分散成分を与える。これらは、モデルの複雑さと変換の複雑さとの間で行うことができる多数のトレードオフの二つを表す。変形例 6 は、四つのモデル係数に加えて五つの変換係数を有しながら両方の変数の線形性を実現する。

【 0 1 0 4 】

モデル係数と変換係数との間の最適なバランスは、校正表面が用いられる特定の用途に依存する。これらの変形例を示すために用いられる一般的な変換モデルの他の形態が有益となり得る。これらの変形例で用いられる場合よりも複雑な組合せで変数が用いられるモデルも有利となることができ、他の任意の変換を行う必要を減らすことができる。

10

【 0 1 0 5 】

「一つ」又は「その」("a", "an" or "the")の記述は、特に反対であることを意図しない場合には「一つ以上」を意味する。

【 0 1 0 6 】

この教示をこれらの典型的な実施の形態に関連して説明したが、当業者は、過度の実験を行うことなくこれらの実施の形態の幾多の変更及び変形が可能であることを容易に理解する。そのような変更及び変形の全ては、この教示の範囲内にある。上記の例は、開示した教示を更によく説明するために提供したものであり、ここに提供した教示の範囲を制限することを意図したものではない。

20

【 0 1 0 7 】

特許、特許出願、論文、教科書等を含むここで引用した全ての文献及びまだそうでない程度でここに参照した文献は、参照によりそのままここに組み込まれる。規定された用語、用語の使用、記載された技術等を含むがこれに限定されない組み込まれた文献又は同様な資料の一つ以上が本願と異なり又は矛盾する場合、本願を優先する。

【 図 1 】

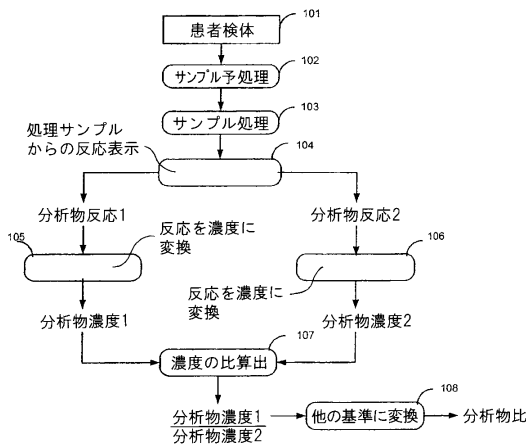


Fig. 1 (従来技術)

【 図 2 】

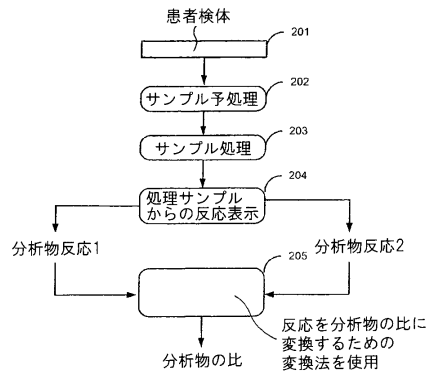


Fig. 2

【 図 3 】

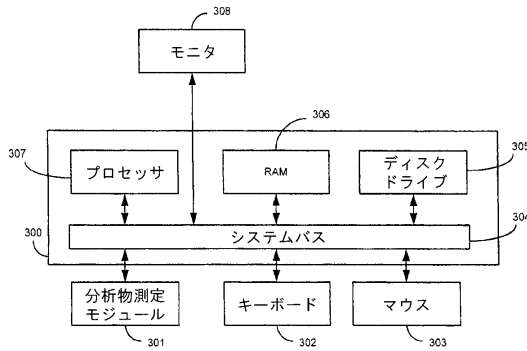


Fig. 3

【 図 4 】

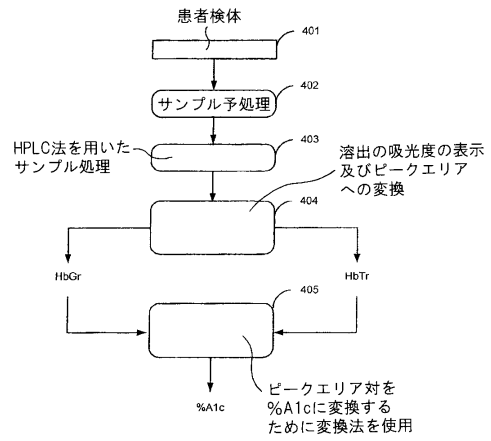


Fig. 4

【 図 4 a 】

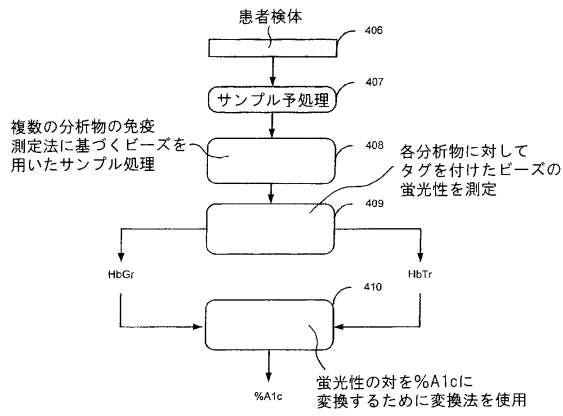


Fig. 4a

【 図 5 】

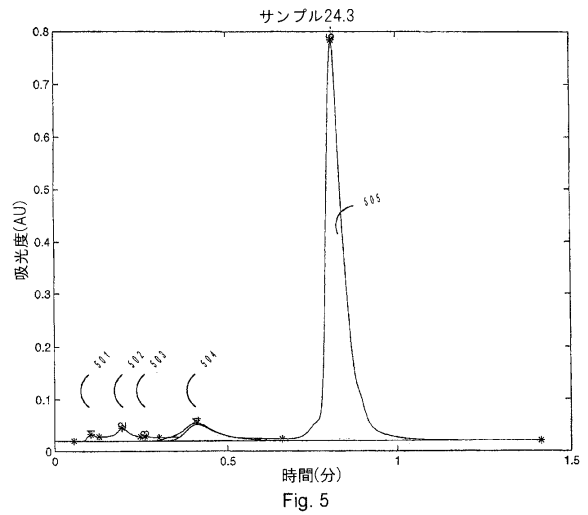


Fig. 5

【 図 6 a 】

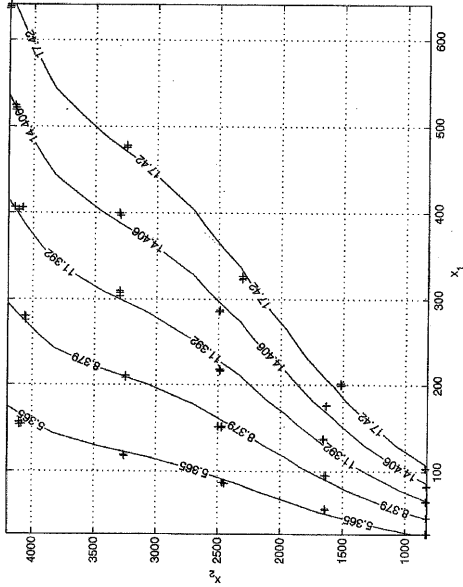


Fig. 6a

【 図 6 b 】

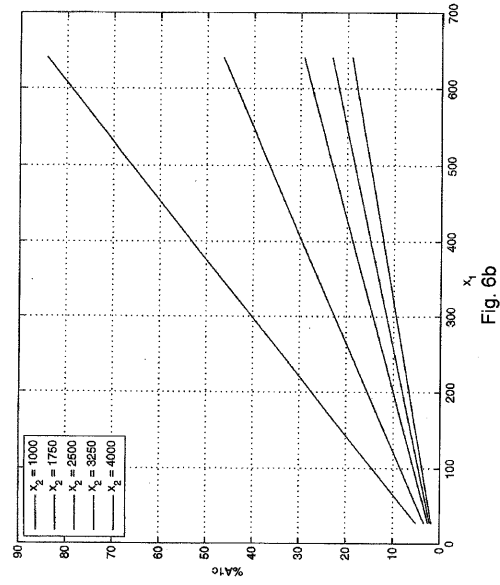


Fig. 6b

【 図 6 c 】

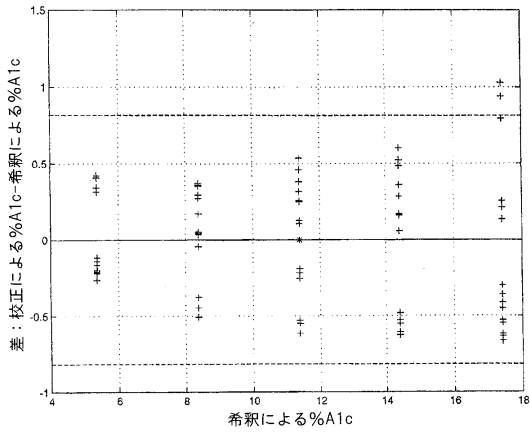


Fig. 6c

【 図 7 a 】

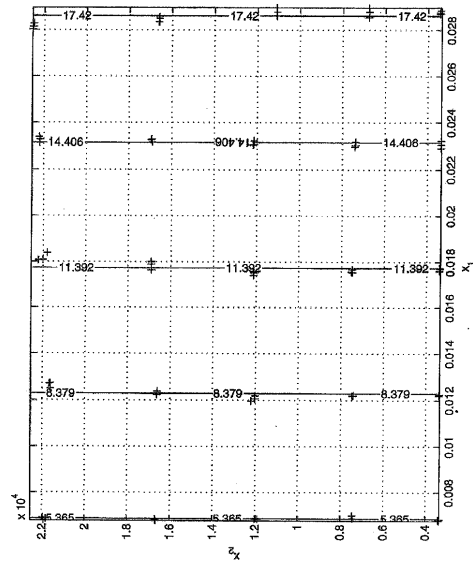


Fig. 7a

【図 7 b】

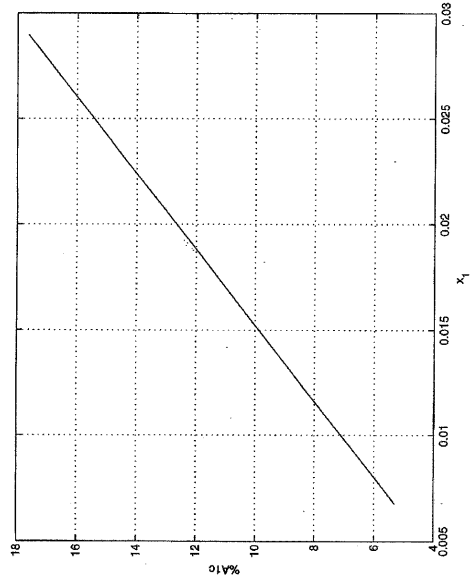


Fig. 7b

【図 7 c】

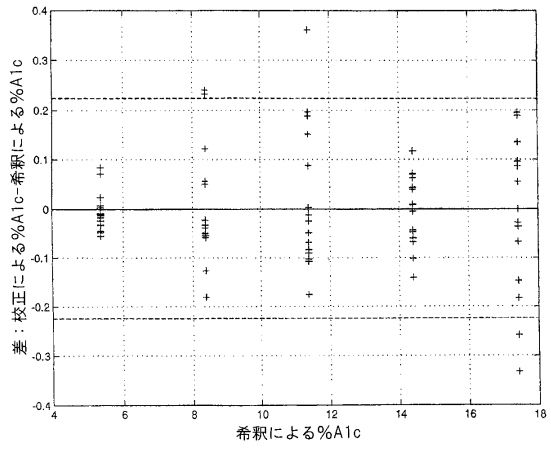


Fig. 7c

【図 8 a】

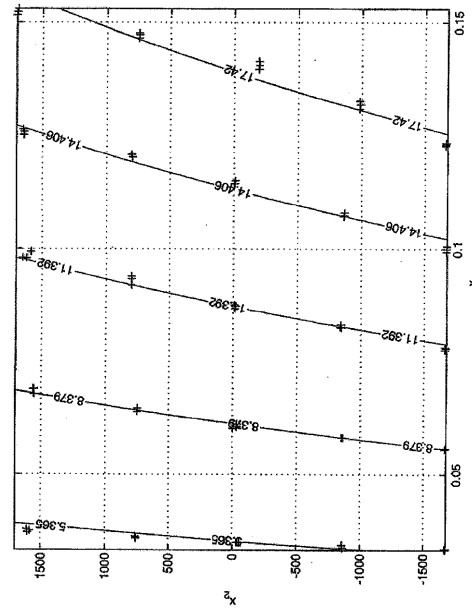


Fig. 8a

【図 8 b】

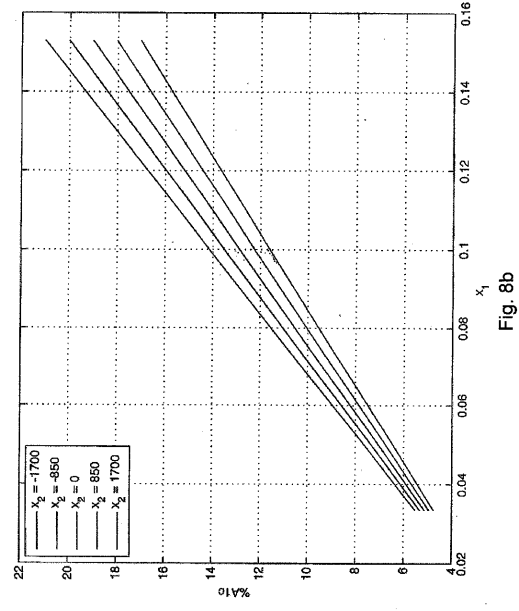
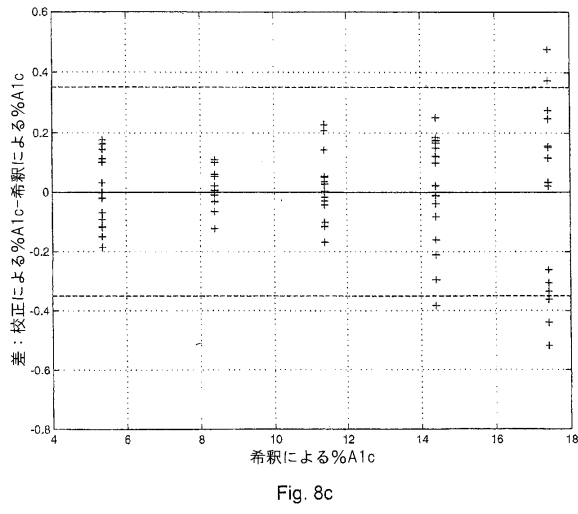


Fig. 8b

【 図 8 c 】



【 図 9 a 】

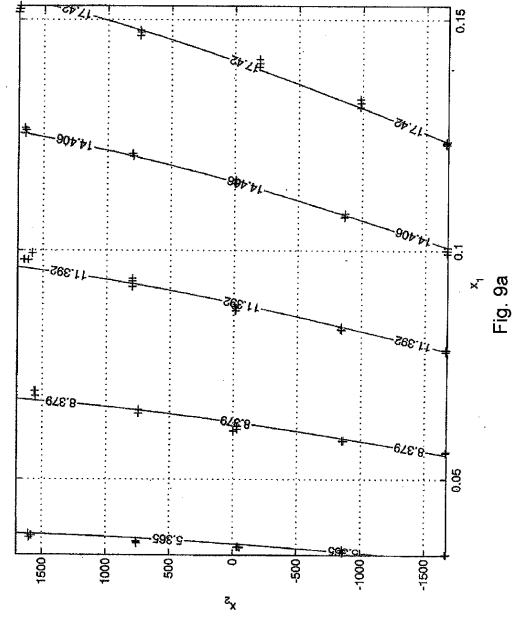


Fig. 9a

【 図 9 b 】

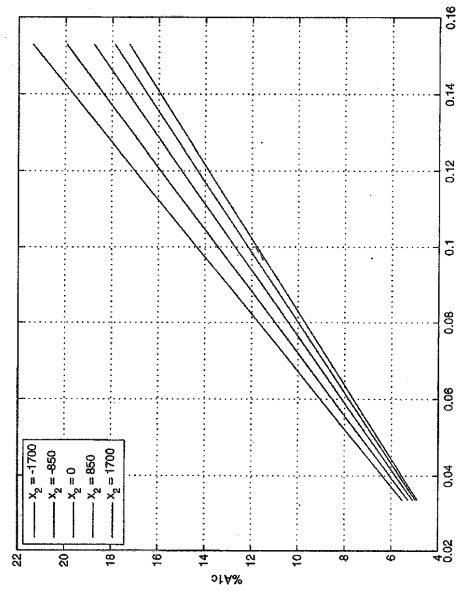


Fig. 9b

【 図 9 c 】

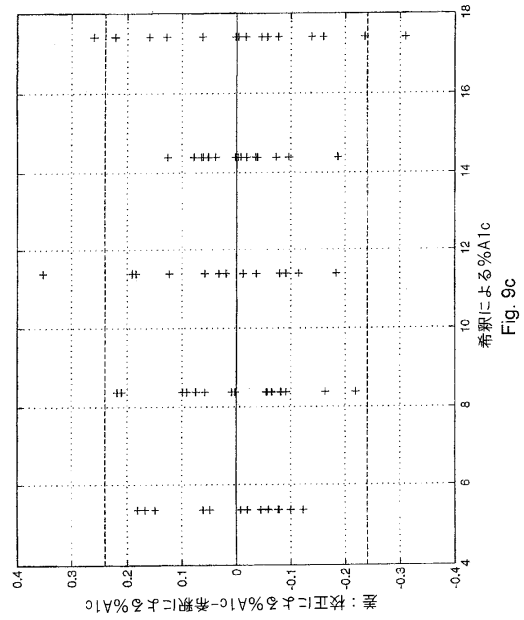


Fig. 9c

【図 10 a】

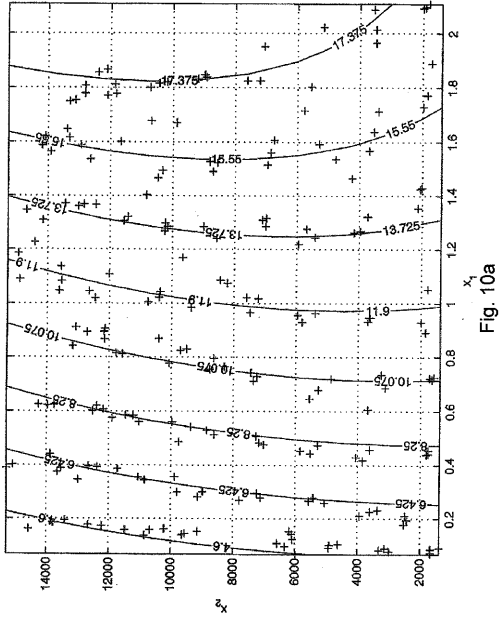


Fig. 10a

【図 10 b】

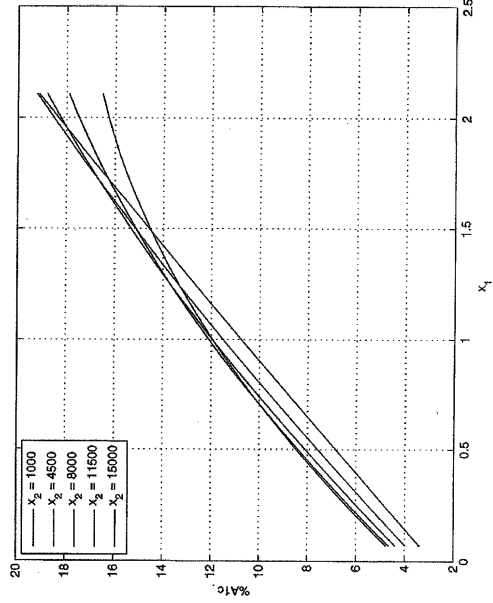


Fig. 10b

【図 10 c】

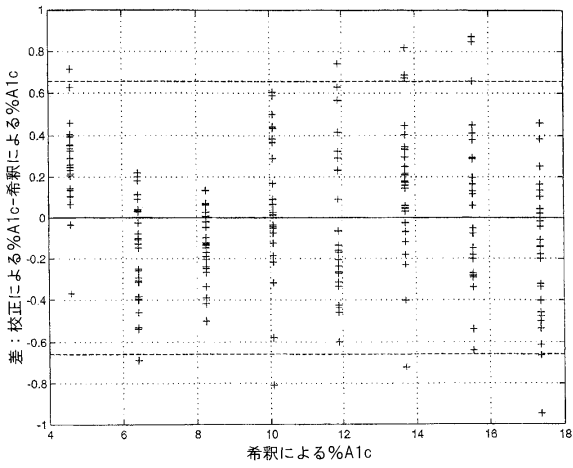


Fig. 10c

【図 11 a】

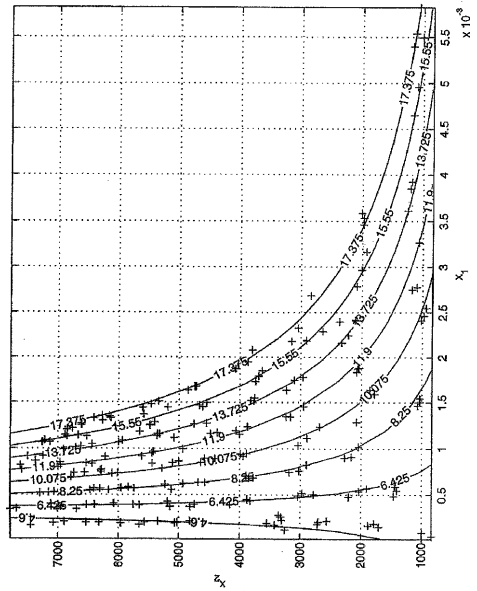


Fig. 11a

【 1 1 b】

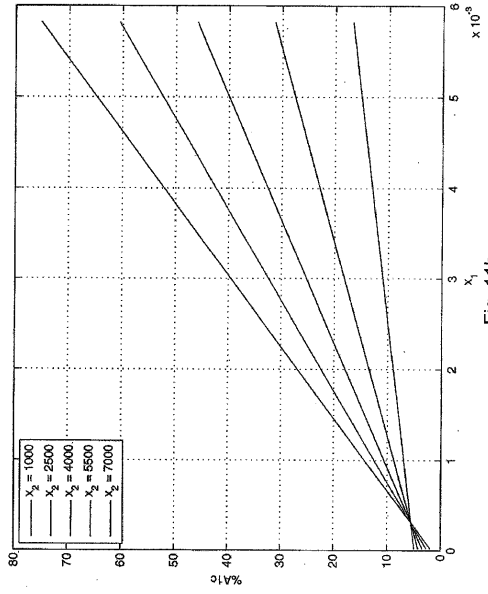


Fig. 11b

【 1 1 c】

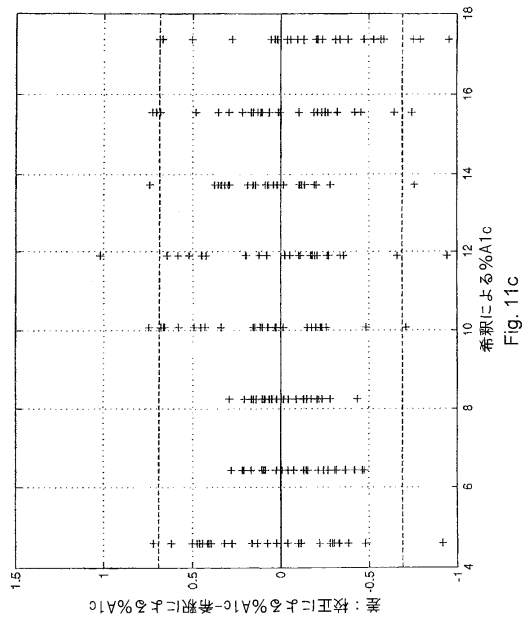


Fig. 11c

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 G 0 1 N 30/88 J
 G 0 1 N 30/88 N
- (74)代理人 100151459
 弁理士 中村 健一
- (72)発明者 リクスキ, ロバート
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 4 7, ウォルナット クリーク, スタンリー ダラー
 ドライブ 1 6 4 0
- (72)発明者 ウォーカー, ロジャー
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 1 0, ベニシア, カーニー ストリート 6 8 8
- (72)発明者 ル, ヤビン
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 6 6, プレザントン, バレー アベニュー 4 3 1 0, ア
 パートメント エイチ

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特表2007-506946(JP,A)
 特開2005-253478(JP,A)
 特開平11-083856(JP,A)
 特表平11-510604(JP,A)
 特開2000-214169(JP,A)
 特開2000-346848(JP,A)
 国際公開第2007/111282(WO,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	用于确定分析物比率的校准表面法		
公开(公告)号	JP5567567B2	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	JP2011523882	申请日	2009-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad实验室 , Incorporated的雷开球德		
当前申请(专利权)人(译)	生物 - Rad实验室 , Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	リクスキロバート ウォーカーロジャー ルヤビン		
发明人	リクスキ,ロバート ウォーカー,ロジャー ル,ヤビン		
IPC分类号	G01N33/72 G01N30/86 G01N30/88 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/723 G01N33/721		
FI分类号	G01N33/72.A G01N30/86.J G01N30/88.Q G01N33/53.V G01N30/88.D G01N30/88.J G01N30/88.N		
代理人(译)	青木 笃 南山智博 河合晃 中村健一		
优先权	12/196132 2008-08-21 US		
其他公开文献	JP2012500401A5 JP2012500401A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用转化方法直接从分析物的响应确定分析物的比例。通过使用选择的测量技术获得各个分析物响应，并且这些个体响应用作转换方法中的独立变量。转换方法的因变量是期望的分析物比率。然后使用所得到的转换方法直接计算分析物的所需比例作为测量响应的函数。不需要中间转换，例如使用校准曲线将各个测量的分析物响应转换成浓度值，以获得所需的比率。