

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-127694

(P2015-127694A)

(43) 公開日 平成27年7月9日(2015.7.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 L	2 G O 5 3
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 L	
GO 1 N 27/74 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
	GO 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-107258 (P2014-107258)	(71) 出願人	000000011 アイシン精機株式会社 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地
(22) 出願日	平成26年5月23日 (2014.5.23)	(71) 出願人	513220126 マグアレイ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 94089 カリフォル ニア, サニーヴェイル, ボルドー ドライ ブ 1230
(31) 優先権主張番号	14/142187	(74) 代理人	110001818 特許業務法人R&C
(32) 優先日	平成25年12月27日 (2013.12.27)	(72) 発明者	初山 政慶 愛知県刈谷市朝日町二丁目一番地 アイシ ン精機株式会社内
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ワンチップアッセイにおける内部補正方法、及び当該方法を利用する被検物質の測定方法。

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ワンチップアッセイにおける内部補正方法、及び当該方法を利用する被検物質の測定方法を提供する。

【解決手段】抗原抗体反応による被検物質及び捕捉物質との免疫複合体量を、前記捕捉物質を標識した磁性粒子からの磁気信号の強度を磁気検出手段で検出することによって測定する、ワンチップアッセイにおける内部補正方法において、1つのチップ上で被検物質の測定を行うアッセイ系と、内部標準物質を測定するアッセイ系を実行することにより、被検物質の測定値の内部補正を行う。かかる内部補正により被検物質の測定値を正規化することで、被検物質を定量する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ワンチップアッセイにおける内部補正方法であって、

(a) 独立した複数の磁気検出手段と前記磁気検出手段を同一条件で作動できる磁場機構が配置されたチップ上で、抗原抗体反応により被検物質及び捕捉物質との免疫複合体を形成させて前記免疫複合体量により被検物質量を測定する工程であって、前記免疫複合体量を、前記捕捉物質を標識した磁性粒子からの磁気信号の強度を前記磁気検出手段で検出することによって測定する工程、

(b) 前記(a)の工程と同時に、同一チップ上で、前記捕捉物質、前記免疫複合体、及び磁性粒子から選択される少なくとも1以上の内部標準物質の量を測定する工程であって、前記内部標準物質量を、前記内部標準物質からの磁気信号の強度を前記(a)の工程で用いた前記磁気検出手段とは別個に前記チップ上に設置された前記磁気検出手段で検出することによって測定する工程、

(c) 前記(b)の工程で得られた内部標準物質の測定値から補正係数を算出する工程であって、前記補正係数は、被検物質の測定値に影響を与えている要因の存在下で得られた内部標準物質の測定値と、前記要因の不在下で得られた内部標準物質の測定値から算出する工程、

(d) 前記(c)の工程によって算出された補正係数に基づいて、前記(a)の工程で得られた被検物質の測定値を補正する工程、を有するワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 2】

前記被検物質の測定値に影響を与えている要因が、アッセイを妨害する因子、アッセイ環境の相違及びアッセイ試薬の活性低下から選択される請求項1に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 3】

前記アッセイを妨害する因子が、血液、尿、又はそれらに含まれるマトリックスである請求項2に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 4】

前記アッセイ環境の相違が、測定温度、又は外部磁場ノイズである請求項2に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 5】

前記捕捉物質が、抗体である請求項1に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 6】

前記抗体の活性低下が前記被検物質の測定値に影響を与えている要因である場合に、前記内部標準物質として前記抗体活性に類似する活性を有する非天然化合物を使用する請求項5に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 7】

前記非天然化合物が、合成ペプチド、合成ポリペプチド及び合成タンパク質から選択される化合物である請求項6に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 8】

前記抗体として、チップ上に固定化されて被検物質を捕捉する固定化抗体と被検物質を捕捉し被検物質を検出する検出用抗体を用いて、前記抗原抗体反応をサンドイッチELISA、又は競合ELISAによって行う請求項5に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 9】

前記固定化抗体を内部標準物質とする場合に、前記固定化抗体を前記チップ上に等量、又は異なる量で固定化する請求項8に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 10】

前記固定化抗体を前記チップ上に異なる量で固定化し、前記固定化抗体量と前記固定化

10

20

30

40

50

抗体からの磁性信号の強度の関係を示す検量線を作成する請求項 9 に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 11】

前記検量線を、前記被検物質の測定値に与えている要因がアッセイ環境の相違である場合の前記補正係数の算出のために使用する請求項 10 に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 12】

前記磁気検出手段が、GMRセンサー、又はTMRセンサーである請求項 1 に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 13】

前記(c)の工程及び前記(d)の工程が、補正係数演算手段と補正実行手段として機能するソフトウェアによって自動的に実行される請求項 1 に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 14】

前記被検物質が、腫瘍マーカーである請求項 1 に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 15】

前記腫瘍マーカーが、EGFR、CEA、PSA、AFP、SCC、NSE、SLX、CA125、シフラ、CA72-4、TPA、TNF- α 、及びHE4から選択される 1 以上のマーカーである請求項 14 に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 16】

前記被検物質が、急性心筋梗塞マーカーである請求項 1 に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 17】

前記急性心筋梗塞マーカーが、トロポニン I、FABP、ミオグロビン、ミオシン、及びクレアチンから選択される 1 以上のマーカーである請求項 16 に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 18】

請求項 1 に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法により、被検物質の測定値を補正して被検物質量を正規化する工程、を有する被検試料中の被検物質の測定方法。

【請求項 19】

ワンチップアッセイにおける内部補正方法であって、
(a) 独立した複数の磁気検出手段と前記磁気検出手段を同一条件で作動できる磁場機構が配置されたチップ上で、抗原抗体反応により被検試料中に含まれる被検物質を捕捉物質との免疫複合体を形成させて前記免疫複合体量により被検物質量を測定する工程であって、前記免疫複合体量を、前記捕捉物質を標識した磁性粒子からの磁気信号の強度を前記磁気検出手段で検出することによって測定する工程、

(b) 前記(a)の工程と同時に、同一チップ上で、前記被検試料中に含まれる濃度参照物質である内部標準物質の量を測定する工程であって、前記被検物質の測定に供した被検試料中に含まれる前記内部標準物質量を、前記内部標準物質からの磁気信号の強度を前記(a)の工程で用いた前記磁気検出手段とは別個に前記チップ上に設置された前記磁気検出手段で検出することによって測定する工程、

(c) 前記(b)の工程で得られた内部標準物質の測定値から補正係数を算出する工程であって、前記補正係数は、測定した被検試料に含まれる内部標準物質の測定値が被検試料間で一定になるように算出する工程、

(d) 前記(c)の工程によって算出された補正係数に基づいて、前記(a)の工程で得られた被検物質の測定値を補正する工程、を有するワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 20】

前記被検試料が尿であり、前記内部標準物質がクレアチニンである請求項 19 に記載の

10

20

30

40

50

ワンチップアッセイにおける内部補正方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 9 に記載のワンチップアッセイにおける内部補正方法により、被検物質の測定値を補正して被検物質量を正規化する工程、を有する被検試料中の被検物質の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ワンチップアッセイにおける内部補正方法、及び当該方法を利用する被検物質の測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、多種多様なイムノアッセイ技術が開発され実用化されている。イムノアッセイ技術は抗原抗体反応を利用して抗原又は抗体を測定する高感度かつ高特異性の定量方法である。そして、イムノアッセイ技術は、臨床診断等の医療分野、環境ホルモン等の環境汚染物質の検出等の環境分野、残留農薬等による食品汚染や添加物等の検出等の食品分野等、多種多様な技術分野で利用されている。

【0003】

従来においては、イムノアッセイは 1 種類の被検物質のみを測定対象とするものであったが、近年、複数の被検物質を同時に測定する技術が報告されている。例えば、標識物質を光学的に波長分解して複数の被検物質を検出し測定できる技術が報告されている（特許文献 1：特開昭 63-36151 号公報を参照）。特許文献 1 の技術は、複数の被検物質を同時に測定するため、粒径の大きさ、蛍光物質の種類、濃度等によって複数の被検物質を判別できるように構成している。さらに、標識物質に異なるサイズの磁性粒子を結合させ、フローサイトメトリーの原理を活用して複数の被検物質の測定を可能にした技術も報告されている（特許文献 2：特表 2000-516345 号公報を参照）。また、複数の被検物質を同時に測定する多成分測定方法において、測定誤差を部分的に補正する技術が報告されている（特許文献 3：特表 2004-500569 号公報を参照）。詳細には、特許文献 3 の技術は、内部標準物質を試料に加え、この内部標準物質を分析して得られた補正点を基準として、試料中に存在する被検物質の量を測定するものである。更に、アッセイ用試薬の異常を補正する方法、又はその原因を検出する方法等が開示されている。

【0004】

当該技術分野において、検体となる試料に関して、抽出や精製等の前処理を経て分析の妨害となる夾雑物質を除いた高純度試料ではなく、クルードな試料をそのまま測定したいという市場の要望が存在する。特に、臨床診断分野においては、全血や血清等の生体試料をそのまま測定できる技術の確立が期待されている。しかしながら、通常、精製等の前処理を経ていない試料には多種多様の生体内物質が多量に含まれ、これらの物質が被検物質の測定を実行するアッセイ系を妨害したり、また、当該アッセイ系で使用されるアッセイ試薬の活性低下を引き起こす等、アッセイ系に悪影響を及ぼすことが問題になっていた。

【0005】

しかしながら、上述の特許文献 1 及び 3 の技術によって複数の被検物質を同時に測定できるが、これらの技術の測定対象となるのは十分に精製されアッセイ系を妨害する物質を除去した試料に限られる。つまり、特許文献 1 の技術のような光学的なアッセイ系は、従来において最も多用されている技術ではあるが、クルードな試料、例えば末端の臨床現場で採取できる全血には対応できない。この要因としては、全血は赤血球を含んでいるが何らかの衝撃により破裂すると赤色のバックグラウンドノイズが溶液を覆い、光学的な測定結果を狂わせる。更に、この赤血球の数や破裂の程度は試料毎に異なる。そのため、例えば抗体を用いたアッセイ系では、抗体活性が劣化していないにも拘らず、赤血球数が多いと光学数値は下がることとなる。これを上述の特許文献 3 の技術に基づいて補正を行うと、抗体活性が低下しているケースと同等の補正が行われることから測定値が高くなり、その結果、偽陽性が増えるという問題が生じる。また、特許文献 2 のフローサイトメトリー

10

20

30

40

50

方式は、同様の問題を抱えることもある上、処理能力が低く、実際の臨床検査や健康診断等のような、大量処理を要求される現場には向かないという問題点もあった。

【0006】

また、上述したような内部標準物質は、試料中の共存成分が被検物質の測定値に影響を与えてしまうアッセイ系や、そのために検量線が直線とならない場合に、被検物質の測定値を補正するために利用されるものである。しかしながら、その利用が制限される場合がある。例えば、PCBの簡易定量法における前処理回収率の確認のためのアッセイ系において内部標準物質を利用した内部補正方法を適用することは難しいこと、また内部標準物質の選定が難しいことが知られている（非特許文献1：絶縁油中の微量PCBに関する簡易測定法マニュアル（第2版）、2010年6月、環境処理廃棄物・リサイクル対策部産業廃棄物課）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開昭63-36151号公報

【特許文献2】特表2000-516345号公報

【特許文献3】特表2004-500569号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】絶縁油中の微量PCBに関する簡易測定法マニュアル（第2版）、2010年6月、環境処理廃棄物・リサイクル対策部産業廃棄物課

20

【発明の概要】

【0009】

したがって、本発明は、全血や血清等の生体試料等のクルードな試料をもそのまま測定したいという市場の要望に応えることができる技術の確立を目的とする。そして、測定結果の正確性及び信頼性を確保でき、かつ低コスト及び簡便な装置で実施可能な測定技術の確立を目的とする。更に、高い処理能力を発揮でき、臨床検査や健康診断等の大量処理能力を要求される現場でも好適に利用できる測定技術の確立を目的とする。

【0010】

そこで、上記課題を解決するべく本発明者らは鋭意研究した結果、被検物質の測定を行うチップと同一チップ上で内部標準物質についても同一条件下で測定を行うことにより、被検物質の測定値に対して有効な補正を行えることを見出した。これにより、被検物質の高精度かつ信頼性の高い測定結果を得ることができる。そして、その際に、被検物質及び内部標準物質の測定を磁性信号の強度を検出するアッセイ系で行うことから、光学的妨害因子等の影響を受けることないため、これによっても高精度かつ信頼性の高い測定結果の取得に貢献できる。これらの知見に基づいて、本発明を完成するに至った。

30

【0011】

本発明は、ワンチップアッセイにおける内部補正方法を提供し、当該方法は以下の工程を有する。

(a) 独立した複数の磁気検出手段と前記磁気検出手段を同一条件で作動できる磁場機構が配置されたチップ上で、抗原抗体反応により被検物質及び捕捉物質との免疫複合体を形成させて前記免疫複合体量により前記被検物質量を測定する工程であって、前記免疫複合体量を、前記捕捉物質を標識した磁性粒子からの磁気信号の強度を前記磁気検出手段で検出することによって測定する工程、

40

(b) 前記(a)の工程と同時に、同一チップ上で、前記捕捉物質、前記免疫複合体、及び前記磁性粒子から選択される少なくとも1以上の内部標準物質の量を測定する工程であって、前記内部標準物質量を、前記内部標準物質からの磁気信号の強度を前記(a)の工程で用いた前記磁気検出手段とは別個に前記チップ上に設置された前記磁気検出手段で検出することによって測定する工程、

(c) 前記(b)の工程で得られた内部標準物質の測定値から補正係数を算出する工程で

50

あって、前記補正係数は、被検物質の測定値に影響を与えている要因の存在下で得られた内部標準物質の測定値と、前記要因の不在下で得られた内部標準物質の測定値から算出する工程、

(d) 前記(c)の工程によって算出された補正係数に基づいて、前記(a)の工程で得られた被検物質の測定値を補正する工程。

【0012】

ここで、前記被検物質の測定値に影響を与えている要因が、アッセイを妨害する因子、アッセイ環境の相違及びアッセイ試薬の活性低下から選択されるものである。特に、前記アッセイを妨害する因子が血液、尿、又はそれらに含まれるマトリックスであり、前記アッセイ環境の相違が、測定温度、又は外部磁場ノイズである。

10

【0013】

好ましくは、前記捕捉物質が抗体である。そして、前記抗体の活性低下が前記被検物質の測定値に影響を与えている要因である場合に、前記内部標準物質として前記抗体活性に類似する活性を有する非天然化合物を使用することが好ましい。特に好ましくは、前記非天然化合物が、合成ペプチド、合成ポリペプチド及び合成タンパク質から選択される化合物である。

【0014】

好ましくは、前記抗体として、チップ上に固定化されて被検物質を捕捉する固定化抗体と被検物質を捕捉し被検物質を検出する検出用抗体を用いて、前記抗原抗体反応をサンドイッチELISA、又は競合ELISAによって行う。そして、前記固定化抗体を内部標準物質とする場合に、前記固定化抗体を前記チップ上に等量、又は異なる量で固定化する。また、好ましくは前記固定化抗体を前記チップ上に異なる量で固定化し、前記固定化抗体量と前記固定化抗体からの磁性信号の強度の関係を示す検量線を作成する。そして、特に好ましくは、前記検量線を、前記被検物質の測定値に与えている要因がアッセイ環境の相違である場合の前記補正係数の算出のために使用する。

20

【0015】

好ましくは、前記磁気検出手段が、GMRセンサー、又はTMRセンサーである。

【0016】

好ましくは、前記(c)の工程及び前記(d)の工程が、補正係数演算手段と補正実行手段として機能するソフトウェアによって自動的に実行される。

30

【0017】

好ましくは、前記被検物質が腫瘍マーカーであり、特に好ましくは、前記腫瘍マーカーが、EGFR、CEA、PSA、AFP、SCC、NSE、SLX、CA125、シフラ、CA72-4、TPA、TNF-、HE4から選択される1以上の腫瘍マーカーである。

【0018】

好ましくは、前記被検物質が急性心筋梗塞マーカーであり、特に好ましくは、前記急性心筋梗塞マーカーがトロポニンI、FABP、ミオグロビン、ミオシン、クレアチンから選択される1以上のマーカーである。

【0019】

さらに、本発明は、ワンチップアッセイにおける被検試料中の被検物質の測定方法をも提供するものであり、当該方法は以下の工程を有する。

40

(a) 独立した複数の磁気検出手段と前記磁気検出手段を同一条件で作動できる磁場機構が配置されたチップ上で、抗原抗体反応により被検物質及び捕捉物質との免疫複合体を形成させて前記免疫複合体量により前記被検物質量を測定する工程であって、前記免疫複合体量を、前記捕捉物質を標識した磁性粒子からの磁気信号の強度を前記磁気検出手段で検出することによって測定する工程、

(b) 前記(a)の工程と同時に、同一チップ上で、前記捕捉物質、前記免疫複合体、及び前記磁性粒子から選択される少なくとも1以上の内部標準物質の量を測定する工程であって、前記内部標準物質量を、前記内部標準物質からの磁気信号の強度を前記(a)の工程で用いた前記磁気検出手段とは別個に前記チップ上に設置された前記磁気検出手段で

50

検出することによって測定する工程、

(c) 前記(b)の工程で得られた内部標準物質の測定値から補正係数を算出する工程であって、前記補正係数は、被検物質の測定値に影響を与えている要因の存在下で得られた内部標準物質の測定値と、前記要因の不在下で得られた内部標準物質の測定値から算出する工程、

(d) 前記(c)の工程によって算出された補正係数に基づいて、前記(a)の工程で得られた被検物質の測定値を補正して被検物質量を正規化する工程。

【0020】

本発明の別実施の形態として、ワンチップアッセイにおける内部補正方法を提供し、当該方法は以下の工程を有する。

(a) 独立した複数の磁気検出手段と前記磁気検出手段を同一条件で作動できる磁場機構が配置されたチップ上で、抗原抗体反応により被検試料中に含まれる被検物質を捕捉物質との免疫複合体を形成させて前記免疫複合体量により前記被検物質量を測定する工程であって、前記免疫複合体量を、前記捕捉物質を標識した磁性粒子からの磁気信号の強度を前記磁気検出手段で検出することによって測定する工程、

(b) 前記(a)の工程と同時に、同一チップ上で、前記被検試料中に含まれる濃度参照物質である内部標準物質の量を測定する工程であって、前記被検物質の測定に供した被検試料中に含まれる前記内部標準物質量を、前記内部標準物質からの磁気信号の強度を前記(a)の工程で用いた前記磁気検出手段とは別個に前記チップ上に設置された前記磁気検出手段で検出することによって測定する工程、

(c) 前記(b)の工程で得られた内部標準物質の測定値から補正係数を算出する工程であって、前記補正係数は、測定した被検試料に含まれる内部標準物質の測定値が前記被検試料間で一定になるように算出する工程、

(d) 前記(c)の工程によって算出された補正係数に基づいて、前記(a)の工程で得られた被検物質の測定値を補正する工程。

【0021】

好ましくは、前記被検試料が尿であり、前記内部標準物質がクレアチニンである。

【0022】

さらに、本発明は、ワンチップアッセイにおける被検試料中の被検物質の測定方法をも提供するものであり、当該方法は以下の工程を有する。

(a) 独立した複数の磁気検出手段と前記磁気検出手段を同一条件で作動できる磁場機構が配置されたチップ上で、抗原抗体反応により被検試料中に含まれる被検物質を捕捉物質との免疫複合体を形成させて前記免疫複合体量により前記被検物質量を測定する工程であって、前記免疫複合体量を、前記捕捉物質を標識した磁性粒子からの磁気信号の強度を前記磁気検出手段で検出することによって測定する工程、

(b) 前記(a)の工程と同時に、同一チップ上で、前記被検試料中に含まれる濃度参照物質である内部標準物質の量を測定する工程であって、前記被検物質の測定に供した被検試料中に含まれる前記内部標準物質量を、前記内部標準物質からの磁気信号の強度を前記(a)の工程で用いた前記磁気検出手段とは別個に前記チップ上に設置された前記磁気検出手段で検出することによって測定する工程、

(c) 前記(b)の工程で得られた内部標準物質の測定値から補正係数を算出する工程であって、前記補正係数は、測定した被検試料に含まれる内部標準物質の測定値が前記被検試料間で一定になるように算出する工程、

(d) 前記(c)の工程によって算出された補正係数に基づいて、前記(a)の工程で得られた被検物質の測定値を補正して被検物質量を正規化する工程。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】血清によって引き起こされた抗体活性の劣化による測定値への影響を本発明によって補正することを検討した実施例1の結果を示すグラフであり、血清の存在下及び不在下で被検物質を測定した結果を示す。

10

20

30

40

50

【図2】血清によって引き起こされた抗体活性の劣化による測定値への影響を本発明によって補正することを検討した実施例1の結果を示すグラフであり、補正係数を算出するために血清の存在下および不在下で内部標準物質を測定した結果を示す。

【図3】血清によって引き起こされた抗体活性の劣化による測定値への影響を本発明によって補正することを検討した実施例1の結果を示すグラフであり、図2より算出した補正係数に基づいて、血清の存在下で測定した内部標準物質の測定値の補正を行った結果を示す。

【図4】血清によって引き起こされた抗体活性の劣化による測定値への影響を本発明によって補正することを検討した実施例1の結果を示すグラフであり、図2より算出された補正係数に基づいて、血清の存在下で測定した被検物質の測定値の補正を行った結果を示す。

10

【図5】測定環境の相違により生じた測定誤差を本発明によって補正することを検討した実施例2の結果を示すグラフであり、異なる日時及び温度で被検物質を測定した結果を示す。

【図6】測定環境の相違により生じた測定誤差を本発明によって補正することを検討した実施例2の結果を示すグラフであり、補正係数を算出するために異なる日時及び温度で内部標準物質を測定した結果を示す。

【図7】測定環境の相違により生じた測定誤差を本発明によって補正することを検討した実施例2の結果を示すグラフであり、図6より算出した補正係数に基づいて、異なる日時及び温度で測定した内部標準物質の測定値の補正を行った結果を示す。

20

【図8】測定環境の相違により生じた測定誤差の補正を検討した実施例2の結果を示すグラフであり、図6より算出された補正係数に基づいて、異なる日時及び温度で測定した被検物質の測定値の補正を行った結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

(本発明の第一の実施形態)

ここで、「ワンチップアッセイ」とは、同一のチップ上で検出及び測定が同時に実行されることを意味する。本発明の方法は、被検物質の測定を行うチップと同一のチップ上で、内部標準物質についても同時に測定を行うものである。そして、内部標準物質の測定値に基づいて被検物質の測定値の補正を行うものである。ただし、被検物質と内部標準物質は同一のチップ上で測定されるものではあるが、被検物質と内部標準物質は同一チップ上の別個の独立した領域で反応が進められる。

30

【0025】

「補正」とは、アッセイ系によって得られた測定値と、標準によって実現される値との間の関係を確定する一連の作業を意味するものとする。ここでは、標準は内部標準である。補正を行うことにより、測定値の正確性及び信頼性を確保できると共に、アッセイ用試薬類の有効性を点検するに利用することができる。例えば、被検試料にアッセイ系を妨害する因子が含まれる場合には、被検物質の測定値から当該妨害因子による影響を排除するための補正や、測定環境の変動によって生じた被検物質の測定値の差異の補正等が挙げられる。更に、アッセイ用試薬類の異常を検知し、アッセイ用試薬の異常による測定値への影響を排除するための補正等も例示される。そして、「内部補正」とは、内部標準物質を用いて補正を行うことを意味する。

40

ここで、本発明の方法に適用される被検試料は、測定対象となる被検物質を含む可能性のある試料であれば特に制限はない。例えば、動物由来の血液、血漿、血清、脳脊髄液、羊水、乳、汗、尿、唾液、喀痰、糞便、組織、細胞培養物等の生体由来試料、植物の根、茎、葉、花、果実等の植物由来試料、土壌、地下水、河川水、湖沼水等の環境試料、野菜、肉、卵、加工食品等の食品等が例示される。また、これらの試料は、そのまま測定対象とすることができるが、被検物質の分離、抽出、精製等の前処理が施されていてもよい。本発明の方法は、磁性信号強度を検出し測定するアッセイ系を利用するものであることから、光学的測定の妨害が問題となる試料についても、好ましく適用される。

50

【0026】

本発明の方法は、好ましくは抗原抗体反応に基づくイムノアッセイに適用される。ここで、抗原抗体反応は、生体物質等が有する抗原抗体反応等の免疫特異的識別能を利用する反応である。つまり、抗体が抗原の抗原決定基（エピトープ）を特異的に認識し結合する反応であり、抗体が抗原決定基に相補的な構造を持つために惹起される反応である。本発明の方法は、イムノアッセイとして汎用されるELISA法に適用でき、競合法、サンドイッチ法、直接吸着法の別を問わず何れにも適用することができるが、特にサンドイッチELISA及び競合ELISAへの適用が好ましい。しかしながら、イムノアッセイに限定されるものではなく、生体関連物質の特異的親和性を利用した公知のアッセイに適用することができる。したがって、レセプターリガンド反応、レクチン糖反応、酵素基質反応、核酸ハイブリダイゼーション反応等の任意の生物的特異的親和性反応を利用するアッセイにも適用することができる。ここで、生物的特異的親和性反応とは、生体関連分子間に存在する特異的識別能を利用する反応であり、2以上の物質が非共有結合により可逆的かつ選択的に結合する反応を意味するものとする。そして、レセプターリガンド反応としては、ホルモン、神経伝達物質、各種薬物、リンホカイン、サイトカイン、リンパ球抗原等の機能性タンパク質と、これらに個別に特異的に結合するレセプターとの反応が例示される。レクチン糖反応としては、レクチンと特定の糖構造、例えば糖鎖や複合糖質との反応が例示される。酵素基質反応は、基質が酵素分子の表面上の特定の部位（活性部位）に結合する反応を意味し、核酸ハイブリダイゼーション反応は、DNA、RNA等の核酸が相補的塩基対形成により結合する反応を意味する。

10

20

【0027】

そして、被検物質としては、抗原抗体反応を惹起できる抗原又は抗体が好ましく例示される。しかしながら、当該被検物質に対する生物的特異的親和性を有する結合性物質が存在するものであれば特に制限はなく、レセプターリガンド反応を惹起しえるレセプター又はリガンド、レクチン糖反応を惹起しえるレクチン又は糖、酵素基質反応を惹起しえる酵素又は基質等、核酸ハイブリダイゼーション反応を惹起しえるDNAやRNA等の核酸等、何れの物質も被検物質とすることができる。そして、天然物、遺伝子工学的技術及び化学合成技術等による合成物の別を問わない。

【0028】

例えば、抗原抗体反応を惹起する抗原と為り得る各種タンパク質、糖、脂質、糖タンパク質、その他の有機物等が挙げられる。ここで、本明細書における抗原には、抗原性は有しているが免疫原性を有していない低分子化合物であるハプテン等も好ましく例示される。また、適当なキャリアタンパク質との結合物であってもよく、共有結合等の化学的に結合したものの他、単に物理的吸着により結合したものであってもよい。また、適当なスペーサーを介して結合されていてもよい。このようなキャリアタンパク質としては、牛血清アルブミン、ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン、オボアルブミン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン、グロブリン、カゼイン等が例示される。

30

【0029】

また、逆に、被検物質は、抗原抗体反応を惹起する抗原に対する抗体であってもよい。抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれであってもよい。また、パパイン、ペプシン等のタンパク分解酵素での処理で得られる、 $F(ab')_2$ フラグメント、Fabフラグメント、Fvフラグメント、Fcフラグメント等の抗体断片であってもよい。

40

【0030】

具体的な被検物質としては、これに限定するものではないが、例えば、肺癌マーカーEGFR、SCC、NSE、SLX、CYFRA（シフラ）、肝臓癌マーカーAFP、前立腺マーカーPSA、PAP、膀胱癌マーカーBFP、絨毛癌マーカーhCG、胃・大腸癌マーカーCEA、膵臓癌マーカーCA19-9、卵巣癌マーカーCA125、CA72-4、HE4、組織ポリペプチド抗原TPA等の腫瘍マーカー、CRP、ASO、RF、HBs抗原、HCV抗体、HIV抗原抗体、HTLV-1抗体等の炎症・感染症マーカー、ミオグロビン、トロポニンI、トロポニンT、FABP、ミオシン、及びクレアチン等の心疾患マーカー、特に、急性心筋梗塞マーカー、サイロキシン、インスリン、黄体化ホルモン

50

、甲状腺刺激ホルモン、プロラクチン、エストロゲン、プロゲステロン、テストステロン、アルドステロン等のホルモン、IL-1、IL-1、IL-2、IL-6、TNF、TNF等のサイトカイン類等を被検物質として例示でき、臨床検査等の医療分野で利用することができる。また、食品添加物、残留農薬、薬物、環境ホルモン等の環境汚染物質を被検物質とすることができる。

【0031】

そして、被検物質に対して生物的な特異的親和性を有して、被検物質を特異的に認識し捕捉する捕捉物質は、好ましくは、被検物質に対して抗原抗体反応等の免疫的な特異的親和性を有する物質である。しかしながら、被検物質に対する生物的な特異的親和性を有する物質であれば、特に制限はない。例えば、被検物質が抗原である場合には、当該抗原に特異的に結合する抗体が捕捉物質となり得、また、被検物質がリガンドである場合には、当該リガンドに特異的に結合するレセプターが捕捉物質となり得る。また、この逆も好ましく例示されるが、これらに限定するものではない。これらは天然物、遺伝子工学的技術及び化学合成技術等による人工合成物の別を問わない。また、公知の方法で得られた被検物質に対する生物的な特異的親和性を有するこれらの断片でもよい。そして、本発明の方法の好適形態であるサンドイッチELISAを利用する場合には、被検物質上の認識部位が異なる2種類の捕捉物質（「捕捉物質1」、「捕捉物質2」と称する）が必要となる。この場合、捕捉物質1はチップ上に固定化され被検物質を特異的に認識し捕捉する。これにより、チップ上に捕捉物質1-被検物質複合体が形成される。続いて、捕捉物質2が被検物質を特異的に認識し捕捉し、チップ上に捕捉物質1-被検物質-捕捉物質2複合体が形成される。そして、捕捉物質2を検出することにより被検物質を測定するものである。つまり、捕捉物質1は固定化物質、捕捉物質2は検出用物質として機能することとなる。

10

20

【0032】

好ましくは、捕捉物質が抗体であり、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれをも好適に利用可能である。これらは市販品を利用できると共に、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモット等の哺乳動物に抗原となり得る前記被検物質を免疫することによって得られたポリクローナル抗体をも好適に使用できる。さらに、前記被検物質に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞を細胞融合して得られたハイブリドーマ細胞を培養して得られたモノクローナル抗体をも好適に利用できる。そして、免疫に際しては、必要に応じて適当なアジュバンドと併用することができる。また、パパイン、ペプシン等のタンパク分解酵素での処理で得られる、F(ab')₂フラグメント、Fabフラグメント、Fvフラグメント等の抗原結合能を保持する抗体断片が例示される。また遺伝子組換え等の公知の遺伝子工学的技術、及び化学合成技術等に基づいて調製された抗体をも含み、市販品を利用しても良い。そして、本発明の方法の好適形態であるサンドイッチELISAに適用する場合には、上述の捕捉物質1は、第1の抗体となる固定化抗体として、捕捉物質2は、第2の抗体となる検出用抗体として構成する。

30

【0033】

そして、捕捉物質は必要に応じて磁性粒子で標識される。したがって、上述のサンドイッチELISAを利用する場合には捕捉物質2のみを磁性粒子で標識する。ここで、磁性粒子とは、磁場内で磁化される磁性体物質を含むものであり、かつ粒子として形成されたものを意味する。磁性体物質は、強磁性体、反磁性体、常磁性体、超常磁性体、フェリ磁性体等に分類される。磁気信号を検出でき、かつアッセイに利用する生体関連物質の特異的親和性及び試薬類の機能を阻害しない何れをも利用することができる。例えば、鉄、コバルト、ニッケル、ガドリニウム等の強磁性金属、鉄-ニッケル、鉄-コバルト等の前記強磁性金属を同士の合金、強磁性金属を含む合金、マグネタイト(Fe₃O₄)、マグヘマイト(-Fe₂O₃)及びその中間体等の各種フェライト類に代表される強磁性金属の酸化物等が挙げられる。特に化学的安定性及び磁場に対する反応性の観点からフェライト類の使用が好ましく、フェライト類にコバルト、マンガン、ニッケル、亜鉛等の金属を添加したのも好適に利用することができる。

40

【0034】

50

磁性粒子の形状や大きさには特に制限はなく、アッセイに利用する生体関連物質の特異的親和性及び試薬類の機能を阻害しない限り、適宜、好適な形状及び大きさが選択される。形状としては、例えば、球状、楕円体状、粒状、立方体状、柱状、棒状、板状、針状、繊維状、塊状等が挙げられ、均一形状に成形することが好ましい。また、磁性粒子は、ナノ粒子又はマイクロ粒子として構成することが好ましく、特に好ましくは、磁性ナノ粒子である。具体的な平均コア粒径としては、例えば、1nm~3µmが好ましく、10 nm~150nmがより好ましく、15nm~30nmが特に好ましい。

【0035】

磁性粒子は、磁性体物質のみで構成してもよく、磁性体物質が粒子の全体又は表面に分布するように構成しても、粒子の内部に封入して構成してもよい。例えば、磁性体物質が一様に分布したポリマー等を粒子状に形成してもよく、ポリマー等に磁性体物質が一様に分布した核を、ポリマー等で被覆することによって調製することができる。ポリマーは、親水性ポリマー及び疎水性ポリマーの別は問わず、アッセイの態様に応じて適宜選択することができる。具体的には、ポリスチレン、シリカゲル、ゼラチン、ポリアクリルアミド等の高分子ポリマーを好適に使用することができる。また、粒子表面にアミノ基、カルボキシル基、トシル基、ヒドロキシル基等の官能基を導入して機能性を発現するように構成してもよい。なお、調製に際しては、一粒子当たりの磁化が均一になるように調製することが好ましい。

10

【0036】

捕捉物質の磁性粒子での標識は、捕捉物質及び磁性粒子の安定性と機能性を保持できる限りは、公知のいずれを標識技術をも使用できる。例えば、物理的吸着法及び化学的結合法が例示される。物理的吸着法は、磁性粒子と捕捉物質とを、水、生理食塩水、各種緩衝液等の水溶性溶媒中で接触させることにより行うことができる。化学的結合法としては、ジアゾ法、酸アジド法、イソシアナート法、ブロムシアン法等による共有結合の形成による標識化が例示される。また、グルタルアルデヒド等の官能基を2以上有する多官能性試薬等の架橋試薬を用いて固定化する方法も利用できる。そして、上述したように、磁性粒子の表面に機能性を発現するように導入されたアミノ基、カルボキシル基、トシル基、ヒドロキシル基等の官能基と、捕捉物質上の官能基を化学的に結合させることもできる。また、適当な鎖長の反応性側鎖（スパーサー）、アルブミンやプロテインA等のタンパク質を介して、磁性粒子と捕捉物質を化学的に結合させることができる。特に、強い親和性と特異性を有するビオチン-アビジン（ストレプトアビジン）結合法等を利用することができる。本発明に好ましく利用される。そして、磁性粒子による捕捉物質の標識は、捕捉物質と被検物質との複合体形成反応の前後を問わず行うことができる。したがって、予め磁性粒子で標識された捕捉物質により被検物質を認識し捕捉するように構成してもよい。また、捕捉物質が被検物質を認識し捕捉した後に、捕捉物質を磁性粒子で標識するように構成してもよい。

20

30

【0037】

磁気粒子からの磁気信号は磁気センサー等の磁気検出手段によって検出される。磁気信号強度は被検体物質の量に比例する。したがって、磁気検出手段は、磁性粒子からの磁気に応答して電気信号を発生するように構成され得ることが好ましい。

40

【0038】

被検物質と捕捉物質の反応が行われ、そして、磁気信号の検出面となるチップは、その形状は特に制限はなく、平板形状、球体形状、立方体等の立体形状等であってもよい。好ましくは、平面的に積層された平板形状として構成する。そして、チップを構成する材料は、シリコンやシリカ、酸化チタン等の無機化合物、アクリルアミド、ポリスチレン、ポリカーボネート等の合成ポリマー等で製造することができる。そして、PtMn、NiMn、IrMn、PdMn、PdPtMn、RhMn等を主成分とする反強磁性層、Ta、Ru、Cr、Rh、Ir、Au、Ag、Cu、Zr、Pt、Mo、W等を主成分とする非磁性層、NiFe、Co、CoFe等を主成分とする強磁性層、シード層、絶縁体層等を積層してよく、磁気信号の検出方式に応じて適宜選択することができる。

50

【0039】

磁気検出手段は、同一チップ上で複数の対象物質を同時に測定できるように構成される。したがって、磁気検出手段は複数の対象物質を同時に測定できるように、複数の独立した磁気検出手段がチップ上の所定の位置に精密に配置され、好ましくはアレイとして構成される。例えば、チップ表面に、複数のウェル、コンパートメント、チャンバー、チャンネル等を形成することが好ましい。ウェルを形成する場合、例えば、8×10として80ウェル、8×8として64ウェル等の所望のウェル数とすることができる。これにより、複数の独立した領域がチップ上に形成され、被検試料、内部標準物質、アッセイ試薬が指定された所定の領域内にとどまるように構成することができる。そして、各領域に独立した磁気検出手段を夫々設置することで、同一チップ上で複数の被検物質及び内部標準物質を同時に測定できる。

10

【0040】

そして、アッセイ系はサンドイッチELISA等の固相法で行うことが好ましく、チップ上に捕捉物質等のアッセイ系を構成する成分及び内部標準物質等を固定化する。ここで、固定化は、固定化される成分及びチップの安定性と機能性を保持できる限り公知の何れの固定化技術を利用することができる。例えば、物理的吸着法及び化学的結合法が例示される。化学的結合法としては、ジアゾ法、酸アジド法、イソシアナート法、ブロムシアン法等による共有結合の形成による標識化が例示される。また、グルタルアルデヒド等の官能基を2以上有する多官能性試薬等の架橋試薬を用いて固定化する方法も利用できる。例えば、チップの表面を化学修飾して反応性の高い官能基を導入することができ、例えば、チップ表面に -アミノプロピルトリエトキシシラン (-APTES)、ポリエチレンイミン (PEI)、エチレンジアミン等の薄層を形成することによりチップ表面にアミノ基等の官能基を導入できる。また、適当な鎖長の反応性側鎖 (スペース)、ビオチン - アビジン (ストレプトアビジン) 結合、アルブミンやプロテインA等のタンパク質を介して固定化することもできる。また、固定化に際しては、非特異的結合の抑制のため、必要に応じて、チップ表面にブロッキング等の処理を行うこともできる。

20

【0041】

磁気検出手段は、好ましくは磁気センサーであり、磁気センサーとしては、センサー表面上の磁性粒子からの磁気信号を検出できるものであれば制限はなく、例えば、ホール素子、磁気インピーダンス (magneto-impedance : MI) 素子、磁気抵抗 (Magneto Resistive : MR) 素子や巨大磁気抵抗 (Giant Magneto Resistive : GMR) 素子等の磁気抵抗素子、トンネル磁気抵抗 (Tunnel Magneto Resistive : TMR) 素子、超伝導量子干渉素子 (Superconductivity Quantum Interface Device : SQUID) 等を使用することができる。計測手法としては、磁化率測定や磁気緩和測定法等を公知の何れの技術を使用することができる。特に、磁気抵抗素子であるGMR素子であり、S.X Wang他著、Biosensors and Bioelectronics、2010年、第25巻、第9号、第2051～2057頁等に記載されるようなGMRセンサーを利用することが好ましい。例えば、磁場の変化により、磁気センサーの抵抗値が変化することを利用して磁気粒子の磁化を検出するように構成することができる。外部磁場の存在によりセンサー上の磁気粒子が磁化され、磁化された磁気粒子は磁気センサーの抵抗の変化を誘発する。そして、この磁気センサーの抵抗を検出することにより、磁気粒子の存在を検出することができる。なお、磁気センサー自体をチップとして構成することもできる。

30

40

【0042】

更に、チップには、磁場を発生し、当該チップ上に磁場を印加できる少なくとも1つの磁場機構を有する。そして、磁場機構は、同一チップ上に配置された複数の磁気検出手段が同一条件で磁気信号を測定できるように構成される。つまり、チップの全領域に同一条件の磁場が印加され、チップに配置された複数の磁気検出手段の全てが同一条件の下で動作することができる。これにより、複数の被検物質及び内部標準物質を同一条件下で同時に測定することができる。

【0043】

本発明の方法は、被検物質の測定するアッセイ系において、アッセイを妨害する因子、

50

アッセイ環境の相違、アッセイ試薬の活性低下等のアッセイ系に影響を与えている要因によって生じた被検物質の測定値への影響を内部補正により排除するものである。そのために、内部標準物質についても同一アッセイ系で測定される。つまり、既知濃度の内部標準物質についても、被検物質を測定するチップと同一のチップ上で、同一条件下でアッセイする。内部標準物質とは、各被検試料中に含まれる被検物質の測定値を補正するための物質であり、好ましくは濃度若しくは容量が規定されている。補正が必要とされる理由は、本発明の好適な測定対象となる生体試料には、被検物質の他、核酸、タンパク質、脂質、ビタミン、血球、色素等の多種多様な生体内物質（マトリックス）が含まれ、特に、血液試料には光学的測定結果を狂わせる赤血球等が含まれているからである。また、尿試料にもビリルビンやウロビリノーゲン等が含まれ、光学的測定結果を狂わせる。そのため、これらの生体内物質の影響を受け、試料毎の測定結果に差異が生じる。また、試料の採取、試料の保管状況、アッセイまでに要する期間、アッセイ試薬、アッセイ条件等によって測定値は影響され、さらに、磁気信号検出に際しての外部磁場ノイズによっても測定結果に差異が生じるという理由もある。そこで、内部標準物質の測定値に基づいて、被検物質の測定値の補正を行うものである。

10

20

30

40

50

【0044】

ここで、内部標準物質としては、アッセイ系を構成する成分を含んで構成することが好ましい。例えば、既知の濃度の被検物質、捕捉物質、磁性粒子、被検物質と捕捉物質の複合体、捕捉物質と磁性粒子の複合体等を含んで構成することができ、補正目的に応じて適宜選択することができる。また、アッセイ系を構成する成分と同等程度の活性を有する代替物質を内部標準物質としてもよく、例えば、測定環境や保存環境等によって変化し難い天然の化学合成化合物等が好ましく利用できる。アッセイは、内部標準物質と被検物質からの磁気信号の強度を測定することにより行われる。そして、内部標準物質の測定値に基づいて補正係数を算出し、かかる補正係数に基づいて被検物質の測定値の補正を行う。このとき、補正の基準となる測定値は、内部標準物質の既知濃度であっても、測定された磁気信号強度であってもよく、適宜選択することができる。

【0045】

例えば、被検試料にアッセイ系を妨害する因子が含まれる場合には、当該妨害因子による影響を排除するための補正を行うことができる。この場合の補正係数は、例えば、測定された所定の磁気信号強度における、妨害因子を排除した試料中で測定した内部標準物質の濃度に対する前記妨害因子を含む試料中で測定した内部標準物質の濃度の比の値として求められる。内部標準物質は既知濃度あるが、測定する試料にアッセイ系を妨害する因子が含まれるか否かで測定される磁性信号強度は異なるため、同一の磁性信号強度であっても、試料中に含まれる内部標準物質濃度は相違することに基づいて補正係数を算出するものである。つまり、補正係数は、所定の磁気信号強度における、妨害因子を排除した試料中での内部標準物質の濃度で前記妨害因子を含む試料中での内部標準物質の濃度を除算することによって求められる。

【0046】

そして、既知濃度の被検物質を含んだ前記妨害因子を排除した試料について被検物質由来の磁性信号強度を測定した結果を基に検量線を作成する。このとき、検量線は、当該試料中に含まれる被検物質の実際の濃度に前記補正係数を乗算し、乗算して得られた濃度と測定された磁性信号強度に基づいて作成される。そうすることにより、前記妨害因子を含む被検試料中で被検物質を測定し得られた磁性信号強度から、上記検量線に基づいて正確な被検物質の濃度を算出することができる。

【0047】

また、補正係数は、内部標準物質由来の磁性信号と濃度との関係を示す近似線を作成することによっても算出できる。例えば、妨害因子を含む試料中での内部標準物質由来の磁性信号強度、及び前記妨害因子を排除した試料中での内部標準物質由来の磁性信号強度から夫々の近似線を作成する。そして、この2つの近似線が近づくように補正係数を算出する。このとき、上記と同様に、測定された所定の磁気信号強度における、妨害因子を排除

した試料中での内部標準物質の測定値から作成した近似線上の各プロットに対する前記妨害因子を含む試料中での内部標準物質の測定値から作成した近似線上の各プロットの比の値から求めることができる。

【0048】

また、上述した方法とは逆に、補正係数の算出については、所定の磁性信号強度における、妨害因子を含む試料中で測定した内部標準物質の濃度に対する前記妨害因子を排除した試料中で測定した内部標準物質の濃度の比の値として求めてもよい。その場合には、妨害因子を含む被検試料中で測定した被検物質の磁性信号強度から、妨害因子を含まない試料中で測定した被検物質濃度と磁性信号強度の検量線に基づいて仮の被検物質の濃度を算出した後、補正係数を乗算することにより真の被検物質濃度を求めることとなる。いずれの試料に基づいて補正係数を算出するかは、当業者の設計事項の範囲であり、適宜選択することができる。ここで、妨害因子としては血液、尿、又はそれらに含まれるマトリックスが例示され、血液に含まれる血清は抗体活性を低下させる等のイムノアッセイ系において好ましくない事象を誘発する。

10

【0049】

また、測定温度等や磁気信号検出に際して外部磁場ノイズ等の測定環境が異なる被検試料間の補正を行うことができ、異なる測定環境での内部標準物質の測定値から測定環境の相違による補正係数を算出し、かかる補正係数に基づいて測定環境の変動によって生じた被検物質の測定値の差異を補正することができる。これにより、測定環境の異なる試料間においても被検物質の比較が可能になる。さらに、アッセイ用試薬の異常を検知し、当該アッセイ用試薬の異常による被検物質の測定値への影響を補正することができる。

20

【0050】

本発明の方法は、複数の磁気検出手段を設置したチップを利用するものであり、磁気検出手段の数は必要に応じて適宜設定されるものである。したがって、複数のアッセイ系に影響を与えている要因に関する補正を同時に実行することができる。したがって、上述の被検試料にアッセイ系を妨害する因子が含まれる場合の補正、測定環境が異なる場合の補正等を同時に実行することもでき、複数の要因が組み合わされている場合にも、同時にアッセイを実行し、補正を行うことができる。

【0051】

そして、解析機構を設けて、内部標準物質の測定値からの補正係数の算出、及び被検物質の測定値の補正を自動的に行うように構成することができる。例えば、解析機構はコンピュータであり、メモリに所定のソフトウェアを格納し、当該ソフトウェアに沿って磁気信号検出手段、磁場機構、及びその周辺機構を協働動作させるように構成できる。このように構成することで、解析機構は、補正係数を算出する補正係数演算手段として機能や、前記補正係数算出手段によって算出された補正係数に基づいて被検物質の測定値の補正を行う補正実行手段としての機能や、アッセイ用試薬に異常が発見された場合には警告を発する等のアッセイ系を制御する制御手段としての機能等を発揮させることができる。

30

【0052】

このように、本発明の方法により、被検物質の測定するアッセイ系において、アッセイを妨害する因子、アッセイ環境の相違、アッセイ試薬の活性低下等のアッセイ系に影響を与えている要因によって生じた被検物質の測定値への影響を内部補正により排除することができる。これにより被検物質の測定値を正規化でき、被検物質を正確、かつ高精度に測定することができる。したがって、本発明は、ワンチップアッセイ系における被検物質の測定方法をも提供するものであり、当該方法も本発明の一部を構成する。

40

【0053】

以下、本発明の好適な実施形態として、本発明を、抗原物質である被検物質をサンドイッチELISAによって測定するアッセイ系に適用したケースを例示して説明する。ただし、これは本発明の実施形態の一例に過ぎず本発明の内容を限定するものではない。まず、サンドイッチELISAの基本的構成を説明する。予め、固相表面に被検物質を特異的に認識し捕捉することができる第1の抗体を固定化する。そして、必要に応じて固相表面のプロッ

50

キング処理を行う。続いて、被検物質を含む被検試料を固相に接触させ、これにより、被検物質が固相上の第1の抗体に特異的に捕捉される。なお、捕捉されなかった成分は、洗浄等により排除し、必要に応じて固相表面のブロッキング処理を行う。次に、第1の抗体とは別の抗原上のエピトープを特異的に認識し捕捉することができる第2の抗体を接触させ、これにより、第1の抗体 - 被検物質 - 第2の抗体という免疫複合体が基板表面に形成される。なお、捕捉されなかった成分は、洗浄等により排除する。そして、この免疫複合体量を測定することにより被検物質を定量するものである。第1の抗体は固定化抗体として、第2の抗体は検出用抗体として機能するように構成されている。

【0054】

本発明は、上記アッセイ系がチップ上で行われ、上記免疫複合体は磁性粒子で標識される。そして、磁性検出手段により、チップ上で形成された免疫複合体量を測定するように構成される。好ましくは、磁気検出手段は、チップに設置された複数の磁気センサーであり、これらはチップの表面に形成された各ウェル内に夫々配置されている。磁気センサーとしては、GMRセンサーを好適に使用できる。そして、磁気センサーが同一条件で測定できるように構成された少なく1つの磁場機構が設けられている。このように構成することで多成分測定を可能としている。そして、免疫複合体の存在は、第2の抗体に標識された磁性粒子からの磁気信号により測定する。磁気信号強度は被検物質の量に比例することから、試料中に含まれる被検物質を定量することができる。

10

【0055】

具体的な手順は、まず、複数のセンサーが配置されたチップに、第1の抗体と内部標準物質を固定化する。このとき、第1の抗体の固定化量は、チップの複数センサー上に各センサー毎に等量ずつ固定化してもよいし、補正目的に応じて異なる量で固定化するように構成してもよい。続いて、被検物質を含む被検試料をチップに接触させると、チップ上に固定化された第1の抗体が被検物質を特異的に認識し捕捉する。次に、第2の抗体を接触させ、これにより、第1の抗体 - 被検物質 - 第2の抗体という免疫複合体がチップ表面に形成される。そして、この免疫複合体を測定することにより被検物質を定量するものである。好ましくは、ビオチン標識された第2の抗体を被検物質と反応させ、免疫複合体形成後に、ストレプトアビジンで標識された磁性粒子を接触させる。これにより、ビオチン - ストレプトアビジン結合等を介して、磁性粒子により第2の抗体は標識されることとなる。同時に内部標準物質について同様の処理を行う。内部標準物質は、被検物質の測定値に影響を与えている要因を排除するための補正を行うためのものである。内部標準物質は、被検物質の測定値に影響を与えている要因の存在下及び不在下で測定され、かかる測定値に基づいて補正係数が算出される。そして、かかる補正係数に基づいて被検物質の測定値を補正するものである。

20

30

【0056】

アッセイを妨害する因子によって生じた被検物質の測定値への影響の補正について、血清を例示して説明する。被検試料が血清である場合の測定値の補正は、被検物質を含まないか、被検物質を含んでも濃度が規定されている血清中での内部標準物質由来の磁気信号強度を測定する。同時に血清を排除した試料中での内部標準物質由来の磁気信号強度を測定する。測定後、これらの磁気信号強度と濃度の関係についての近似線を作成する。

40

【0057】

また、血清を含む試料中で測定した内部標準物質について作成した近似線を基準として、2つの近似線が近づくように補正係数を算出する。そして、血清を含まない試料中の濃度既知の被検物質由来の磁性信号強度を測定した結果より、磁性信号強度と濃度の関係を示す検量線を作成する。このとき、被検物質の濃度には、算出された補正係数を乗算して検量線を作成する。続いて、血清を含む被検試料中で測定された被検物質由来の磁性信号強度から、上記検量線に基づいて、被検試料中に含まれる被検物質の濃度を算出することができる。

【0058】

また、反対に、血清を排除した試料中で測定した内部標準物質について作成した近似線

50

を基準として、2つの近似線が近づくように補正係数を算出する。そして、被検試料である血清中に含まれる被験物質を測定し得られた濃度に補正係数を乗算することによっても補正を行うことができる。このように補正することにより、血清が被検物質のアッセイ系に与える影響を排除することができ、測定結果の正確性及び信頼性を確保できる。このとき、内部標準物質として、ビオチン標識アルブミン等を利用することができる。これを磁性粒子で標識したストレプトアビジンにより、内部標準物質量を磁性信号の強度として検出することができる。

【0059】

また、測定温度や外部磁場ノイズ等の測定環境が異なる被検試料間の補正は、異なる測定環境下で測定した内部標準物質の磁気信号強度を夫々得る。そして、異なる測定環境下で測定した磁気信号強度と濃度の関係についての近似線を作成する。そして、一方の測定環境下で測定した内部標準物質についての近似線を基準として、その他の測定環境下での測定によって作成された近似線が近づくように補正係数を算出する。そして、かかる補正係数を他方の測定環境で測定された被検物質の濃度に乗算することにより補正を行うことができる。これにより、測定環境の異なる試料間においても被検物質量の比較が可能になる。このとき、内部標準物質として、ビオチン標識アルブミン等を利用することができる。これを磁性粒子で標識したストレプトアビジンにより、内部標準物質量を磁性信号の強度として検出することができる。

10

【0060】

また、測定環境が異なる被検試料間の補正を行う場合に、例えば、上記の第1の抗体（固定化抗体）を異なる量でチップ上に固定化し、夫々の第1の抗体に由来する磁性信号の強度を検出することによっても行うことができる。第1の抗体に由来する磁性信号強度の検出は、第1の抗体を直接磁性粒子で標識することによって行ってもよいし、濃度が予め規定された被検物質及び第2の抗体を介して磁性粒子で標識することによって行ってもよい。そして、固定化された第1の抗体由来の磁性信号の強度と固定化抗体量の関係についての検量線（近似線）を作成し、これを利用して補正係数の算出に利用することができる。なお、補正係数の算出及び被検物質の測定値の補正は、上述のアッセイを妨害する因子によって生じた被検物質の測定値への影響の補正と同様に行うことができる。

20

【0061】

アッセイ用試薬の異常を検知し、当該アッセイ用試薬の異常による被検物質の測定値への影響の補正は、例えば、磁性粒子の活性を確認したい場合には、ビオチンを内部標準物質として行うことができる。そして、ビオチンをチップ上に固定化する。このとき、アルブミン等の他の成分を含んで固定化してもよい。そして、正常な磁性粒子としての活性を発現するストレプトアビジン標識磁性粒子と、活性を確認したいストレプトアビジン標識磁性粒子を夫々内部標準物質に反応させる。磁気信号強度を測定し、この測定結果に基づいて磁性粒子の活性を確認することができる。また、被検物質の測定に用いた磁性粒子に異常が検知された場合には、磁性粒子の異常により生じた被検物質の測定値の異常を補正することができる。この場合の補正は、上述のアッセイを妨害する因子によって生じた被検物質の測定値への影響の補正と同様に行うことができる。

30

【0062】

また、捕捉物質の活性を確認したい場合には、内部標準物質として、当該捕捉物質と同等の被検物質に対する反応性を有する非天然物質を使用することが好ましい。ここでは、活性確認対象が上述の第2の抗体（検出用抗体）である場合を例示して説明する。内部標準物質として、抗体活性が測定環境や保存環境等によって変化し難い非天然物質、特に化学合成化合物が好ましく利用できる。例えば、当該抗体活性に類似する活性を有する合成ペプチド、合成ポリペプチド、合成タンパク質、DNAにタンパク質を構成するアミノ酸の部分構造を化学的に組み込んだ化合物等を利用することが好ましく、所謂、人工抗体として知られている物質を利用することができる。

40

【0063】

そして、内部標準物質及び第2の抗体由来の磁性信号の強度をワンチップ上で磁気検出

50

手段により検出する。このとき、第2の抗体及び内部標準物質のチップ上への固定化は、直接固定化してもよいし、濃度や量が予め規定された被検物質や第1の抗体等を介して間接的に固定化してもよい。また、磁性信号強度の検出は、第2の抗体及び内部標準物質を直接磁性粒子で標識することによって行ってもよいし、抗原抗体反応やストレプトアビジン-ビオチン結合等を介して間接的に磁性粒子で標識することによって行ってもよい。検出結果に基づいて第2の抗体の活性を確認することができる。つまり、内部標準物質は非天然物質であることから抗体活性の変化し難いが、第2の抗体は生理活性成分であるためその活性は測定環境や保存環境等に要因によって活性が低下したり、最悪の場合には失活する。したがって、内部標準物質との比較での第2抗体からの磁性信号強度の低下により、第2の抗体の劣化等の異常が検知することができる。そして、被検物質の測定に用いた第2の抗体に異常が検知された場合には、第2の抗体の異常により生じた被検物質の測定値の異常を補正することができる。この場合の補正は、上述のアッセイを妨害する因子によって生じた被検物質の測定値への影響の補正と同様に行うことができる。同様にして、第1の抗体（固定化抗体）の活性を確認することができる。

10

【0064】

第2の抗体の活性を確認する別の方法としては、予め濃度が規定された被検物質を内部標準物質とすることもでき、被検物質をチップ上に固定化する。このとき、他の成分を含んで固定化してもよい。これにより第2の抗体のロット差や保存期間等の影響による抗体活性の劣化等の異常を検出することができる。

20

【0065】

（本発明の別の実施形態）

本発明の別の実施形態として、被検物質の測定値に影響を与えている要因分の補正と反対に、被検試料中に含まれる「濃度参照物質」を内部標準物質として使用し、被検物質の測定値を内部補正することができ、かかる形態も本発明の一部を構成する。

【0066】

ここで、「濃度参照物質」とは、測定対象となる被検試料中に常にほぼ一定量含まれている物質を意味する。好ましくは、同一種類の被検試料中に常にほぼ一定量含まれている物質である。特に、生体試料に含まれる物質の場合、それが由来する生体の一個体においてはほぼ一定量含まれているが、個体差によりその含有量の変動する物質がある。そのような物質であっても、同一個体間でほぼ一定量含まれている限り濃度参照物質とすることができる。つまり、かかる一個体由来の被検試料中の被検物質の測定の際の内部標準物質とすることができる。したがって、性差、年齢層、体重、民族、期間等によりその含有量が異なる場合であっても、同一グループ内であればほぼ一定量含まれる限りその物質を濃度参照物質として、本発明の方法において使用することができる。

30

【0067】

具体的な濃度参照物質として、尿中に含まれるクレアチニン、イヌリン等が例示されるがこれらに限定されるものではない。例えば、クレアチニンの一日の排泄量は筋肉量に比例し、1日のクレアチニン排泄量はほぼ一定であることが知られている。つまり、クレアチニンは、食物や水分の摂取、消化器官での消化や吸収、発汗等の生理的変動因子の影響を受けず、また、腎臓における腎細管で再吸収されることなく腎臓からほぼ一定量排出される。一方、被検物質が尿中に含まれる生理活性物質である場合には、尿中の被検物質の濃度は、上述の食事や水分の摂取、発汗等の生理的変動因子の影響を受け、その尿中濃度は排出の際の尿量によって大きく変動する。したがって、生理活性物質の濃度は、尿の濃縮や希釈度に大きく左右されるため尿中濃度のみで判断を行うと誤った診断結果を導くことになる。そこで、尿中にほぼ一定量含まれるクレアチニン濃度を内部標準物質として参照することで、尿中の生理活性物質の濃度の補正を行うことができる。

40

【0068】

内部標準物質として濃度参照物質を使用する場合には、まず、被検試料中の被検物質と、当該被検試料中に含まれる濃度参照物質を、本発明の第一の実施形態で説明した通り、同一のチップ上で同時に、これらに由来する磁性信号の強度を検出することにより測

50

定する。このとき、濃度参照物質のチップ上への固定化は、直接固定化してもよいし、抗原抗体反応やストレプトアビジン ビオチン結合等を介して間接的に固定化してもよい。また、磁性信号の検出は、濃度参照物質を直接磁性粒子で標識することによって行ってもよいし、抗原抗体反応やストレプトアビジン ビオチン結合等を介して間接的に磁性粒子で標識することによって行ってもよい。なお、被検物質からの磁性信号強度の測定は、本発明の第一の実施形態で説明した通りに行うことができる。

【0069】

そして、測定された濃度参照物質量を参照して、当該被検試料中に含まれる被検物質の測定値の補正を行う。補正係数の算出も、本発明の第一の実施形態に準じて行うことができる。被検試料毎に含まれる濃度参照物質量は一定であるので、被検試料間における磁性信号強度が一定になるように各被検試料毎に補正係数を算出する。このとき、1の被検試料を基準として、各被検試料中の濃度参照物質由来の磁性信号強度を、基準の被検試料中の濃度参照物質由来の磁性信号強度で除算して補正係数を求めることができる。そして、算出された各被検試料毎の補正係数を、対応する被検試料に含まれる被検物質を測定した磁気信号強度に乗算することで、補正を行うことができる。これにより正確な被検物質量を測定することができる。また、補正係数の算出に際して、予め、既知の濃度参照物質量と磁性信号強度との関係を求めた検量線を作成し、かかる検量線に基づいて濃度参照物質量を算出し、かかる濃度参照物質量が一定になるように補正係数を算出してもよい。

10

【0070】

濃度参照物質を内部標準物質とすることにより、特に、生体試料中に含まれる生理活性物質等の生理的変動因子の影響により生じた測定値のズレを内部補正により補正することができる。これにより被検物質の測定値を正規化でき、被検物質を正確かつ高精度に測定することができる。したがって、このように濃度参照物質を内部標準物質として被検物質の測定値を内部補正により正規化する工程を有する被検物質の測定方法も本発明の一部を構成する。

20

【0071】

(効果)

本発明の方法は、ワンチップアッセイ系において、内部標準物質の測定値に基づいて算出された補正係数を用いて被検物質の測定値を有効に補正するものである。このように構成することで、測定結果の正確性及び信頼性を確保することができ、測定精度が向上する。

30

【0072】

また、本発明の方法は、被検物質の測定値において、アッセイ系に影響を与える要因によって生じた分について有効に補正できることから、クルードな試料をそのまま測定したいという市場の要望に応えることができる。特に、全血や血清等の生体試料の測定等の臨床医療分野における利用価値は高い。そして、複数の磁気検出手段を配置した1つのチップ上で、被検物質及び内部標準物質の測定を行えることから、測定機器の小型化を図れ、コストの低減にもつながる。そして、磁気検出手段を必要な数だけチップに配置することにより複数の被検物質の同時測定、つまり多成分アッセイが可能となる。

40

【0073】

さらに、本発明の方法は磁性粒子の磁性エネルギーである磁性信号を測定することから、赤血球成分等の光学的な妨害物質に関係なく、被検物質を測定することができるという利点がある。また従来 of イムノアッセイの標準とされているELISAの反応原理をそのまま活用できるという利点もある。したがって、ELISA用に確立された抗体等の試薬類を利用することができると共に、ELISAにより測定方法が確立された多種多様な被検物質の測定に適用することができる。

【0074】

実施例1．抗体活性の劣化の補正

本実施例は、被検試料にアッセイ系を妨害する因子が含まれる場合には、当該妨害因子による影響を排除するための補正を検討したものである。詳細には、妨害因子によるアッ

50

セイ系への影響が血清による抗体活性の劣化であり、かかる影響を受けた測定値のバラツキの補正について肺がんマーカーの定量例により検討を行った。

【0075】

(手順)

本実施例では、磁気検出手段としてGMRセンサーを使用した。GMRセンサーはS.X Wang 他著、Biosensors and Bioelectronics、2010年、第25巻、第9号、第2051～2057頁の記載に基づいて構築したものをを使用した。GMRセンサ上に、肺がんマーカーである上皮成長因子受容体(以下、「EGFR」と称する)抗体、内部標準物質であるビオチン標識BSA(以下、「Bio-BSA」と称する)を、専用装置を使って固定化した。Bio-BSAの固定化量は、用いる検出系の IC_{50} を挟む複数水準が好ましい。今回は3水準(4pg、0.4pg、0.04pg)を固定した。EGFR抗体は、Human EGFR/ErbB1 Antibody、R&D systems社製、Catalog No.AF231を、Bio-BSAは、Albumin, biotin labeled bovine, lyophilized powder、Sigma社製、Catalog No.A8549を使用した。固定化後、真空ポンプで1時間乾燥させ、2%BSA/PBSを200 μ L添加してブロッキング処理を1時間行った。続いて、定量性を確認するために、0、0.1、1、10ng/mLのEGFR溶液(n=2:以下、「buffer 1」、「buffer 2」と称する)と、0、0.1、1、10ng/mLのEGFR溶液に血清(2ng/mLのEGFRを含有)を加えた溶液(n=2:以下、「serum 1」、「serum 2」と称する)を夫々100 μ L添加し、2時間静置した。血清試料は、抗体の活性の劣化を引き起こすことが知られている。前述の溶液を廃棄し、0.1%BSA、0.05%Tween20/PBSで3回洗浄後、ビオチン標識抗EGFR抗体(1 μ g/mL)を100 μ L加えて1時間静置した。ビオチン標識抗EGFR抗体は、Biotinylated Antibody Antigen Affinity Polyclonal Goat IgG、R&D systems社製、Catalog No.BAF231を使用した。静置後、前述の抗体溶液を廃棄し、0.1%BSA、0.05%Tween20/PBSで3回洗浄後、ストレプトアビジン標識磁性ナノ粒子溶液100 μ Lを加えた。ストレプトアビジン標識磁性ナノ粒子としては、15nmの磁性コア粒子に1粒子当たり3～10分子のストレプトアビジンを化学結合させて標識したものをを使用した。そして、磁性ナノ粒子との反応15分後に磁気信号の強度を測定した。磁気信号の強度(parts per million:ppm)は下記の式の通りに算出した。

10

20

【0076】

磁気信号の強度(ppm) 変化した磁性抵抗() / 掛けている磁性抵抗()

注: 変化する磁性抵抗は約 μ であり、センサーに掛けている磁性抵抗は約2k であるため、磁気信号の強度の単位は「ppm」となる。

30

【0077】

(結果)

「buffer」及び「serum」の試料についての測定結果を図1のグラフに示す。グラフは、横軸が試料中に含まれるEGFR溶液の濃度(ng/ml)であり、縦軸が磁性粒子からの磁気信号の強度(ppm)である。理想としては、「buffer」及び「serum」の試料の測定結果は直線性が成立するべきではある。しかしながら、「serum」の試料は血清を添加していることから、当然のことながら直線性にズレが生じる。「buffer」の試料の測定結果によって作成した検量線への回帰率(相対係数)は、 $r^2 = 0.81$ であった。

【0078】

血清を添加した「serum」の試料の測定結果の直線性が得られなかったため、抗体活性を落とす要因分の補正が必要であると判断し、内部標準物質であるBio-BSAの測定結果より補正を試みた。Bio-BSAの測定結果を図2のグラフに示す。なお、グラフ中、「buffer Bio-BSA」はEGFR溶液を加えた試料、「serum Bio-BSA」はEGFR溶液に血清試料(2ng/mLのEGFRを含有)を加えた試料の測定値の平均値をプロットして作成した近似線である。この2つの近似線が近づく補正係数を算出したところ、補正係数=1.3との数値が得られた。続いて、算出した補正係数を「buffer-Bio-BSA」の測定値(濃度)に乗算し補正を行った結果を図3に示す。つまり、図2の「buffer-Bio-BSA」のグラフを、横軸(濃度)方向に1.3倍乗算したグラフが図3に相当する。

40

【0079】

続いて、内部標準であるBio-BSAの測定結果から得られた補正係数を、図1の「buffer

50

」の試料の測定値（濃度）に乗算して補正を行った。結果を図4に示す。そして、補正後の図4のグラフにおいて、検量線への回帰率（相対係数）を算出したところ $r^2 = 0.93$ となった。内部標準物質による補正により、臨床試験における許容範囲内に回帰率をおさめることができることが確認できた。つまり、本発明により、被検試料に含まれるアッセイ系を妨害する因子による影響を有効に補正できることが実証された。

【0080】

実施例2．測定環境の相違の補正

本実施例は、被検試料を測定した際の環境の相違による測定値の誤差の補正を検討したものである。詳細には、測定日時及び測定温度の相違により生じた測定値の誤差の補正について、実施例1と同様に肺がんマーカーの定量例により検討を行った。

10

【0081】

（手順）

実施例1と同様に、GMRセンサ上に、EGFR抗体、内部標準物質であるビオチン標識BSA（以下、「Bio-BSA」と称する）を、専用装置を使って固定化した。Bio-BSAの固定化量は実施例1と同じである。固定化後、真空ポンプで1時間乾燥させ、2%BSA/PBSを200 μ L添加してブロッキング処理を1時間行った。続いて、定量性を確認するために、0、0.1、1、10ng/mLのEGFR溶液を100 μ L添加し、2時間静置した。前述の溶液を廃棄し、0.1%BSA、0.05%Tween20/PBSで3回洗浄後、ビオチン標識抗EGFR抗体（1 μ g/mL）を100 μ L加えて1時間静置した。静置後、前述の抗体溶液を廃棄し、0.1%BSA、0.05%Tween20/PBSで3回洗浄後、ストレプトアビジン標識磁性ナノ粒子溶液100 μ Lを加えた。そして、磁性ナノ粒子との反応15分後に磁気信号の強度を測定した。なお、本実施例において使用した試薬は、特に記載がない場合には実施例1と同じ試薬を使用し、また、実験手順についても、特に記載がない場合には実施例1に準じて同様の手順により行った。

20

【0082】

以上の測定工程を、測定日時及び測定温度を変えて行った。詳細には、2011年11月3日に20で測定した試料（ $n=1$ ）：以下、「1103 buffer」と称する）、2011年11月7日に23で測定した試料（ $n=2$ ：以下、「1107 buffer 1」、「1107 buffer 2」と称する）である。

【0083】

（結果）

「1103 buffer」及び「1107 buffer」の試料についての測定結果を図5のグラフに示す。理想としては、「1103 buffer」及び「1107 buffer」の試料の測定結果は同一となるはずである。しかしながら、測定環境、特に温度の相違が抗原抗体反応に影響を与え、測定値にズレが生じた。検量線への回帰率（相対係数）は、 $r^2 = 0.89$ であった。

30

【0084】

測定環境の相違により測定値にズレが生じたため、測定環境の相違により生じた誤差の分の補正が必要であると判断し、実施例1と同様に内部標準物質であるBio-BSAの測定結果より補正を試みた。Bio-BSAの測定結果について図6のグラフに示す。なお、グラフ中、「1103 Bio-BSA」は2011年11月3日に20で測定した試料、「1107 Bio-BSA」は2011年11月7日に23で測定した試料の測定値の平均をプロットして作成した近似線である。この2つの近似線が近づく補正係数を算出したところ、補正係数=1.3との数値が得られた。続いて、算出した補正係数を「1107 Bio-BSA」の測定値（濃度）に乗算し補正を行った結果を図7に示す。つまり、図6の「1107 Bio-BSA」のグラフを、横軸（濃度）方向に1.3倍乗算したグラフが図7に相当する。

40

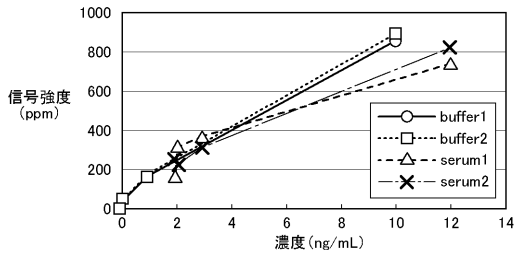
【0085】

続いて、内部標準物質であるBio-BSAの測定結果から得られた補正係数を、図5の「1107 Bio-BSA」の試料の測定値（濃度）に乗算して補正を行った。結果を図8に示す。そして、補正後の図8のグラフにおいて、検量線への回帰率（相対係数）を算出したところ、 $r^2 = 0.98$ となった。内部標準物質による補正により、臨床試験における許容範囲内に回帰率をおさめることができることが確認できた。つまり、本発明により、測定環境の相違に

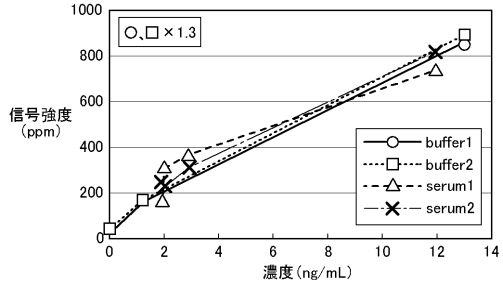
50

より生じる測定誤差を有効に補正できることが実証された。

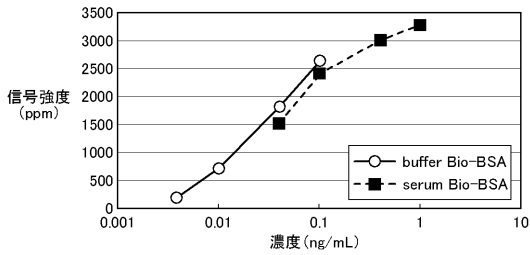
【 図 1 】



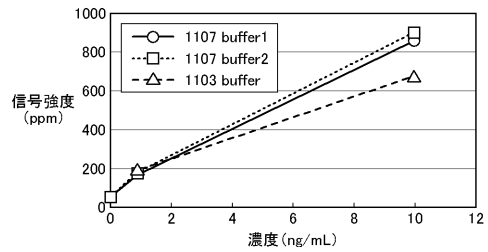
【 図 4 】



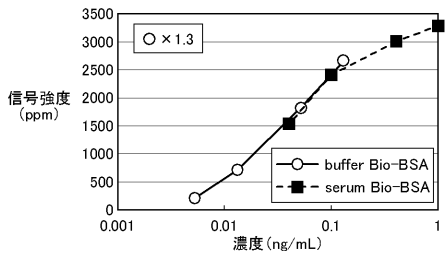
【 図 2 】



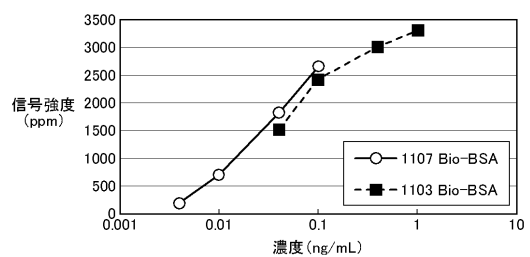
【 図 5 】



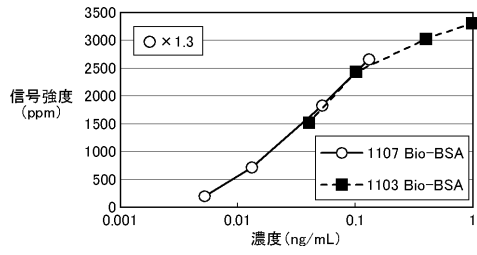
【 図 3 】



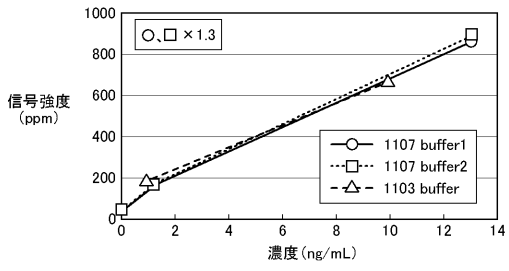
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 27/74

(72)発明者 ヘング ユー

アメリカ合衆国 カルフォルニア 9 5 0 0 8 キャンベル バレー フォージ ウェイ 5 6 0

Fターム(参考) 2G053 AA01 AB01 BA08 BB01 CA06 CB07 CB08 CC03

专利名称(译)	单芯片测定中的内部校正方法和使用该方法测量测试物质的方法。		
公开(公告)号	JP2015127694A	公开(公告)日	2015-07-09
申请号	JP2014107258	申请日	2014-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	爱信精机株式会社		
申请(专利权)人(译)	爱信精机株式会社 Maguarei公司		
[标]发明人	笏山政慶 ヘングユー		
发明人	笏山 政慶 ヘング ユー		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/574 G01N33/53 G01N27/74		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54393		
FI分类号	G01N33/543.501.L G01N33/543.541.A G01N33/543.545.L G01N33/574.A G01N33/53.D G01N27/74		
F-TERM分类号	2G053/AA01 2G053/AB01 2G053/BA08 2G053/BB01 2G053/CA06 2G053/CB07 2G053/CB08 2G053/CC03		
优先权	14/142187 2013-12-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 单芯片测定中的内部校正方法和使用该方法测量测试物质的方法。 解决方案：通过磁性检测手段检测来自用捕获物质标记的磁性颗粒的磁信号的强度，测量通过抗原 - 抗体反应与受试物质和捕获物质的免疫复合物的量。在测定中的内部校正方法中，通过执行在一个芯片上测量测试物质的测定系统和测量内标物质的测定系统来进行测试物质的测量值的内部校正。通过内部校正将测试物质的测量值归一化来量化测试物质。 【选择图表】 无	(21) 出願番号 特願2014-107258 (P2014-107258) (22) 出願日 平成26年5月23日 (2014. 5. 23) (31) 優先権主張番号 14/142187 (32) 優先日 平成25年12月27日 (2013. 12. 27) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 000000011 アイシン精機株式会社 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地 513220126 マグアレイ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 94089 カリフォルニア, サニーヴェイル, ボルトー ドライブ 1230 (74) 代理人 110001818 特許業務法人R&C (72) 発明者 笏山 政慶 愛知県刈谷市朝日町二丁目一番地 アイシン精機株式会社内
	最終頁に続く	