

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6482532号
(P6482532)

(45) 発行日 平成31年3月13日(2019.3.13)

(24) 登録日 平成31年2月22日(2019.2.22)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 1 5 L
GO 1 N 33/49	(2006.01)	GO 1 N 33/49	B
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N 33/50	Z
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

請求項の数 13 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-513426 (P2016-513426)
 (86) (22) 出願日 平成26年5月12日 (2014.5.12)
 (65) 公表番号 特表2016-519316 (P2016-519316A)
 (43) 公表日 平成28年6月30日 (2016.6.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2014/051086
 (87) 国際公開番号 W02014/184476
 (87) 国際公開日 平成26年11月20日 (2014.11.20)
 審査請求日 平成29年5月12日 (2017.5.12)
 (31) 優先権主張番号 1354276
 (32) 優先日 平成25年5月13日 (2013.5.13)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 304043936
 ビオメリュー
 BIOMERIEUX
 フランス国 F-69280 マーシー
 レトワール
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦
 (72) 発明者 シルヴィエ・シュッシュ
 フランス・F-69890・ラ・トゥール
 ・ドゥ・サルヴァニー・リュ・デュ・ジャ
 ックメ・32

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析物の血漿中濃度を全血試料で直接測定するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

全血試料中の分析物の量を測定する方法であって、

- ・ 全血試料のヘマトクリットレベルを測定する工程と、
- ・ 分析物量を全血試料中で直接測定する工程と、
- ・ 関係

$$D_p = P_a (D_{ST}, D_H)$$

(式中、 D_p は補正された分析物量であり、 D_{ST} は測定された分析物量であり、 D_H は測定されたヘマトクリットレベルであり、 P_a は、不定値として、測定された分析物量 D_{ST} 及び測定されたヘマトクリットレベル D_H を有し、分析物に応じたその多項式係数を有する、次数が

1以上の変数多項式である)

により補正された分析物量を算出する工程と

を含むことを特徴とし、

前記分析物がD-ダイマー又は心筋トロポニンIである、方法。

【請求項2】

全血試料中の分析物濃度を測定する方法であって、

- ・ 全血試料のヘマトクリットレベルを測定する工程と、
- ・ 全血試料中の分析物量を直接測定し、測定された量を試料体積で割ることによって、測定された量を濃度に変換する工程と、
- ・ 関係

$$C_p = P_a (C_{ST}, D_H)$$

(式中、 C_p は補正された分析物濃度であり、 C_{ST} は測定された分析物濃度であり、 D_H は測定されたヘマトクリットレベルであり、 P_a は、不定値として、測定された分析物濃度 C_{ST} 及び測定されたヘマトクリットレベル D_H を有し、分析物に応じたその多項式係数を有する、次数が1以上の変数多項式である)

により補正された分析物濃度を算出する工程と

を含むことを特徴とし、前記分析物がD-ダイマー又は心筋トロポニンIである、方法。

【請求項3】

多項式 P_a が、測定された分析物濃度 D_{ST} に測定されたヘマトクリットレベル D_H を掛けた積 $D_{ST} \times D_H$ 又は測定された分析物濃度 C_{ST} に測定されたヘマトクリットレベル D_H を掛けた積 $C_{ST} \times D_H$ を含むことを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

10

【請求項4】

補正された分析物濃度が、関係

$$D_p = a_0 + a_1 \times D_{ST} + a_2 \times D_H + a_{12} \times D_{ST} \times D_H$$

(式中、 a_0 、 a_1 、 a_2 及び a_{12} は、分析物に応じた所定の係数である)

により算出されることを特徴とする、請求項1又は3に記載の方法。

【請求項5】

補正された分析物濃度が、関係

$$C_p = a'_0 + a_1 \times C_{ST} + a'_2 \times D_H + a_{12} \times C_{ST} \times D_H$$

(式中、 a'_0 、 a_1 、 a'_2 及び a_{12} は、分析物に応じた所定の係数である)

により算出されることを特徴とする、請求項2又は3に記載の方法。

20

【請求項6】

分析物がD-ダイマーであり、

- ・ a'_0 が、 -29.311×0.9 から -29.311×1.1 の範囲であり、
- ・ a_1 が、 0.788×0.9 から 0.788×1.1 の範囲であり、
- ・ a'_2 が、 0.702×0.9 から 0.702×1.1 の範囲であり、且つ
- ・ a_{12} が、 0.018×0.9 から 0.018×1.1 の範囲である

ことを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

- ・ $a'_0 = -29.311$ 、
- ・ $a_1 = 0.788$ 、
- ・ $a'_2 = 0.702$ 、且つ
- ・ $a_{12} = 0.018$ である

ことを特徴とする、請求項5に記載の方法。

30

【請求項8】

分析物が心筋トロポニンIであり、

- ・ a'_0 が、 -0.0052×0.9 から -0.0052×1.1 の範囲であり、
- ・ a_1 が、 0.9155×0.9 から 0.9155×1.1 の範囲であり、
- ・ a'_2 が、 0.0002×0.9 から 0.0002×1.1 の範囲であり、且つ
- ・ a_{12} が、 0.0072×0.9 から 0.0072×1.1 の範囲である

ことを特徴とする、請求項5に記載の方法。

40

【請求項9】

- ・ $a'_0 = -0.0052$ 、
- ・ $a_1 = 0.9155$ 、
- ・ $a'_2 = 0.0002$ 、且つ
- ・ $a_{12} = 0.0072$ である

ことを特徴とする、請求項5又は8に記載の方法。

【請求項10】

分析物量/濃度が、直接、間接及び競合ELISA、ELFA並びに免疫捕捉技術から成る群から選択されるイムノアッセイ技術により測定されることを特徴とする、請求項1から9のい

50

れか一項に記載の方法。

【請求項 1 1】

全血試料中の分析物の血漿中量を測定するためのデバイスであって、

- ・ 前記全血試料を受ける手段と、
- ・ 全血試料中の総分析物量を測定する手段と、
- ・ 関係

$$D_p = P_a(D_{ST}, D_H)$$

(式中、 D_p は補正された分析物量であり、 D_{ST} は測定された分析物量であり、 D_H は測定されたヘマトクリットレベルであり、 P_a は、不定値として、測定された分析物量 D_{ST} 及び測定されたヘマトクリットレベル D_H を有し、分析物に応じたその多項式係数を有する、次数が1以上の変数多項式である)

により補正された分析物量を算出する手段と

を含むことを特徴とし、前記分析物がD-ダイマー又は心筋トロポニンIである、デバイス

。

【請求項 1 2】

全血試料中の血漿中分析物濃度を測定するためのデバイスであって、

- ・ 前記全血試料を受ける手段と、
- ・ 全血試料中の総分析物量を測定する手段と、
- ・ 分析物量を濃度に変換する手段と、
- ・ 全血試料のヘマトクリットレベルを入力するか、又は測定する手段と、
- ・ 関係

$$C_p = P_a(C_{ST}, D_H)$$

(式中、 C_p は補正された分析物濃度であり、 C_{ST} は測定された量及び試料体積から算出された分析物濃度であり、 D_H は測定されたヘマトクリットレベルであり、 P_a は、不定値として、測定された量から得られた分析物濃度 C_{ST} 及び測定されたヘマトクリットレベル D_H を有し、分析物に応じたその多項式係数を有する、次数が1以上の変数多項式である)

により補正された分析物濃度を算出する手段と

を含むことを特徴とし、前記分析物がD-ダイマー又は心筋トロポニンIである、デバイス

。

【請求項 1 3】

請求項3から10のいずれか一項に記載の方法を実行することができることを特徴とする、請求項11又は12に記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学的試料の分析に関し、特に、血液試料中の分析物の濃度又は量の測定に関する。本発明は、特に、ELISA、ELFA又は免疫捕捉タイプのイムノアッセイ測定に応用される。

【背景技術】

【0002】

通常、対象の分析物を含む可能性の高い全血試料において対象の分析物及びその濃度を調査するには、最初に、特に遠心分離によって血漿を赤血球と分離する工程、更にその後、血漿中の分析物濃度を測定する工程が含まれる。

【0003】

「全血」とは、その成分のすべて、よって、特に血漿及び赤血球を含む血液を含む生物学的試料に当たる。全血は、例えば、ヒト若しくは動物から採取された、いかなる変化も加えていない血液又は補助薬、例えば、抗凝固剤を添加した同じ血液であってもよい。

【0004】

濃度測定法の中で、血液試料中の分析物の含量に準じた測定可能な特性、例えば、光学的、電氣的、化学的、pH又は酵素特性を変更することを含む技術が知られており、とりわ

10

20

30

40

50

け、いわゆる、直接、間接及び競合ELISA(「酵素結合免疫吸着測定」)、ELFA(「酵素免疫蛍光測定(Enzyme-Linked Fluorescence Assay)」)、及び免疫捕捉技術である。

【0005】

図1は、分析物と結合する2つのパートナーを伴うため「サンドイッチ」ELISAとも呼ばれる直接ELISA測定法の主要な工程を模式的に示しており、ここでは、例えば、分析物は抗原であり、2つの結合パートナーは抗体である。それぞれが、互いに異なる部位又は抗原決定基を含み、それぞれが、相補的部位が備わっている前記抗原と結合することができる。ELISA測定法は、その最も単純なタイプとして、

- ・ 例えば、検出をしたい又はその濃度の測定をしたい分析物の第1の結合パートナーの層によりウェル等の固体支持体の表面をコーティングする工程であって、第1の結合パートナーが、分析物に対して相補的な部位を提示する工程(図1A)と、

10

- ・ 全血試料の遠心分離により生じた血漿等の血液試料をそのウェルに注ぎ(図1B)、その結果、血漿中に存在する分析物は、ウェルの壁に固定された第1の結合パートナーと結合する工程(図1C)と、

- ・ 進行中の分析の対象でない要素、例えば、調査対象でない抗体及び抗原を除去するためにウェルの第1の洗浄を行う工程(図1D)と、

- ・ 分析物に対する第2の結合パートナーをウェルに注ぐ工程であって、それぞれが(i)第1の結合パートナーによって固定された分析物の結合していない部位の1つと相補的で、第1の結合パートナーの相補的部位とは異なる部位、及び(ii)触媒される水素の量に従って色が変化する基質の加水分解を触媒することができる酵素機能を有する構成要素を備え(図1E)、酵素機能を含むそのような第2の結合パートナーが「複合体」と呼ばれる工程と、

20

- ・ 過剰な複合体を除去するためにウェルの第2の洗浄を行う工程(図1F)と、

- ・ 複合体の酵素機能によって分解可能な基質をウェルに添加し、スペクトロメトリによってウェルに含まれる媒体のクロミナンス又は吸光度を測定する工程(図1G)とを含む。

【0006】

クロミナンスは、固体支持体の壁に固定された第1の結合パートナーによって固定された分析物の数量又は量に直接依存するため、この光学的特性の測定は、それゆえ、血漿試料中に存在する分析物の総量、更にそれに応じて、試料の体積がわかれば、その中の分析物濃度の間接的な測定になる。測定されたクロミナンスは、その後、所定の数学的モデルによって量及び/又は濃度の値に変換される。「量」とは、このように試料中の分析物の量を意味する。「濃度」とは、測定を行った試料の体積で割った量を意味する。

30

【0007】

「競合」ELISAは、分析物の部位のうちの1つに対して相補的な部位を提示する、分析物に対する1つの結合パートナー並びにアッセイ対象の分析物と競合する化合物を伴う。その上、2つの要素のうち的一方は、触媒された加水分解の量に従って色が変化する基質の加水分解を触媒することができる酵素機能を有する。それゆえに、量、したがって濃度は、読み取られたクロミナンスに反比例する。

【0008】

ELFA測定法は、酵素機能によって触媒される基質が、例えば、蛍光光度計によって測定される蛍光を生じるという事実を別にすればELISA測定法と類似している。

40

【0009】

こうしたすべての測定技術は、測定したい濃度を有する分析物を固定するだけの要素を提供する。後者のみが特異的に固定されるが、ただし、とりわけ、診断にまつわる時間的制約のために反応時間を短縮する際に、試料の性質が量の測定に実質的に影響を与えることが観察される場合がある。したがって、測定が全血試料に直接行われる場合、測定された量が、特に、マトリックス効果のあるヘマトクリットの存在により血漿試料で直接測定される量よりも小さい。

【0010】

それ自体公知であるように、ヘマトクリットレベル又は血球容積は、全血体積に対して

50

赤血球が占める相対的体積に当たる。診断のための試料として血漿試料の代わりに全血試料を使用するイムノアッセイ計器の特定の製造業者は、全血試料において決定された分析物量を下記式

【 0 0 1 1 】

【数 1】

$$D_p = \frac{D_{ST}}{1 - \frac{D_H}{100}} \quad (1)$$

【 0 0 1 2 】

(式中、 D_p は補正された分析物量であり、 D_{ST} は全血試料で直接測定された分析物量であり、 D_H は全血試料のヘマトクリットレベルの測定値である)

に従って補正することを可能にした。関係(1)は、対応する量の代わりに測定され補正された分析物濃度を利用してもよいことに留意されたい。ただし、単純な三数法と類似したそのような補正は、良好な結果をもたらさない。

【 0 0 1 3 】

今まで、分析物の量、したがってその濃度は、このように主に血漿で決定されており、この測定は信頼性があり、再現性があると考えられる唯一のものである。更に、そのような測定は、対象によって変化する可能性のあるヘマトクリットレベルと無関係であるという利点がある。

【 0 0 1 4 】

現在、血漿を得るには、事前の遠心分離工程が必要であり、したがって、時間及び特定の設備を要する。医療診断の場合、とりわけ、対象の命への脅威がある際に、時間が非常に重要なパラメータになる可能性があるだけでなく、更に、多くの分析を任されている検査室にたくさん遠心分離機があることが前提となる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 5 】

【特許文献 1】US2009/177406A1

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 6 】

本発明は、十分なレベルの正確さで分析物の量、したがって濃度を、直接全血試料で測定する方法であって、それにより、特に、事前の遠心分離工程を避けると同時にヘマトクリットレベルと無関係の測定を提供することができる、方法を提供することを目標とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 7 】

このために、本発明は、全血試料中の分析物の量を測定する方法であって、

- ・ 全血試料のヘマトクリットレベルを測定する工程と、
- ・ 直接全血試料中の分析物量を測定する工程と、
- ・ 関係

$$D_p = P_a(D_{ST}, D_H)$$

(式中、 D_p は補正された分析物量であり、 D_{ST} は測定された分析物量であり、 D_H は測定されたヘマトクリットレベルであり、 P_a は、不定値として、測定された分析物量 D_{ST} 及び測定されたヘマトクリットレベル D_H を有し、分析物に応じたその多項式係数を有する、次数が1以上の変数多項式である)

により補正された分析物量を算出する工程とを含む、方法を目標とする。

【 0 0 1 8 】

10

20

30

40

50

試料体積は、固定され、わかっているため、分析物量が測定されると、通常、例えば、直接測定器によって、試料中に存在する分析物の濃度に変換される。濃度値は、測定された濃度を、診断に特有の予め定義された基準濃度値と比較することによって、特に、インビトロ診断を実施するために使用されるため、本発明はまた、全血試料中の分析物濃度を測定する方法であって、

- ・ 全血試料のヘマトクリットレベルを測定する工程と、
- ・ 直接全血試料中の分析物量を測定し、それを試験試料の体積に基づいて濃度に変換する工程と、
- ・ 関係

$$C_P = P_a(C_{ST}, D_H)$$

(式中、 C_P は補正された分析物濃度であり、 C_{ST} は測定された量及び試料体積から算出された分析物濃度であり、 D_H は測定されたヘマトクリットレベルであり、 P_a は、不定値として、測定された量から得られた分析物濃度 C_{ST} 及び測定されたヘマトクリットレベル D_H を有し、分析物に応じたその多項式係数を有する、次数が1以上の変数多項式である)

により補正された分析物濃度を算出する工程とを含む、方法を目標とする。

【0019】

言い換えると、本発明者らは、特に、未知数、不定値又は変数として、ヘマトクリットレベル及び全血試料において測定された量/濃度を有する、次数が1以上の変数多項式によって、全血試料において直接測定された量/濃度に対する誤差を実質的に補正することができることを確認した。本発明による補正により、特に、血漿試料に対して従来法で直接行われる測定に対する相対的な測定誤差が、広い範囲の量/濃度にわたって+/-10%以内に含まれ、多くの場合含まれることが可能になる。したがって、血漿試料に対して直接測定を行うことによって得られる値と十分に近い値を有する補正された量/濃度は、例えば、インビトロ診断を行うために使用することができ、その結果、もはや事前の遠心分離工程を行う必要がない。

【0020】

ある実施形態によると、多項式 P_a は、測定された分析物量 D_{ST} に測定されたヘマトクリット値 D_H を掛けた積 $D_{ST} \times D_H$ 又は測定された分析物濃度 C_{ST} に測定されたヘマトクリット値 D_H を掛けた積 $C_{ST} \times D_H$ を含む。

【0021】

より特定すると、補正された分析物量は、関係

$$D_P = a_0 + a_1 \times D_{ST} + a_2 \times D_H + a_{12} \times D_{ST} \times D_H$$

(式中、 a_0 、 a_1 、 a_2 及び a_{12} は、分析物に応じた所定の係数である)

により算出される。

【0022】

言い換えると、一次項 $D_{ST} \times D_H$ である項 D_{ST} と項 D_H の間の相互作用を含む多項式は、特に、ELISA、ELFA及び免疫捕捉タイプのイムノアッセイ技術によく適合する。

【0023】

当然、係数 a_0 、 a_1 、 a_2 及び a_{12} も測定系(分析物及びヘマトクリット)により決まる。

【0024】

同様に、補正された分析物濃度は、関係

$$C_P = a'_0 + a_1 \times C_{ST} + a'_2 \times D_H + a_{12} \times C_{ST} \times D_H$$

(式中、 a'_0 、 a_1 、 a'_2 及び a_{12} は、分析物に応じた所定の係数である)

により算出される。

【0025】

言い換えると、一次項 $C_{ST} \times D_H$ である項 C_{ST} と項 D_H の間の相互作用を含む多項式は、特に、ELISA、ELFA及び免疫捕捉タイプのイムノアッセイ技術によく適合する。

【0026】

当然、係数 a'_0 、 a_1 、 a'_2 及び a_{12} も測定系(分析物及びヘマトクリット)により決まる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

特に、分析物が、45ng/mlから1,000ng/mlの濃度測定範囲においてD-ダイマーである場合、係数は、以下の関係によってもたらされる：

- ・ a'_0 は、 -29.311×0.9 から -29.311×1.1 の範囲であり、
- ・ a_1 は、 0.788×0.9 から 0.788×1.1 の範囲であり、
- ・ a'_2 は、 0.702×0.9 から 0.702×1.1 の範囲であり、且つ
- ・ a_{12} は、 0.018×0.9 から 0.018×1.1 の範囲である。

【 0 0 2 8 】

より特定すると、

- ・ $a'_0 = -29.311$ 、
- ・ $a_1 = 0.788$ 、
- ・ $a'_2 = 0.702$ 、且つ
- ・ $a_{12} = 0.018$

である。

【 0 0 2 9 】

特に、分析物が、 $0.01 \mu\text{g/l}$ から $1.6 \mu\text{g/l}$ の濃度測定範囲においてトロポニン、例えば、心筋トロポニンIである場合、係数は、以下の関係によってもたらされる：

- ・ a'_0 は、 -0.0052×0.9 から -0.0052×1.1 の範囲であり、
- ・ a_1 は、 0.9155×0.9 から 0.9155×1.1 の範囲であり、
- ・ a'_2 は、 0.0002×0.9 から 0.0002×1.1 の範囲であり、且つ
- ・ a_{12} は、 0.0072×0.9 から 0.0072×1.1 の範囲である。

【 0 0 3 0 】

より特定すると、

- ・ $a'_0 = -0.0052$ 、
- ・ $a_1 = 0.9155$ 、
- ・ $a'_2 = 0.0002$ 、且つ
- ・ $a_{12} = 0.0072$

である。

【 0 0 3 1 】

ある実施形態によると、分析物の量、したがって濃度の測定は、ELISAタイプ若しくはE LFAタイプ又は免疫捕捉タイプの技術によって行われる。言い換えると、使用される測定技術は、血漿に対して直接行われる測定技術に対して変更を行わない。したがって、最新式のイムノアッセイ計器を使用することができる。

【 0 0 3 2 】

本発明はまた、全血試料中の分析物の血漿中量を測定するためのデバイスをであって、

- ・ 前記全血試料を受ける手段と、
- ・ 全血試料中の総分析物量を測定する手段と、
- ・ 関係

$$D_p = P_a(D_{ST}, D_H)$$

(式中、 D_p は補正された分析物量であり、 D_{ST} は測定された分析物量であり、 D_H は測定されたヘマトクリットレベルであり、 P_a は、不定値として、測定された分析物量 D_{ST} 及び測定されたヘマトクリットレベル D_H を有し、分析物に応じたその多項式係数を有する、次数が1以上の変数多項式である)

により補正された分析物量を算出する手段とを含むことを特徴とする、デバイスを目標とする。

【 0 0 3 3 】

本発明はまた、全血試料中の分析物の血漿中濃度を測定するためのデバイスであって、

- ・ 前記全血試料を受ける手段と、
- ・ 全血試料中の総分析物量を測定する手段と、
- ・ 分析物量を濃度に変換する手段と、

10

20

30

40

50

- ・ 全血試料のヘマトクリットレベルを入力するか、又は測定する手段と、
- ・ 関係

$$C_P = P_a(C_{ST}, D_H)$$

(式中、 C_P は補正された分析物濃度であり、 C_{ST} は測定された量から得られた分析物濃度であり、 D_H は測定されたヘマトクリットレベルであり、 P_a は、不定値として、測定された分析物濃度 C_{ST} 及び測定されたヘマトクリットレベル D_H を有し、分析物に応じたその多項式係数を有する、次数が1以上の変数多項式である)

により補正された分析物濃度を算出する手段とを含む、デバイスを目標とする。

【0034】

10

本発明は、添付の図面と関連して例としてのみ提供される以下の説明を読めば更に良く理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】ELISA又はELFAタイプの最新式「サンドイッチ」分析物濃度測定法を示す略図である。

【図2】本発明による方法を示すフローチャートである。

【図3】D-ダイマーに適用される多項式補正モデルを決定し、検証するために使用される試料の濃度及びヘマトクリットレベルの均質性を示すグラフである。

【図4】血漿の測定されたD-ダイマー濃度に照らした、全血において測定された本発明による補正を行っていないD-ダイマー濃度を示すグラフである。

20

【図5】血漿において測定されたD-ダイマー濃度に照らした、検証セットの試料に関する本発明により及び最新技術の補正により得られた相対的な補正誤差のグラフである。

【図6】血漿において測定されたD-ダイマー濃度に照らした、検証セットの試料に関する本発明により補正されたD-ダイマー濃度のグラフである。

【図7】血漿において測定されたD-ダイマー濃度に照らした、最新技術により補正されたD-ダイマー濃度のグラフである。

【図8】決定及び検証セットの試料に関して、心筋トロポニンI(TnI)の定量化の状況で適用される多項式補正モデルを決定するために使用される試料の濃度及びヘマトクリットレベルの均質性を示すグラフである。

30

【図9】血漿試料において測定されたTnI濃度に照らした、全血試料において測定された本発明による補正を行っていないTnI濃度を示すグラフである。

【図10】血漿において測定されたTnI濃度に照らした、検証セットの試料に関する本発明により及び最新技術の補正により得られた相対的な補正誤差のグラフである。

【図11】血漿において測定されたTnI濃度に照らした、本発明により補正されたTnI濃度のグラフである。

【図12】血漿において測定されたTnI濃度に照らした、最新技術により補正されたTnI濃度のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0036】

40

図2のフローチャートを参照して、特定の分析物に適用される本発明による方法をここに示す。

【0037】

本方法は、工程10の全血試料における分析物量/濃度の測定値を補正する数学的モデルを決定する工程と、工程12の工程10において決定された数学的モデルを使用して、患者又は動物から採取された全血試料中の未知の補正された分析物量/濃度を導き出す工程とを含む。

【0038】

モデル10の決定は14において、同じ処理単位、例えば、同じ患者又は動物から一連の多様なヘマトクリットレベル及び多様な分析物割合の全血試料と血漿試料の組を作ることか

50

ら始まる。この試料は、数学的モデルを決定し、検証するために使用されることになる。これらの試料に使用されるヘマトクリットの変動は、血液を提供したヒト又は動物において観察された範囲より広く、好ましくは、対象に関して観察されたヘマトクリットの平均又はそれに近い値に中心を置くのが都合がよい。例えば、男性の正常なヘマトクリット値は、40から54%であり、平均が45%であり、女性の正常なヘマトクリット値は、37から47%であり、平均が42%であるため、数学的モデルを決定し、検証するために使用されるヘマトクリットレベルの範囲は、26%から68%の範囲である。健康な対象に特有の低い値と全血試料の体積に基づいて最大10%の過負荷によって調製された高い値の間を変動するよう全血中の分析物濃度が選択される。

【0039】

10

例えば、一連の全血体積が作られ、各体積は2つに分割され、第1のサブ体積(sub-volume)は全血試料を形成し、第2のサブ体積は、血漿試料を得るために遠心分離される。全血体積は、単一の対象から、異なる対象から採取された複数の全血の混合物から作り出されてもよく、これは、分析物濃度を調節するために分析物により過負荷の状態にされてもよく、及び/又はヘマトクリットレベルを調節するために血漿の一部が遠心分離によって除去されるか、若しくは遠心分離から得られた血漿が添加されて第1の体積から作り出されてもよい。

【0040】

その後、16における、試料の各組に対して全血試料中の分析物量又は濃度及びヘマトクリットレベルの測定並びに対応する血漿試料中の分析物量又は濃度の測定によって本方法が
20
続行する。その量は、例えば、ELISA、ELFA又は最新式の免疫捕捉タイプの技術によって測定される。それにより、一連の三つ組($D_{ST}(i)$ 、 $D_P(i)$ 、 $D_H(i)$)が得られ、それぞれが、全血中の分析物の量 $D_{ST}(i)$ 、血漿中の分析物の量 $D_P(i)$ 、及び全血中のヘマトクリットレベル $D_H(i)$ を含む。当然、これは、分析物量を分析物濃度に置き換えることによって容易に濃度測定に適用することができる。

【0041】

その後、特に、全血において測定された量 $D_{ST}(i)$ が血漿において測定された量 $D_P(i)$ より大きい、異常値を有する三つ組は除外されるのが都合がよい。ここで再び、これは、濃度測定に適用することができる。

【0042】

30

得られた一連の試料の組は、その後、等しい又は異なる数を含む2つのサブセットに分割される、第1のサブセットは数学的モデルを決定するために使用され、第2のサブセットは決定された数学的モデルを検証するために使用される。数学的モデルを決定するために使用される試料は、

【0043】

【数2】

$$(D_{ST}^{cal}(i), D_P^{cal}(i), D_H^{cal}(i))$$

【0044】

と表わされ、数学的モデルを検証するために使用される試料は、

40

【0045】

【数3】

$$(D_{ST}^{verif}(i), D_P^{verif}(i), D_H^{verif}(i))$$

【0046】

と表わされる。例えば、試料の3分の2の組は、数学的モデルを決定するために使用され、試料の3分の1の組はその検証のために使用される。

【0047】

それ自体が公知であるように、使用される測定技術は、含まれる分析物によって決まる

50

。これは特に、例えば、固体表面、特に、コーンの表面への固定によって、分析物を固定するために使用される特異的な結合パートナーに起因する。

【0048】

例えば、BioMerieux社のVIDAS(登録商標)自動装置等の1つ又は複数の免疫分析装置によって量及び濃度の測定が実施される。それ自体が知られるとおり、免疫分析装置は、それぞれが1つ又は複数の試験ストリップを受けることができる1つ又は複数の試験区画を含む。ストリップはそれぞれ複数のウェルを含み、1つのウェルは、分析対象の試料を受け、その他のウェルは、それぞれ測定の間で使用される試薬、特に希釈液、すすぎ溶液、複合物を含む溶液及び酵素基質を含む溶液を含む。この自動装置は、分析物に特異的な結合パートナーの層を含む表面を有するコーンの下でストリップを移動させるための機構を更に含む。コーンは、その後、各ウェルの上に配置され、そこにある異なる媒体を特定の順序でピペティングしながら、使用される測定技術に特有の吸込み、放出及びインキュベーション機構を実施する。この自動装置は、最後に、この技術に含まれる特性を測定するためのデバイスを含む。例えば、VIDAS(登録商標)自動装置は、酵素機能によって触媒される基質が蛍光を発する点で前に記載した直接ELISA技術とは異なるELFAタイプの技術を利用し、最後の洗浄工程が行われると最後のキュベットに含まれる溶液の蛍光を測定することができる蛍光光度計を含む。

10

【0049】

ヘマトクリットレベルは、適切な既知の任意の技術、例えば、いわゆる、本実施形態において使用されるミクロヘマトクリット技術、コールター技術、レーザー測定法又は伝導率測定法によって測定される。

20

【0050】

本方法の次の工程18において、決定の三つ組、例えば、

【0051】

【数4】

$$D_p = a_0 + a_1 \times D_{ST} + a_2 \times D_H + a_{12} \times D_{ST} \times D_H \quad (2)$$

【0052】

により計算が行われて、全血試料から直接測定された分析物量を補正するための数学的モデル、より特定すると、関係

30

$$D_p = a_0 + a_1 \times D_{ST} + a_2 \times D_H + a_{12} \times D_{ST} \times D_H \quad (2)$$

(式中、 D_p は補正された分析物量であり、 D_{ST} は全血試料において直接測定された分析物量であり、 D_H は全血試料のヘマトクリットレベルであり、 a_0 、 a_1 、 a_2 、及び a_{12} は、数学的モデルの算出された係数である)

によるモデルのパラメータを算出する。

【0053】

多項式係数計算アルゴリズムを適用する前に、関係(2)による多項式の変数 D_{ST} 及び D_H は-1から1の間で正規化されるのが都合がよい。特に、全血中の分析物量が最小値として

【0054】

【数5】

$$D_{ST}^{min}$$

40

【0055】

を有し、最大値として

【0056】

【数6】

$$D_{ST}^{max}$$

【0057】

を有する場合、変数 D_{ST} は、変数

50

【 0 0 5 8 】

【 数 7 】

$$X_{ST} = \frac{D_{ST} - c}{d}$$

【 0 0 5 9 】

(式中、

【 0 0 6 0 】

【 数 8 】

$$c = \frac{D_{ST}^{\max} + D_{ST}^{\min}}{2} \quad \text{及び} \quad d = \frac{D_{ST}^{\max} - D_{ST}^{\min}}{2}$$

10

【 0 0 6 1 】

である)

に変換される。同様に、ヘマトクリットレベルが最小値として

【 0 0 6 2 】

【 数 9 】

$$D_H^{\min}$$

20

【 0 0 6 3 】

を有し、最大値として

【 0 0 6 4 】

【 数 1 0 】

$$D_H^{\max}$$

【 0 0 6 5 】

を有する場合、変数 D_H は、変数

【 0 0 6 6 】

【 数 1 1 】

30

$$X_H = \frac{D_H - e}{f}$$

【 0 0 6 7 】

(式中、

【 0 0 6 8 】

【 数 1 2 】

$$e = \frac{D_H^{\max} + D_H^{\min}}{2} \quad \text{及び} \quad f = \frac{D_H^{\max} - D_H^{\min}}{2}$$

40

【 0 0 6 9 】

である)

に変換される。

【 0 0 7 0 】

関係(2)によるモデルは、その場合、関係

【 0 0 7 1 】

【数13】

$$D_p = a_0^n + a_1^n \times X_{ST} + a_2^n \times X_H + a_{12}^n \times X_{ST} \times X_H \quad (3)$$

【0072】

(式中、係数

【0073】

【数14】

$$a_0^n, a_1^n, a_2^n \text{ 及び } a_{12}^n$$

10

【0074】

は、最小二乗法に従って、費用関数

【0075】

【数15】

$$f(D_p^{cal}(i) - (a_0^n + a_1^n \times X_{ST}^{cal}(i) + a_2^n \times X_H^{cal}(i) + a_{12}^n \times X_{ST}^{cal}(i) \times X_H^{cal}(i)))$$

【0076】

を最小にすることによって決定される)

に従って書き直すことができる。係数 a_0 、 a_1 、 a_2 及び a_{12} は、係数

20

【0077】

【数16】

$$a_0^n, a_1^n, a_2^n \text{ 及び } a_{12}^n$$

【0078】

から容易に導き出すことができる。

【0079】

変数の変換は、計算アルゴリズムとは無関係であり、各変数を同じスケールで表わすことができ、それにより異なる係数

30

【0080】

【数17】

$$a_1^n, a_2^n \text{ 及び } a_{12}^n$$

【0081】

を比較することができる。

【0082】

ここで再び、前述のものは、分析物量を分析物濃度に置き換えることによって濃度測定に適用することができる。したがって、変形として、全血試料において測定された分析物量は、測定された量を全血試料の体積で割ることによって分析物濃度に変換され、その後、数学的濃度補正モデル、特に関係

40

$$C_p = a'_0 + a_1 \times C_{ST} + a'_2 \times D_H + a_{12} \times C_{ST} \times D_H \quad (2-2)$$

(式中、 C_p は補正された分析物濃度であり、 C_{ST} は測定された量及び試料体積から算出された分析物濃度であり、 a'_0 、 a_1 、 a'_2 及び a_{12} は、分析物に応じた所定の係数であり、これらの係数は、例えば、最小二乗法によって算出される)

によるモデルが算出される。分析物濃度は、量から導き出されるため、多項式において分析物濃度と関連づけられる係数、すなわち、係数 a_1 及び a_{12} は、量及び濃度で表わされる2つのモデルに対して同じであることに留意されたい。ただし、残りの係数、すなわち、 a'_0 及び a'_2 は異なる。

50

【 0 0 8 3 】

同様に、関係

【 0 0 8 4 】

【数 1 8 】

$$C_p = a_0^{n'} + a_1^{n'} \times Y_{ST} + a_2^{n'} \times X_H + a_{12}^{n'} \times Y_{ST} \times X_H \quad (3-2)$$

【 0 0 8 5 】

(式中、

【 0 0 8 6 】

【数 1 9 】

$$Y_{ST} = \frac{C_{ST} - g}{h}, \quad g = \frac{C_{ST}^{\max} + C_{ST}^{\min}}{2}, \quad h = \frac{C_{ST}^{\max} - C_{ST}^{\min}}{2}$$

【 0 0 8 7 】

であり、

【 0 0 8 8 】

【数 2 0 】

$$C_{ST}^{\min}$$

10

20

【 0 0 8 9 】

は、濃度 C_{ST} の最小値であり、

【 0 0 9 0 】

【数 2 1 】

$$C_{ST}^{\max}$$

【 0 0 9 1 】

は、濃度 C_{ST} の最大値であり、多項式係数は、関係(2-2)の多項式係数から容易に導き出すことができる係数である)

30

に従って数学的モデルを算出することによって、関係(3)の正規化と類似の関係(2-2)の多項式の変数の正規化を適用することができる。

【 0 0 9 2 】

その後、本方法は、20において、量モデルに関する一連の検証の三つ組、例えば、

【 0 0 9 3 】

【数 2 2 】

$$(D_{ST}^{verif}(t), D_p^{verif}(t), D_H^{verif}(t))$$

【 0 0 9 4 】

を使用することによって決定したモデルの検証を続行する。

40

【 0 0 9 5 】

より特定すると、決定されたモデルは、以下の基準の少なくとも1つに基づいて有利にも検証される：

- ・ 数学的モデル、すなわち

【 0 0 9 6 】

【数 2 3 】

$$D_p^{cor}(t) = a_0 + a_1 \times D_{ST}^{verif}(t) + a_2 \times D_H^{verif}(t) + a_{12} \times D_{ST}^{verif}(t) \times D_H^{verif}(t),$$

【 0 0 9 7 】

50

によって補正された量

【 0 0 9 8 】

【数 2 4】

$$D_p^{cor}(i)$$

【 0 0 9 9 】

と、血漿において測定された量

【 0 1 0 0 】

【数 2 5】

$$D_p^{verif}$$

10

【 0 1 0 1 】

の間の相対誤差

【 0 1 0 2 】

【数 2 6】

$$\frac{D_p^{cor}(i) - D_p^{verif}(i)}{D_p^{verif}(i)}$$

20

【 0 1 0 3 】

より特定すると、それは、相対誤差の中心が0%に置かれているかどうか、更に、-10%から+10%の範囲であるかどうかを検証される；

・ 例えば、いわゆる「Passing and Bablok」線形回帰

【 0 1 0 4 】

【数 2 7】

$$D_p^{cor}(i) = \alpha + \beta \times D_p^{verif}(i)$$

【 0 1 0 5 】

30

により得られる線形方程式のパラメータ；及び

・ 上記の「Passing and Bablok」方程式を使用することによって算出された血漿中の異なる分析物量に関する偏り。

【 0 1 0 6 】

ここで再び、前述のものは、分析物量を分析物濃度に置き換えることによって濃度測定に容易に適用することができる。

【 0 1 0 7 】

決定されたモデルが実証されると、12において全血試料で直接行われる分析物量/濃度の測定へのこのモデルの活用により本方法が続行する。

【 0 1 0 8 】

40

例えば、このモデルは、販売されている免疫分析装置のデータ処理ユニットに搭載され、これは、ヘマトクリットレベルの値を受けるか又は算出することができるよう更に変更されてもよい。別の方法で、このモデルは、免疫分析装置とは無関係の処理ユニット、例えば、パーソナルコンピュータにおいて実行される。この変形では、操作者は、免疫分析装置によって全血試料において測定された分析物量/濃度値及びこの試料に対して測定されたヘマトクリットレベルの値をユニットに入力し、それと引き換えに補正された分析物量/濃度を得る。

【 0 1 0 9 】

したがって、分析物の量、とりわけ濃度が知りたい、体積がわかっている全血試料に対して、活用の工程12が22において、試料のヘマトクリットレベル D_H の測定で始まり、24に

50

において、数学的モデルを決定し、検証するために使用したのと同じ免疫分析装置モデルによって行われる、同じ測定技術による直接全血試料における分析物量/濃度の測定が続く。

【0110】

補正された分析物量 D_p は、その後、26において、モデル10の決定で算出された係数 a_0 、 a_1 、 a_2 及び a_{12} を用いて関係(2)より又は同等にモデルの係数

【0111】

【数28】

a_0^n, a_1^n, a_2^n 及び a_{12}^n

10

【0112】

を用いて関係(3)により算出される。補正された分析物濃度は、関係(2-2)又は(3-2)により同様に算出される。

【0113】

28において、濃度が算出され、その後、出力が、例えば、画面に表示される且つ/又はコンピュータメモリに記録される。任意に、補正量も出力されてもよい。

【0114】

測定された量又は濃度が数学的モデルによって補正される本発明による方法について記載してきた。

20

【0115】

先に記載したとおり、測定技術は、分析される試料に存在する分析物量に応じた値を有する特性、例えば、光学的、電気的、化学的、pH又は酵素と関連づけられる特性の測定に基づく。したがって、免疫分析器は、そのような特性を測定し、この測定に対応するシグナルを出力するデバイスを含む。最新技術によると、そのシグナルは、その後、シグナルを量及び/又は濃度値に変換する所定の数学的モデルによって処理される。

【0116】

変形として、本方法は、変換前に実際のシグナルに適用される。特に、全血試料において測定されたシグナルは、関係

$$S_p = a_0 + a_1 \times S_{ST} + a_2 \times D_H + a_{12} \times S_{ST} \times D_H \quad (4)$$

30

(式中、 S_p は補正されたシグナルであり、 S_{ST} は全血試料に対する測定から得られたシグナルである)

により補正される。シグナル補正に適用される本方法は、先に記載した方法と類似しているが、ただし、当業者の能力の範囲内において軽微な変更が行われる。関係(3)と類似の正規化された変数を含む数学的モデルの算出も可能である。

【0117】

本発明の適用の2つの例、それぞれ、D-ダイマー濃度の測定への適用及び心筋トロポニンI濃度の測定への適用について、ここに記載する。

【0118】

D-ダイマー濃度の測定

40

D-ダイマーは、不均一なフィブリン生成物であり、すべてが、フィブリンを架橋する血液凝固に参与する酵素、すなわち第「XIIIa」因子により共有結合した2つの連続的なフィブリンモノマーによって形成された抗原決定基D-Dを有する。D-ダイマーのアッセイは、主に、静脈血栓塞栓性疾患、特に、深部静脈血栓症及び肺塞栓症の除外診断、抗凝固剤による治療を止めた後のそのような疾患の再発リスクの評価並びに播種性血管内凝固の診断に必要とされる。

【0119】

D-ダイマーと関連づけられる数学的モデルを決定し、検証するために、抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて186名の健康な対象から血液が採取された。より特定すると、血液は、減圧下の4.5mLのチューブに回収され、これは、0.129Mのクエン酸三ナトリウ

50

ムを含むものとした。

【0120】

さまざまなヘマトクリットレベルの全血試料を得るために、回収した試料は、軽く遠心分離した後のそれ自体の血漿により希釈されて、26%から61%の範囲にわたるヘマトクリットレベルを得た。ヘマトクリットレベルは、マイクロヘマトクリット技術によって測定される。最新技術においてそれ自体が知られているとおり、マイクロヘマトクリットは、最初に毛細管の10,000rpmにおける7分間の遠心分離によって得られ、その後、ヘマトクリットレベルの値がチャートによって導き出される。

【0121】

さまざまなD-ダイマー濃度の全血試料及び血漿試料を得るために、ヘマトクリットレベルを変える前又は変えた後に、全血試料はD-ダイマーにより過負荷の状態にされた。試料を過負荷の状態にするために、アッセイされるべき高いD-ダイマー濃度の、bioMerieux社内部の血清バンク(マルシーレトワール、フランス)の血漿が使用されて、全血において45 ng/mL ~ 1,000ng/mLの範囲のD-ダイマー濃度の分布を得た。過負荷により、全血試料は過負荷の状態、特に、300ng/mL、500ng/mL及び1,000ng/mLにされ、これは、もとの血液基質の変更を避けるために全血試料の体積の10%を超えない。すなわち、1,000ng/mLを超えない。図3に示されるとおり、試料分布は、全血において測定された量から得られたD-ダイマー濃度範囲及びヘマトクリットレベルの範囲において均質であり、図3は、モデル決定の三つ組(ドット)及びモデル検証の三つ組(星)の(全血において測定された量から得た濃度、ヘマトクリットレベル)組を示す。血漿試料は、各全血試料の一部を3,000rpmで10分

10

20

【0122】

数量的な例として、試料の調製後、全血中のD-ダイマー濃度は、46.78ng/mLから982.81 ng/mLの範囲に分布しており、ヘマトクリットレベルは、26%から61%の範囲に分布しており、血漿中のD-ダイマー濃度は、96.86ng/mLから1,419.58ng/mLの範囲に分布している。

【0123】

全血試料及び血漿試料中のD-ダイマー濃度の測定は、特に、bioMerieux SA社の参照番号30 455と指定された「VIDAS D-dimere Exclusion II」キットを用いてVIDAS(登録商標)自動装置によって行われるELFAタイプの技術によるヒト血漿中のフィブリン分解生成物(PDF)の酵素イムノアッセイを含む。そのような測定は、したがって、最終的な蛍光検出(ELFA)を含む2工程のサンドイッチ型酵素イムノアッセイ法に関連する。第1の工程では、試料は、複数回、採取され、吸引され及び放出され、その結果、抗原が、コーンに固定された抗FbDP抗体と結合することができる(FbDPは「フィブリノーゲン分解生成物」を表わす)。第2の工程では、ALP(アルカリホスファターゼ)で標識されたモノクローナル抗FbDP抗体は、既にコーンに固定されている抗原と結合してサンドイッチを形成する。洗浄工程は、固定されていないか、又は過剰な化合物を除去する。その後、発色工程が行われる。4MUP基質(4-メチル-ウンベリフェリル-ホスファート)が、吸引され、その後、コーンに放出され、ALPは、基質の加水分解を触媒して蛍光4MU(4-メチル-ウンベリフェロン)にする。発せられた蛍光が450nmにおいて測定される。蛍光シグナルの値は試料中の抗原量に比例する。

30

40

【0124】

図4は、それぞれの血漿試料において測定された量から得られたD-ダイマー濃度 $C_p(i)$ に照らした、全血試料において測定された量から得られたD-ダイマー濃度 $C_{ST}(i)$ を示す。2つの量の間の「Passing and Bablok」型線形回帰 $C_{ST}(i) = a + b \times C_p(i)$ は、特に $a = -8.80$ 及び $b = 0.69$ をもたらす。

【0125】

全血において測定された濃度が血漿における濃度より高い三つ組は除外した。

【0126】

103の三つ組

【0127】

50

【数 2 9】

$$(C_{ST}^{cal}(i), C_P^{cal}(i), C_H^{cal}(i))$$

【0 1 2 8】

は、数学的モデルを決定するために使用された。

【0 1 2 9】

したがって、以下の係数が、得られる：

【0 1 3 0】

【数 3 0】

$$a'_0 = 806.279;$$

【0 1 3 1】

【数 3 1】

$$a_1^n = 803.998$$

【0 1 3 2】

(標準偏差は11.917に等しい)；

【0 1 3 3】

【数 3 2】

$$a'_2 = 196.295$$

【0 1 3 4】

(標準偏差は12.389に等しい)；及び

【0 1 3 5】

【数 3 3】

$$a_{12}^n = 182.254$$

【0 1 3 6】

(標準偏差は25.909に等しい)

又は、同等に、正規化されずに、

【0 1 3 7】

【数 3 4】

$$a'_0 = -29.311;$$

【0 1 3 8】

・ $a_1 = 0.788$ ；

【0 1 3 9】

【数 3 5】

$$a'_2 = 0.702;$$

【0 1 4 0】

及び

・ $a_{12} = 0.018$ 。

【0 1 4 1】

50の検証の三つ組

【0 1 4 2】

10

20

30

40

【数36】

$$(C_{ST}^{verif}(i), C_P^{verif}(i), C_H^{verif}(i))$$

【0143】

が数学的モデルを検証するために更に使用された。

【0144】

図5は、血漿において測定された量から得られたD-ダイマー濃度に照らした、菱形で表わされている、検証試料に適用された関係(2-2)又は(3-2)による補正

【0145】

10

【数37】

$$C_P^{cor}(i)$$

【0146】

及び四角で表わされている、検証試料に適用された関係(1)により行われた最新技術の補正

【0147】

【数38】

$$C_P^{cor}(i)$$

20

【0148】

の両方に関する相対誤差

【0149】

【数39】

$$\frac{C_P^{cor}(i) - C_P^{verif}(i)}{C_P^{verif}(i)}$$

【0150】

を示す。確認できるとおり、最新技術の補正とは反対に、本発明によって得られる相対誤差は、ゼロに中心が置かれており、主に-10%から10%の範囲にある。

30

【0151】

図6及び図7は、血漿において測定された濃度に照らした、それぞれ関係(2-2)又は(3-2)の補正及び関係(1)の補正により補正され、検証試料に適用された補正濃度を示す。補正のそれぞれに対して「Passing and Bablok」型の線形回帰によって得られる線が更に算出され、グラフ化されている。最新技術の補正に対応する線は、1.18と等しい傾きを有する。本発明に対応する線は、一致に近く1.03と等しい傾きを有する。

【0152】

最後に、全血中の3つのD-ダイマー濃度に関する偏り、すなわち、250ng/mL、500ng/mL及び1,000ng/mL、が算出され、本発明による補正についてはそれぞれ-3.4%、-0.4%及び+1.1%と等しく、最新技術の補正についてはそれぞれ+6.7%、+12.5%及び+15.4%と等しい。

40

【0153】

したがって、本発明に従って補正された濃度が、血漿で直接行われた測定で得られた濃度と類似していることを確認することができる。

【0154】

試料において測定されたシグナルに対して補正が行われる場合も、同様の結果を確認することができる。

【0155】

心筋トロポニンI濃度の測定

トロポニン(Tn)は、横紋筋のタンパク質である。横紋筋は、ミオシンでできている太い

50

フィラメントと、アクチン、トロポミオシン及び/又はトロポニン複合体でできている細いフィラメントから形成される。この複合体は、それ自体が3つのサブユニット、すなわち、いわゆる「C」、「I」及び「T」トロポニンから形成されている。これらのトロポニンのそれぞれは、骨格及び心臓のアイソフォームがある。心筋トロポニンは、心筋壊死の検出のための選択マーカーであり、そのアッセイは、心筋梗塞を診断することを可能にする。心筋トロポニンのアッセイは、血栓溶解剤治療の経過観察のため、及び心筋壊死の大きさを予測するため並びに急性冠症候群の診断にも使用される。TnIと表わされるトロポニン「I」のアッセイはまた、その他の病状、特に、腎不全、甲状腺機能低下症、膠原病、ミオパチー又は更に肺塞栓症との関連で心臓機能障害を目立たせることも可能にする。

【0156】

TnIと関連づけられる数学的モデルを決定し、検証するために、抗凝固剤としてリチウムヘパリナートを用いて186名の健康な対象から血液が採取された。より特定すると、血液は、4mLのチューブに回収され、これは、17UI/mLのリチウムヘパリナートを含むものとした。

【0157】

複数のヘマトクリットレベル及びTnI濃度の全血試料を得ること並びに全血試料から血漿試料を得ることは、D-ダイマーの量に関連して記載されたものと同様である。

【0158】

全血試料及び血漿試料中のTnI濃度の測定は、特に、bioMerieux社の参照番号30 448と指定された「VIDAS Troponine I Ultra」キットを用いてVIDAS(登録商標)自動装置によって行われるELFAタイプの技術によるヒト血漿中のトロポニン酵素イムノアッセイを含む。単一の工程では、試料は、採取され、ALPで標識された抗心臓TnI抗体(anti-TnI cardiac antibody)である複合体を含むウェルに移される。試料/複合物混合物は、複数回、コーンに吸引され、その後、コーンによって放出される。これは、TnIが、一方では、複合物と結合してサンドイッチを形成することを可能にする。洗浄工程は、固定されていないか、又は過剰な化合物を除去する。ALPは、VIDAS(登録商標)ストリップの最後のウェルに含まれる基質の加水分解を触媒して蛍光4MUにする。発せられた蛍光が450nmにおいて測定される。蛍光シグナルの値は、試料中の抗原濃度に比例する。試験の終わりに、2つの発色工程に対応する2つの検量線から結果が算出される。閾値シグナルが各試料に対して使用されるべき検量線の選択を成し遂げる。

【0159】

全血試料中のTnI濃度は、0.01 µg/Lから1.4 µg/Lまで変動し、ヘマトクリットレベルは、22%から73%まで変動し、これにより、血漿中のTnI濃度は、0.01 µg/lから1.6 µg/lまで変動する。

【0160】

図8に示されるとおり、試料分布は、全血において測定されたTnI濃度範囲及びヘマトクリットレベルの範囲において均質であり、図8は、モデル決定の三つ組(ドット)及びモデル検証の三つ組(星)の(全血において測定された濃度、ヘマトクリットレベル)組を示す。

【0161】

図9は、それぞれの血漿試料において測定されたTnI濃度 $C_p(i)$ に照らした、全血試料において測定された量から得られたTnI濃度 $C_{ST}(i)$ を示す。2つの濃度間の「Passing and Ba blok」型線形回帰

【0162】

【数40】

$$\alpha = -0.01$$

【0163】

は、特に $\alpha = -0.01$ 及び $\beta = 0.84$ をもたらす。

【0164】

10

20

30

40

50

合計187の試料が調製され、交換アルゴリズム、例えば、Fedorovアルゴリズムが、例えば、LPRAI Sarl社のソフトウェアNEMRODW(著作権)によって実行される。Fedorovアルゴリズムは反復アルゴリズムであり、これは、数学的モデルを決定するためにN個の最良試料、例えば、数学的モデルのパラメータを算出するためにすべての試料のうちの20個の最良試料を選択することができるという利点を有する。

【 0 1 6 5 】

以下の係数は、20個の選択された試料によって得られる：

【 0 1 6 6 】

【数 4 1】

$$a'_0 = 0.8982;$$

10

【 0 1 6 7 】

【数 4 2】

$$a_1^n = 0.86751;$$

【 0 1 6 8 】

【数 4 3】

$$a'_2 = 0.1334;$$

【 0 1 6 9 】

及び

【 0 1 7 0 】

【数 4 4】

$$a_{12}^n = 0.12413.$$

20

【 0 1 7 1 】

又は同等に、

【 0 1 7 2 】

【数 4 5】

$$a'_0 = -0.0052 ;$$

30

【 0 1 7 3 】

・ $a_1 = 0.9155;$

【 0 1 7 4 】

【数 4 6】

$$a'_2 = 0.0002;$$

【 0 1 7 5 】

及び

・ $a_{12} = 0.0072.$

40

【 0 1 7 6 】

167の検証の三つ組

【 0 1 7 7 】

【数 4 7】

$$(C_{ST}^{verif}(t), C_P^{verif}(t), C_H^{verif}(t))$$

【 0 1 7 8 】

が数学的モデルを検証するために更に使用された。

【 0 1 7 9 】

図10は、血漿において測定された量から得られたTnI濃度に照らした、菱形で表わされ

50

ている、検証試料に適用された関係(2-2)又は(3-2)による補正

【0180】

【数48】

$$C_P^{cor}(i)$$

【0181】

及び四角で表わされている、検証試料に適用された関係(1)により行われた最新技術の補正

【0182】

【数49】

$$C_P^{cor}(i)$$

【0183】

の両方に関する相対誤差

【0184】

【数50】

$$\frac{C_P^{cor}(i) - C_P^{verif}(i)}{C_P^{verif}(i)}$$

【0185】

を示す。確認できるとおり、最新技術の補正とは反対に、相対誤差は、ゼロに中心が置かれており、主に-10%から10%の範囲にある。TnI濃度が検出限界に近い場合、試料範囲の-/+10%の外にいくつかの結果が確認できる。

【0186】

図11及び図12は、血漿において測定された濃度に照らした、それぞれ関係(2-2)又は(3-2)の補正及び関係(1)の補正により補正され、検証試料に適用された補正されたTnI濃度を示す。補正のそれぞれに対して「Passing and Bablok」型の線形回帰によって得られる線が更に算出され、グラフ化されている。最新技術の補正に対応する線は、1.48と等しい傾きを有する。本発明に対応する線は、一致に近く、1.02と等しい傾きを有する。

【0187】

最後に、全血中の3つのTnI濃度に関する偏り、すなわち、0.1 µg/L、0.5 µg/L及び1 µg/Lが算出され、本発明による補正についてはそれぞれ3.1%、2.0%及び+1.9%と等しく、最新技術の補正についてはそれぞれ+43.3%、+46.7%及び+47.1%と等しい。

【0188】

D-ダイマー対して得られたのと同じ結果を確認することもできた。すなわち、補正濃度は、血漿で直接行われた測定で得られる濃度と類似している。

【0189】

試料において測定されたシグナルに対して補正が行われる場合も、同様の結果を確認することができる。

【0190】

関係(2-2)又は関係(3-2)による一次多項式が使用される実施形態について記載してきた。ヘマトクリットレベルの2乗及び/又は全血において測定された分析物量/濃度の2乗を含む二次多項式が使用されてもよい。同様に、更に高い次数の多項式が使用されてもよい。

【0191】

特に、使用される多項式を識別するために以下の手順が使用されてもよい:

- a) 多項式の次数を1に定める工程;
- b) 例えば、先に記載したとおり最小二乗法によって多項式のパラメータを算出する工程;
- c) 多項式の予測誤差が申し分ないと考えられたら、その多項式を選択する工程(例えば、予測誤差が算出され、それが閾値、有利には10%よりも小さければ、この多項式が選択される);及び

10

20

30

40

50

d) 有利にも一連の検証データに対して算出される予測誤差が申し分ないと考えられない場合は、1だけ多項式の次数を高くし、予測誤差が申し分ないと考えられるまで工程b)、c)及びd)を繰り返す工程。変形として、こうした工程は、次数が10以下、好ましくは、5以下である限り繰り返される。

【0192】

当然、その他の計算方法及び/又は多項式の最終的な選択が使用されてもよい。例えば、次数は、最新技術においてそれ自体が知られているとおり、非線形回帰によって算出されてもよい。同様に、複数の多項式が算出された場合に最終的な多項式を選択するために、ベイジアン型規準、例えば、BIC(「ベイジアン情報量規準」)が使用されてもよい。

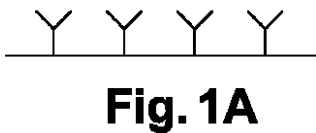
【0193】

量/濃度の測定値が変数の変換なく数学的モデルに使用される実施形態について、記載してきた。変形として、測定空間の変換、例えば、測定された量/濃度範囲が大幅である場合に対数変換が行われてもよい。「測定値」という用語は、したがって、本発明の意味では、直接又は変換された測定値を意味する。

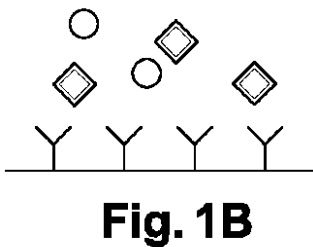
【0194】

同様に、大幅な量/濃度範囲に対して算出された多項式係数を記載してきた。変形として、量/濃度の範囲は、複数の区間に分割されてもよく、これら区間のそれぞれに対して数学的モデルが決定されてもよい。したがって、モデルの係数は、それが算出される量/濃度の区間により決まる場合もある。

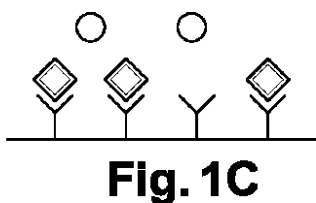
【図1A】



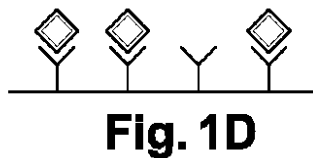
【図1B】



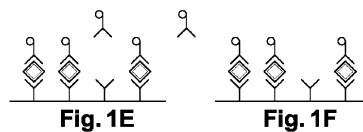
【図1C】



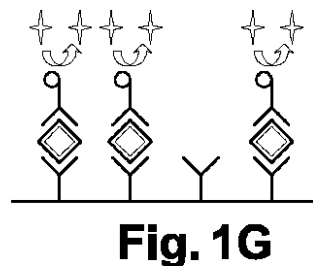
【図1D】



【図1E - 1F】



【図1G】



【 図 2 】

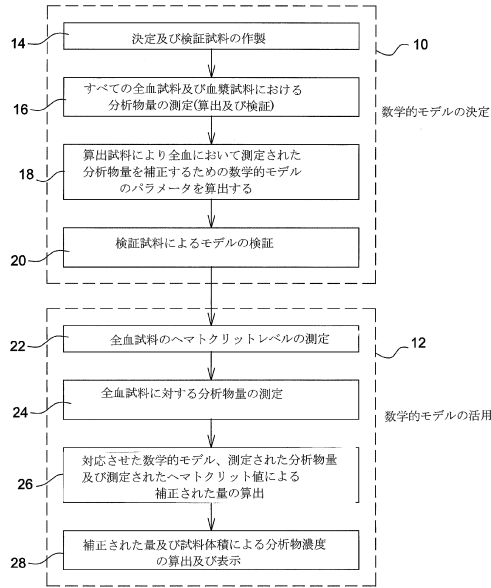


Fig. 2

【 図 3 】

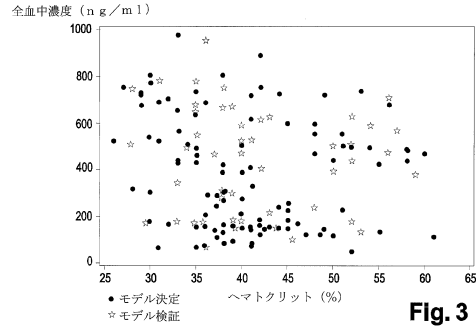


Fig. 3

【 図 4 】

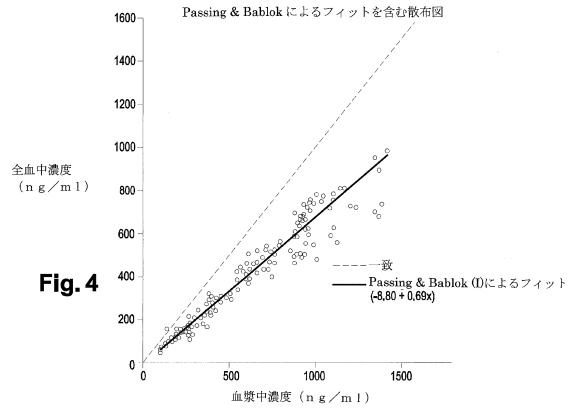


Fig. 4

【 図 5 】

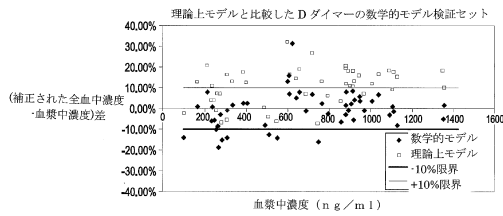


Fig. 5

【 図 7 】

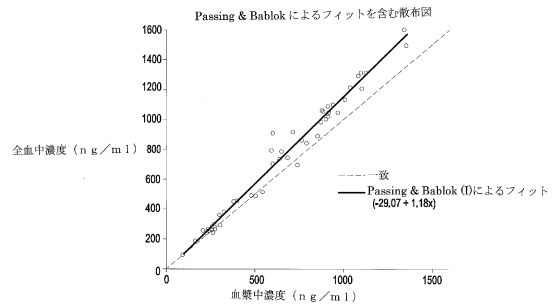


Fig. 7

【 図 6 】

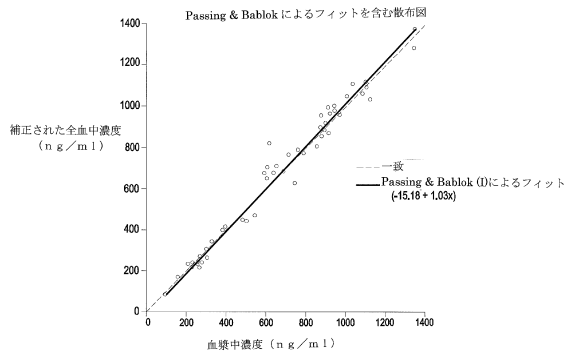


Fig. 6

【 図 8 】

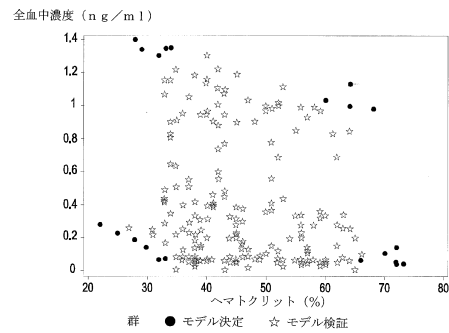
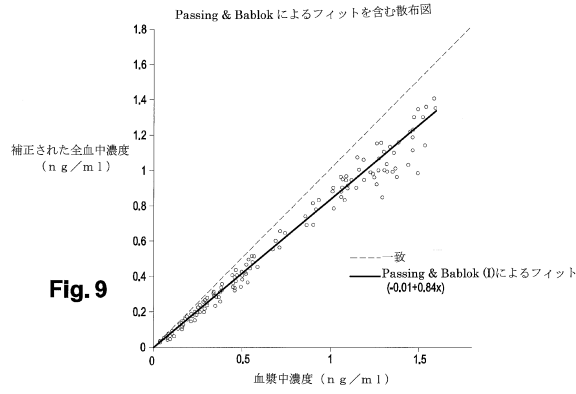
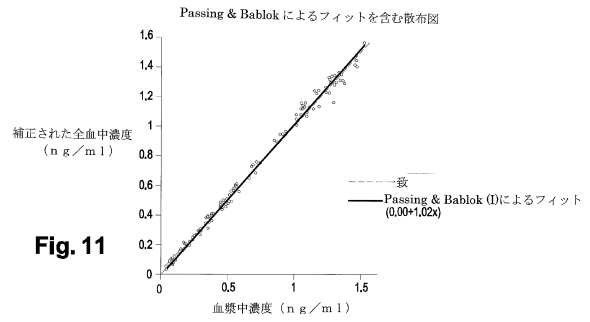


Fig. 8

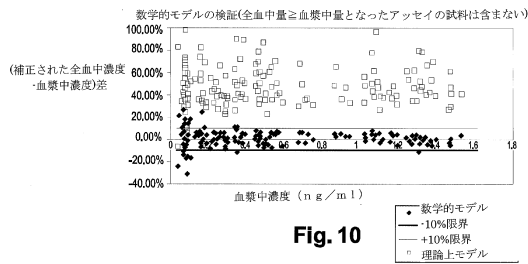
【 図 9 】



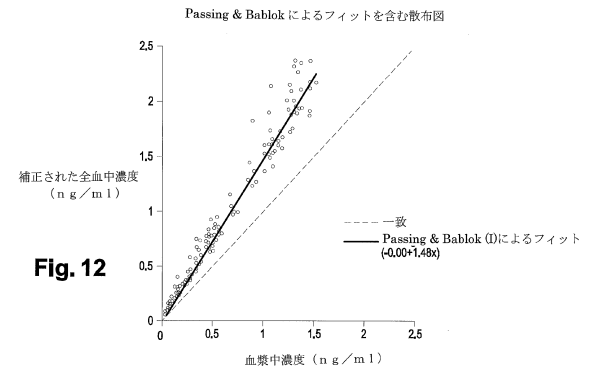
【 図 1 1 】



【 図 1 0 】



【 図 1 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/56 (2006.01) C 1 2 Q 1/56

(72)発明者 ローレ・マリエ
フランス・F - 6 9 0 0 9・リヨン・リュ・ピエール・オードリ・7 9

(72)発明者 オーレリー・トレ
フランス・F - 4 4 0 0 0・ナント・リュ・デュゴミエ・7・スクエア・ニュートン

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0177406 (US, A1)

特開2009-168815 (JP, A)

特開2002-071685 (JP, A)

特開2004-125775 (JP, A)

特開2009-243955 (JP, A)

Y Lamers et.al. , Red blood cell folate concentrations increase more after supplement ation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate than with folic acid in women of childbearing age. , Am J Clin Nutr , 2006年 7月, Vol.84, No.1, Page.156-161

JA Straseski et.al. , Investigating interferences of a whole-blood point-of-care creatinine analyzer: comparison to plasma enzymatic and definitive creatinine methods in an acute-care setting. , Clinical Chemistry , 2011年, Vol.57, No.11, Page.1566-1573

R.J.Flanagan et.al. , Comparability of whole-blood and plasma clozapine and norclozapine concentrations. , Br J Clin Pharmacol , 2003年 7月, Vol.56, No.1, Page.135-138

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	直接测量全血样品中分析物血浆浓度的方法		
公开(公告)号	JP6482532B2	公开(公告)日	2019-03-13
申请号	JP2016513426	申请日	2014-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物梅里埃		
当前申请(专利权)人(译)	生物梅里埃		
[标]发明人	シルヴィエシュッシュ ローレマリエ オーレリートレ		
发明人	シルヴィエ・シュッシュ ローレ・マリエ オーレリートレ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/49 G01N33/50 C12Q1/02 C12Q1/56		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/6887 G01N2333/47 G01N2333/4706 G01N2333/75 G16B40/00		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.515.L G01N33/49.B G01N33/50.Z C12Q1/02 C12Q1/56		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	2013054276 2013-05-13 FR		
其他公开文献	JP2016519316A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种测量全血样品中分析物含量的方法，包括以下步骤：测量全血样品的血细胞比容水平；直接测量全血样品中分析物的含量； $P = P_a (D_{ST}, D_H)$ （其中 $D_{P_{sub}}$ 是分析物的校正量， D 是分析物的测量量， D 是测量的血细胞比容水平 P_a 是一个或多个阶数，分析物 D_{ST} 的测量量 D 和测量的血细胞比容水平 D_H 。计算由不确定值校正的分析物的量和具有根据分析物的多项式系数的可变量多项式。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6482532号 (P6482532)
(45) 発行日 平成31年3月13日(2019. 3. 13)	(24) 登録日 平成31年2月22日(2019. 2. 22)	
(51) Int. Cl.	F 1	
G 0 1 N 33/53 (2006. 01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/543 (2006. 01)	G 0 1 N 33/543	5 1 5 L
G 0 1 N 33/49 (2006. 01)	G 0 1 N 33/49	B
G 0 1 N 33/50 (2006. 01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02	
請求項の数 13 (全 25 頁)		最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2016-513426(P2016-513426)	(73) 特許権者 304043936	
(86) (22) 出願日 平成26年5月12日(2014. 5. 12)	バイオメリュエ	
(65) 公表番号 特表2016-519316(P2016-519316A)	B I O M E R I E U X	
(43) 公表日 平成28年6月30日(2016. 6. 30)	フランス国 F-69280 マーシー	
(86) 国際出願番号 PCT/FR2014/051086	レトワール	
(87) 国際公開番号 W02014/184476	(74) 代理人 100108453	
(87) 国際公開日 平成26年11月20日(2014. 11. 20)	弁理士 村山 靖彦	
審査請求日 平成29年5月12日(2017. 5. 12)	(74) 代理人 100110364	
(31) 優先権主張番号 1354276	弁理士 実広 信哉	
(32) 優先日 平成25年5月13日(2013. 5. 13)	(74) 代理人 100133400	
(33) 優先権主張国 フランス(FR)	弁理士 阿部 達彦	
	(72) 発明者	
	シルヴィエ・シュッシュ	
	フランス・F-69890・ラ・トゥール	
	・ドゥ・サルヴァニー・リュ・デュ・ジャ	
	ックメ・32	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 分析物の血漿中濃度を全血試料で直接測定するための方法		