

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6426611号  
(P6426611)

(45) 発行日 平成30年11月21日 (2018.11.21)

(24) 登録日 平成30年11月2日 (2018.11.2)

|                         |                |
|-------------------------|----------------|
| (51) Int. Cl.           | F I            |
| GO 1 N 33/579 (2006.01) | GO 1 N 33/579  |
| GO 1 N 21/01 (2006.01)  | GO 1 N 21/01 Z |

請求項の数 20 (全 18 頁)

|               |                               |           |                     |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2015-535861 (P2015-535861)  | (73) 特許権者 | 390041542           |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年10月7日 (2013.10.7)        |           | ゼネラル・エレクトリック・カンパニー  |
| (65) 公表番号     | 特表2015-531489 (P2015-531489A) |           | アメリカ合衆国、ニューヨーク州 123 |
| (43) 公表日      | 平成27年11月2日 (2015.11.2)        |           | 45、スケネクタデイ、リバーロード、1 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2013/063645             |           | 番                   |
| (87) 国際公開番号   | W02014/058758                 | (74) 代理人  | 110001173           |
| (87) 国際公開日    | 平成26年4月17日 (2014.4.17)        |           | 特許業務法人川口国際特許事務所     |
| 審査請求日         | 平成28年9月23日 (2016.9.23)        | (74) 代理人  | 100137545           |
| (31) 優先権主張番号  | 61/710,908                    |           | 弁理士 荒川 聡志           |
| (32) 優先日      | 平成24年10月8日 (2012.10.8)        | (74) 代理人  | 100105588           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | 弁理士 小倉 博            |
| (31) 優先権主張番号  | 61/710,898                    | (74) 代理人  | 100129779           |
| (32) 優先日      | 平成24年10月8日 (2012.10.8)        |           | 弁理士 黒川 俊久           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       | (74) 代理人  | 100113974           |
|               |                               |           | 弁理士 田中 拓人           |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低レベルの L A L 反応性物質を検出するための高感度かつ迅速な方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水性試料中の L A L 反応性物質の濃度を測定する方法であって、  
 ( a ) L A L 反応性物質を含む水性試料を検出試薬と接触させて、調製試料を形成するステップと、  
 ( b ) 調製試料の物理特性を測定して、調製試料に特徴的な 1 以上の試料測定値を得るステップであって、物理特性が光学特性であるステップと、  
 ( c ) 曲線あてはめを使用して、試料測定値及び既知の濃度の L A L 反応性物質を含む溶液の物理特性の 1 以上の基準測定値で明らかになる相関に基づいて、水性試料が将来の指定された時間に有する L A L 反応性物質の濃度を予測し、履歴データ及び / 又は基準測定値を用いて、試料測定値の品質を検証するステップとを含む方法。

【請求項 2】

物理特性が透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度からなる群から選択される光学特性である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

物理特性が試料測定値の反応速度論及び品質からなる群から選択される非線形特性であり、試料測定値の品質が非線形特性を用いて検証される、請求項 1 記載の方法。

10

20

## 【請求項 4】

1 以上の反応がエンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 3 記載の方法。

## 【請求項 5】

反応のカスケード開始の 1 以上の見かけの時間遅延を曲線あてはめステップにおける変数として含めるステップをさらに含む、請求項 4 記載の方法。

## 【請求項 6】

水性試料中の L A L 反応性物質の濃度を測定する方法であって、

( a ) L A L 反応性物質を含む水性試料を検出試薬と接触させて、調製試料を形成するステップと、

( b ) 調製試料の物理特性を測定して、調製試料に特徴的な 2 以上の試料測定値を得るステップであって、物理特性が光学特性であるステップと、

( c ) 試料測定値及び既知の濃度の L A L 反応性物質を含む溶液の物理特性の 3 以上の基準測定値の非線形挙動で明らかになる相関に基づいて、水性試料が将来の指定された時間に有する L A L 反応性物質の濃度を予測するステップとを含む方法。

## 【請求項 7】

物理特性が透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度からなる群から選択される光学特性である、請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 8】

物理特性が非線形特性であり、非線形特性が検出試薬と L A L 反応性物質との間の反応の既知の反応速度論に基づく、請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 9】

1 以上の反応がエンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

水性試料中の L A L 反応性物質の濃度を測定するシステムであって、

( a ) メモリと、

( b ) メモリに作動的に接続されたプロセッサであって、

( I ) 試料測定値を含む 1 以上の入力を受信するステップであって、試料測定値が、L A L 反応性物質を含む水性試料に特徴的な測定された物理特性であって、物理特性が光学特性であるステップと、

( I I ) 曲線あてはめを使用して、1 以上の出力を生成するステップであって、出力が、試料測定値及び既知の濃度の L A L 反応性物質を含む溶液の物理特性の 1 以上の基準測定値で明らかになる相関に基づいて、水性試料が将来の指定された時間に有する L A L 反応性物質の予測された濃度、並びに検証された試料測定値を含んでおり、試料測定値の品質が履歴データ及び / 又は基準測定値を用いて検証されるステップと、

( I I I ) メモリ中に出力を報告及び / 又は保存するステップと  
を実行するようにプログラムされたプロセッサとを含むシステム。

## 【請求項 11】

プロセッサに作動的に接続された光学読取装置をさらに含む、請求項 10 記載のシステム。

## 【請求項 12】

物理特性が透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度からなる群から選択される光学特性である、請求項 10 記載のシステム。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 3】

物理特性が非線形特性であり、非線形特性が反応速度論である、請求項 1 2 記載のシステム。

## 【請求項 1 4】

1 以上の反応がエンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 3 記載のシステム。

## 【請求項 1 5】

プロセッサが、反応のカスケード開始の 1 以上の見かけの時間遅延を曲線あてはめステップにおける変数として含めるようにさらにプログラムされている、請求項 1 4 記載のシステム。

10

## 【請求項 1 6】

水性試料中の L A L 反応性物質の濃度を測定するシステムであって、

( a ) メモリと、

( b ) メモリに作動的に接続されたプロセッサであって、

( I ) 2 以上の試料測定値を含む 1 以上の入力を受信するステップであって、試料測定値が、L A L 反応性物質を含む水性試料に特徴的な測定された物理特性であって、物理特性が光学特性であるステップと、

( I I ) 既知の濃度の L A L 反応性物質を含む溶液の物理特性の 3 以上の基準測定値の非線形挙動で明らかになる相関を使用して、試料測定値に基づいて水性試料が将来の指定された時点で有する L A L 反応性物質の予測された濃度を含む 1 以上の出力を作成するステップと、

20

( I I I ) メモリ中に出力を報告及び / 又は保存するステップと  
を実行するようにプログラムされたプロセッサと  
を含むシステム。

## 【請求項 1 7】

プロセッサに作動的に接続された光学読取装置をさらに含む、請求項 1 6 記載のシステム。

## 【請求項 1 8】

物理特性が透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度からなる群から選択される光学特性である、請求項 1 6 記載のシステム。

30

## 【請求項 1 9】

物理特性が非線形特性であり、非線形特性が検出試薬と L A L 反応性物質との間の反応の既知の反応速度論に基づく、請求項 1 8 記載のシステム。

## 【請求項 2 0】

1 以上の反応がエンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 9 記載のシステム。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

40

## 【0 0 0 1】

本発明は、水性試料中の L A L 反応性物質の濃度を測定する分野に関する。より具体的には、本発明は、L A L 反応性物質測定法及びシステムに関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、酵母及び真菌などの微生物汚染は、ヒトにおいて重病及び死さえ引き起こし得る。ヒトがグラム陰性細菌に感染すると、細菌は熱誘発細菌エンドトキシン又はエンドトキシン分子を産生し得る。エンドトキシン分子は、微生物が存在しない場合でさえ、汚染源となり得る。エンドトキシン分子は、ヒトにとって危険で、毒素ショックをもたらす、又は致命的となり得る。

50

## 【 0 0 0 3 】

特定の産業、特に製薬、医療機器及び食品産業の製造業者は、その製品が微生物もエンドトキシン汚染も含まないことを確実にするために特定の基準を満たさなければならない。これらの産業は、米国食品医薬品局又は環境保護庁によって設定されているものなどの種々の安全性基準を満たすためにエンドトキシンの存在についての頻繁で、正確かつ高感度の試験を要する。

## 【 0 0 0 4 】

現在、カプトガニの血球溶解物を用いて、試験している試料中又は上のエンドトキシンの存在を検出する種々のアッセイが開発されている。血球溶解物がエンドトキシんに暴露すると、凝固が起こる。血球溶解物は、リムルス属 ( *Limulus* )、タキプレウス属 ( *Tachypleus* ) 及びカルキノスコルピウス属 ( *Carcinoscorpius* ) の種を含む種々のカプトガニ種の血リンパから産生されるアメボサイト溶解物である。一般的に使用されるアメボサイト溶解物は、リムルス属の種の血リンパから産生され、リムルスアメボサイトライセート ( 「 L A L 」 ) と呼ばれる。

## 【 0 0 0 5 】

L A L を使用する日常的なアッセイには、ゲルクロット法 ( *gel clot assay* )、エンドポイント比濁法 ( *end point turbidimetric assay* )、カイネティック比濁法 ( *kinetic turbidimetric assay* )、エンドポイント発色法及びカイネティック発色法が含まれる。これらのアッセイ及び使用される基準についてのさらなる情報は、米国薬局方 ( 「 U S P 」 ) 第 8 5 章「細菌エンドトキシン試験法」 ( 「 B E T 」 )、日本薬局方 4 . 0 1 「細菌エンドトキシン試験法」、欧州薬局方 2 . 6 . 1 4 「細菌エンドトキシン」及び他の同等の国の薬局方に見出され得る。さらなる国際的に調和した薬局方情報は、I C H Q 4 B 附属書 1 4 「細菌エンドトキシン試験法総則」に見出され得る。医療機器のエンドトキシン試験については、情報が U S P 第 1 6 1 章「輸液及び注入アセンブリ並びに同様の医療機器」及び A N S I / A A M I S T 7 2 「細菌エンドトキシン - 試験法、日常的モニタリング及びバッチ試験の代替法」に見出され得る。

## 【 0 0 0 6 】

典型的な発色及び比濁 B E T 法はウェルプレートで行われ、吸光度の測定が 2 4、9 6 及び 3 8 4 ウェルプレートを実行するよう設計されたプレートリーダーによって行われている。これら全ての場合で、カイネティック法は、指定された開始光学濃度 ( 吸光度 ) に達するために要する時間の測定を要求する。そのため、吸光度値が、単一プレートで試験されている全ての試料及び基準について定期的間隔で測定される。反応が進行するにつれて、光学濃度 ( 「 O D 」 ) が時間とともに増加するが、実際の測定が正確な指定された開始光学濃度に等しいと予想することは不可能である。試料の光学濃度が指定された開始値に達し、これを通過した時を計算するために、連続測定でのデータにデータ分析が要求される。このような分析は、典型的には指定された開始値未満及び超の測定値による 2 つの連続的なタイムスタンプ付きデータポイント間の単純な線形補間、又は指定された開始値の近くの大きな塊のデータポイントにわたる線形もしくは非線形曲線あてはめのいずれかを伴う。開始 O D に達するために要する時間はエンドトキシン濃度と逆相関するので、結果として低レベルのエンドトキシンの試験は必然的に長いアッセイ時間を要する。これは、典型的には L A L 試薬の製造業者及び種類に応じて、ブランク ( 陰性対照 ) から識別される 0 . 0 0 5 E U / m L を測定するために 1 時間以上となる。

## 【 0 0 0 7 】

比濁法は、通常発色基質と併せて同等の L A L 試薬を用いた発色法よりも長い時間を要する。4 0 5 n m に吸光度ピークを有する発色基質を組み込んだ発色法は、エンドポイントモード又はカイネティックモードで行われ得る。発色法では、4 0 5 n m で測定される光学濃度の時間依存性が、通常「初期遅延時間 ( *lag time* ) 」と呼ばれる、O D が 0 に近いままである実質的な初期間を示す。初期遅延時間に、O D が上昇し始める期間、すなわち「初期勾配 ( *initial slope* ) 」が続く。エンドトキシン濃度が

上昇するにつれて初期遅延時間は短くなる一方で、OD 応答の初期勾配はエンドトキシン濃度とともに増加する。エンドポイントモードは、エンドトキシンレベルと指定された時間で達成される 405 nm での OD を相関させる。カイネティックモードは、エンドトキシンレベルと、典型的には  $OD = 0.2$  として定義される 405 nm での指定された開始 OD を達成するために要する時間を相関させる。ブランク対照と、 $0.005 \text{ EU/mL}$  又は  $0.001 \text{ EU/mL}$  の所望の検出下限との間の分解能を得るために、エンドポイント法とカイネティック法の両方が、典型的には 60 分超の長い実行時間を有する。

#### 【0008】

そのため、アッセイ結果が迅速に得られることを要する場合、アッセイの早期の時点でエンドトキシン濃度と確かに相関するデータ分析方法を有することが望ましい。よって、アッセイの早期の時点でエンドトキシン濃度を推定するためのいくつかの方法が開発されている。

10

#### 【0009】

1つの方法は、現在行われている静的光散乱法よりも迅速に比濁法からの結果を得る動的光散乱法である。別の方法は、アッセイ時間とエンドトキシン濃度を相関させるために時間関数差分法及び多系列差分法と併せて比濁法のために光散乱測定を使用する装置を使用する。別の方法は、エンドトキシン濃度と、比濁法で検出される散乱光の初期増加速度の相関を使用する。これら全ての方法が所与の試料のエンドトキシン濃度を得るために要する時間を減少させ得るが、これらの方法全てが相関又は線形予測法に頼っている。またこれらの方法は使用者がデータを摘要要件又は基準と相関させることを可能にしない。さらに、これらの方法のいずれも、測定における異常を使用者に警告することができない。

20

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0010】

【特許文献1】特開2004-212120号公報

#### 【発明の概要】

#### 【0011】

驚くべきことに、LAL とエンドトキシンの反応の反応速度論を監視することにより、使用者が、試料中に存在し得る任意のエンドトキシンの濃度を予想することに加えて、試料分析において異常が存在するかどうかを検証又は評価することが可能になることが発見された。遅延時間、初期勾配、経時的な吸光度の勾配の変化率、及び時間に対して測定される吸光度の最大勾配等などのいくつかの OD 応答が、所与の試料中のエンドトキシン濃度とよく相関する。さらに、閾値吸光度に達するのに要する時間がエンドトキシン濃度と相関するカイネティック法については、驚くべきことに、吸光度データを回収すると、動的基準で開始時間の予想が可能であることが発見された。これにより、エンドトキシン濃度を、指定された吸光度閾値に達するのに要する実際の時間よりも早く計算することが可能になる。このような予想に使用する戦略は、校正に使用するエンドトキシン基準の濃度範囲に依存する。したがって、低エンドトキシン濃度でさえ、高感度かつ迅速な方法が開示される。本方法を、比濁法及び発色法を含む任意の光度測定法と共に使用することができる。

30

40

#### 【0012】

一実施形態では、水性試料中の LAL 反応性物質の濃度を測定する方法が開示される。本方法は、水性試料を検出試薬と接触させて、調製試料を形成するステップを含み得る。調製試料の物理特性を測定して、調製試料に特徴的な 1 以上の試料測定値を得ることができる。次いで、曲線あてはめを使用して、試料測定値及び既知の濃度の LAL 反応性物質を中に含む溶液の物理特性の 1 以上の基準測定値の間で明らかに相関に基づいて、水性試料が将来の指定された時間に有する LAL 反応性物質の濃度を予測することができる。履歴データ及び/又は基準測定値を用いて、試料測定値の品質を検証することができる。

#### 【0013】

50

別の実施形態では、物理特性が光学特性であり得る。適当な光学特性には、それだけに限らないが、透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度が含まれる。

【0014】

さらに別の実施形態では、物理特性が反応速度論などの非線形特性であり得る。非線形特性を用いて、試料測定値の品質を検証することができる。反応速度論の種類には、それだけに限らないが、エンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せが含まれる。別の実施形態では、本方法が、反応のカスケード開始の1以上の見かけの時間遅延を変数として曲線あてはめステップに含めるステップをさらに含み得る。

10

【0015】

本発明の別の実施形態では、水性試料を検出試薬と接触させて調製試料を形成するステップを含む、水性試料中のLAL反応性物質の濃度を測定する方法が開示される。調製試料の物理特性を測定して、調製試料に特徴的な2以上の試料測定値を得ることができる。水性試料が将来の指定された時間に有するLAL反応性物質の濃度を予測することができる。予測された濃度は、試料測定値及び既知の濃度のLAL反応性物質を中に含む溶液の物理特性の3以上の基準測定値の非線形挙動間で明らかになる相関に基づき得る。

【0016】

別の実施形態では、物理特性が光学特性であり得る。適当な光学特性には、それだけに限らないが、透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度が含まれる。

20

【0017】

さらに別の実施形態では、物理特性が検出試薬とLAL反応性物質との間の反応の既知の反応速度論に基づく非線形特性であり得る。適当な反応には、それだけに限らないが、エンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せが含まれる。

【0018】

本発明の別の実施形態では、水性試料中のLAL反応性物質の濃度を測定するシステムが開示される。システムは、メモリと、メモリに作動的に接続されたプロセッサとを含み得る。プロセッサは、試料測定値を含む1以上の入力を受信するようプログラムされ得る。試料測定値は、水性試料に特徴的な測定された物理特性であり得る。プロセッサはまた、曲線あてはめを使用して1以上の出力を生成するようプログラムされ得る。出力は、試料測定値及び相関に基づいて、水性試料が将来の指定された時間に有するLAL反応性物質の予測された濃度を含み得る。相関は、既知の濃度のLAL反応性物質を中に含む溶液の物理特性の1以上の基準測定値間で明らかになり得る。出力はまた、試料測定値の品質が検証された、検証された試料測定値を含み得る。履歴データ及び/又は基準測定値を用いて、品質を検証することができる。プロセッサはまた、メモリ中に出力を報告及び/又は保存するようプログラムされ得る。さらに別の実施形態では、システムが、プロセッサに作動的に接続された光学読取装置をさらに含み得る。

30

【0019】

システムの別の実施形態では、物理特性が光学特性であり得る。適当な光学特性には、それだけに限らないが、透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度が含まれる。

40

【0020】

さらに別の実施形態では、物理特性が反応速度論などの非線形特性であり得る。適当な反応には、それだけに限らないが、エンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せが含まれる。別の実施形態では、プロセッサが、反応のカスケード開始の1以上の見かけの時間遅延を変数として曲線あてはめステップに含めるようさらにプログラムされ得る。

50

## 【 0 0 2 1 】

本発明の別の実施形態では、水性試料中の L A L 反応性物質の濃度を測定するシステムが開示される。システムは、メモリと、メモリに作動的に接続されたプロセッサとを含み得る。プロセッサは、1以上の入力を受信するようプログラムされ得る。入力は、水性試料に特徴的な測定された物理特性である2以上の試料測定値を含み得る。プロセッサは、既知の濃度の L A L 反応性物質を中に含む溶液の物理特性の3以上の基準測定値の非線形挙動間で明らかになる相関を使用して1以上の出力を作成し得る。出力は、水性試料が将来の指定された時間に有し得る L A L 反応性物質の予測された濃度を含み得る。プロセッサはまた、メモリ中に出力を報告及び/又は保存するようプログラムされ得る。さらに別の実施形態では、システムが、プロセッサに作動的に接続された光学読取装置をさらに含み得る。

10

## 【 0 0 2 2 】

別の実施形態では、物理特性が光学特性であり得る。適当な光学特性には、それだけに限らないが、透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度が含まれる。

## 【 0 0 2 3 】

さらに別の実施形態では、物理特性が非線形特性であり得る。非線形特性は、検出試薬と L A L 反応性物質との間の反応の既知の反応速度論に基づき得る。適当な反応には、それだけに限らないが、エンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せが含まれる。

20

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 2 4 】

【 図 1 】 種々のエンドトキシン濃度での初期遅延時間及び初期勾配が示された本発明の実施形態を示す図である。

【 図 2 】 ブランク水の発色カイネティック L A L 法からのデータストリームのチャートである。

【 図 3 】 ブランク水の予測開始時間を示す図である。

【 図 4 】 中断を含むデータストリームを示す図である。

【 図 5 】 正常及び異常データストリームについてのピアソンの  $r$  を示す図である。

30

## 【 発明を実施するための形態 】

## 【 0 0 2 5 】

本明細書中のいくつかの頻繁に使用される用語は以下の通り定義され得る。以下の定義は、本発明の理解を助けることを意図したものであって、本発明を本明細書で使用される用語に限定することを意図していない。「予想する」又は「予測する」とは、ある量が将来の指定された時間に有する大きさを評価することを意味する。予測は、それだけに限らないが、データを、情報が維持され、かつ適当な予想が将来の時間のデータの挙動に関してなされ得るようにデータを処理する任意の線形又は非線形法を含む、当業者に知られている任意の方法によって達成され得る。予測法には、それだけに限らないが、曲線あてはめ及び外挿、並びにこれらの組合せが含まれる。

40

## 【 0 0 2 6 】

「曲線あてはめ」とは、所与のデータ又は所与のデータセットに最も近接接近する曲線を計算することを意味する。曲線あてはめの適当な方法には、それだけに限らないが、データをあてはめるための関数を使用すること、使用する反応系の既知の反応速度論に基づく関数を使用すること、データをあてはめるための検出力曲線 (power curve) を使用すること、時間オフセットを有する検出力曲線を使用すること、データをフィルタリングしてノイズ又は標本化効果を排除すること、データを変換すること (例えば、対数への変換)、最小二乗法を使用すること、最終あてはめに対するポイントの重要度がデータポイントの重みに基づくように各データポイントと重みを関連付けること、データが得られたポイントのデータに含まれる情報に基づいてデータポイントの重みを計算するこ

50

と、履歴データに基づいて重みを計算すること、データストリームの一部を選択すること、データから導き出される値を曲線あてはめすること（例えば、データの勾配又は二次導関数の曲線あてはめ）、及びこれらの組合せが含まれる。

#### 【0027】

「外挿」とは、関数の値が分かっている全てのポイントより大きい又は小さいポイントで関数を推定することを意味する。外挿の適当な方法には、それだけに限らないが、分析が既知の関数に基づくパラメトリック手段を用いること、非パラメトリック手段を用いること、限定されたデータ系列の回帰から値を導き出すこと、限定されたデータ系列の曲率又は他の動的挙動から値を導き出すこと、データの任意の変換から値を導き出すこと、全ての論理的及び数学的変換を含めること、並びにこれらの組合せが含まれる。

10

#### 【0028】

「発色開始時間」は、指定されたスペクトルの光吸収又は光学濃度が指定された量変化するのにかかる時間間隔である。「発色光学濃度」は、一定時間後の指定されたスペクトルの吸収である。「発色光学濃度発達率」は、経時的な吸収の最大変化である。「比濁開始時間」は、指定されたスペクトルの光散乱の量又は光散乱による見かけの光学濃度変化が指定された量変化するのにかかる時間間隔である。「比濁レベル」は、一定時間後の指定されたスペクトルの光散乱の量又は光散乱による見かけの光学濃度変化である。「比濁発達率」は、経時的な光散乱の量の最大変化又は光散乱による最大の見かけの光学濃度変化である。

#### 【0029】

20

反応が完了する前にとったデータからLALとエンドトキシンの反応の結果を予想することは、速度論的挙動に基づく。これは、同様に、その化学経路、直前のステップによって活性化された酵素のカスケードに基づく。結果は、検出力関数、すなわち遅延を含む検出力関数によって厳密に近似される。このような分析を使用してデータストリームが正常反応からのものであるかどうか、又は気泡形成などのいくつかの異常が起こっており、アッセイを拒否すべきかどうかを決定することもできる。

#### 【0030】

LAL試薬は、酵素前駆体、活性化すると酵素になるタンパク質、関連因子及び阻害剤の混合物である。各ロットは、回収されたカプトガニ集団の変化、及び調製の差異のために固有である。主要成分は、エンドトキシンによって活性化され、酵素活性化C因子になるC因子であり、これが今度はB因子を活性化する。活性化B因子がブレ凝固酵素（Pre-clotting Enzyme）を活性化し、これが今度はコアグロゲンの凝固（比濁法について）又は発色（発色法について）を引き起こす。

30

#### 【0031】

酵素カスケードの速度論は、Hemker及びHemker、The Procedures of the Royal Society、B（Biological Sciences）、173、411～420（1969）による「The Kinetics of Enzyme Cascade Systems」に論じられている。オープンカスケード、活性化酵素が安定であるものについては、最も単純なモデルは、生成物が時間の検出力関数として形成されるものである。

40

#### 【0032】

$$[P] = at^b + [P_0]$$

（Pはカスケード生成物（発色指示薬又は凝固したコアグロゲン）であり、P<sub>0</sub>は初期レベルであり、tは反応時間であり、かつa及びbは定数である）。

#### 【0033】

実際には、反応速度論はより複雑である。C因子の活性化は、エンドトキシンと複数活性化部位の結合によるものであり得、ここでは中間結合が構造及びその後の結合親和性を変化させる。このアロステリック調節は、それ自体が比較的短期間にわたって活性化C因子によるエンドトキシンの置換として単純にモデル化され得るC因子の活性化を遅延させる。全プロセスを、この転移が起こるのにかった平均時間にほぼ等しい遅延としてモデ

50

ル化することができる。この第1のステップからのエンドトキシン濃度の「増幅」はないが、後のステップで産生される酵素が全て連鎖反応として急速に増加する。

#### 【0034】

LAL活性化への2つの経路が存在する。1つの経路はエンドトキシン経路であり、3つのカスケードステップを有する。したがって、エンドトキシン経路の反応速度論は、ほぼ3次検出力関数となる。第2の経路はG因子を通したグルカン経路である。グルカン経路は1つのカスケードステップのみを有し、反応速度論は一次関数に近くなる。多くの試料では、検出可能なグルカンが存在せず、反応速度論はエンドトキシン経路のもの、すなわち高次の検出力関数となる。より複雑な試料では、両経路が活性化され、速度論がより複雑になり得る。その速度論サインによって両者の活性を分離することが可能であるが、これを行う産業的に許容される手段は、経路の1つを化学的に阻害することによる。

10

#### 【0035】

しかしながら、驚くべきことに、エンドトキシンとグルカンの速度論サインの両方を監視することを用いてどの挙動が「正常」であり、また光路中の粒子の移動又は気泡の成長などの他の因子によって何か引き起こされ得るかを決定することができることが発見された。これにより、使用者が、試料中に存在し得る任意のエンドトキシン又はグルカンの濃度を予想することに加えて、データを検証する又は試料分析において異常が存在するかどうかを評価することが可能になる。

#### 【0036】

本明細書で使用される「検証する」とは、分析の品質を実証、確認、又は分析の確実性もしくは分析の進行を確立することを意味する。分析及び/又は試料測定値の適合性を検証する場合、2以上の陽性対照（校正範囲の中央でLAL反応性物質が添加された試料）、3つの陰性対照（ブランク）、及び任意の他のパラメータが製造業者又は摘要によって指定された摘要法が使用され得る。陽性製品対照スパイク（control spike）は、摘要要件（50%～200%の間のスパイク収率）、陰性対照（最低レベルとブランクとの間の差、ブランクはより低い応答レベルを有する）、及び製造業者の仕様書（例えば、0.005 EU/mL 試料とブランクとの間の差、又は特定の基準についての開始時間限界）を満たさなければならない。これらの分析が成功である場合、これらはシステム及び試薬が仕様通り働いていることを検証しており、試料測定値が「検証されて」いる。データストリームを検証することは、データストリームの挙動が履歴測定値データ又は検出試薬とLAL反応性物質との間の反応の既知の反応速度論に基づいて予想された挙動に統計学的に一致することを意味する。これは、データストリームがLAL反応に基づく分析チャンバーの変化によって作成されており、気泡などのある異常に基づくチャンバー又は光路の変化によって作成されているのではないことを示している。究極的には、この差別化自体は、それだけに限らないが、試料臨界光学特性ブランク読取、混合試料/試薬/任意のLAL反応性物質、初期光学読取、臨界光学特性の変化のなめらかさ及び変化率、理論的予想変化への適合の密接度、データのノイズレベルでの予想などを含む、その動作を確認するための異なる試薬及びロット並びに誘発された異常での多重試験によって検証されるだろう。試験結果が不正確であるように思われる場合、LAL反応性物質測定結果を作成することなく、試験プロセスを停止し、エラーメッセージを送ることができる。同様に、試験結果が出力として現れる場合、試験結果及び/又は試料測定値は「検証されて」いる。

20

30

40

#### 【0037】

同様に驚くべきことに、経時的な吸光度、開始時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度などのいくつかのOD応答が、所与の試料中のエンドトキシン濃度とよく相関することが発見された。したがって、低エンドトキシン濃度でさえ、高感度かつ迅速な方法が開示される。本方法を、比濁法及び発色法を含む任意の光度測定法と共に使用することができる。

#### 【0038】

一実施形態では、水性試料中のLAL反応性物質の濃度を測定する方法が開示される。

50

本方法は、水性試料を検出試薬と接触させて、調製試料を形成するステップを含み得る。調製試料の物理特性を測定して、調製試料に特徴的な1以上の試料測定値を得ることができる。次いで、曲線あてはめを使用して、試料測定値及び既知の濃度のLAL反応性物質を中に含む溶液の物理特性の1以上の基準測定値の間で明らかになる相関に基づいて、水性試料が将来の指定された時間に有するLAL反応性物質の濃度を予測することができる。履歴データ及び/又は基準測定値を用いて、試料測定値の品質を検証することができる。

#### 【0039】

別の実施形態では、物理特性が光学特性であり得る。適当な光学特性には、それだけに限らないが、透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度が含まれる。

#### 【0040】

さらに別の実施形態では、物理特性が反応速度論などの非線形特性であり得る。非線形特性を用いて、試料測定値品質を検証することができる。反応速度論の種類には、それだけに限らないが、エンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せが含まれる。別の実施形態では、本方法が、反応のカスケード開始の1以上の見かけの時間遅延を変数として曲線あてはめステップに含めるステップをさらに含み得る。

#### 【0041】

本発明の別の実施形態では、水性試料を検出試薬と接触させて調製試料を形成するステップを含む、水性試料中のLAL反応性物質の濃度を測定する方法が開示される。調製試料の物理特性を測定して、調製試料に特徴的な2以上の試料測定値を得ることができる。水性試料が将来の指定された時間に有するLAL反応性物質の濃度を予測することができる。予測された濃度は、試料測定値及び既知の濃度のLAL反応性物質を中に含む溶液の物理特性の3以上の基準測定値の非線形挙動間で明らかになる相関に基づき得る。

#### 【0042】

別の実施形態では、物理特性が光学特性であり得る。適当な光学特性には、それだけに限らないが、透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度が含まれる。

#### 【0043】

さらに別の実施形態では、物理特性が検出試薬とLAL反応性物質との間の反応の既知の反応速度論に基づく非線形特性であり得る。適当な反応には、それだけに限らないが、エンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せが含まれる。

#### 【0044】

本発明は、CPUと、主記憶装置と、I/Oリソースと、ユーザーインターフェース、例えば、モニター、手動キーボード、マウス及びプリンターとを含むコンピュータで実行可能である。場合により、モニターはタッチスクリーンであり得る。コンピュータはハンドヘルドデバイスであり得る。したがって、水性試料中のLAL反応性物質の濃度を測定するシステムも開示される。コンピュータは光学読取装置に作動的に接続され得る。ある実施形態では、光学読取装置（図示せず）が固定された光学部品を含む。固定された光学部品は、低コストLED及びフォトダイオードを含み得る。読取装置は、光学測定値の正確度を増加させるためにバンドパスフィルタを含むことができる。読取装置はまた、光学ノイズを減少させ、環境光を拒否し、かつ迷光を拒否するよう調節又は電子工学的に切断され得る。読取装置はまた、監視ポイントの行列が各行又は列について単一部品を有し、低部品コストへの時間多重化読取スキームを使用することができるように多重化光学部品を含むこともできる。窓、暗視野、開口、レンズ、反射板又は拡散板などの光学部品をマイクロ流体カートリッジ自体に組み込んで光路の一部を提供する又はシステムの安定性もしくは感度を増加させることもできる。

#### 【0045】

適当な読取装置は、それだけに限らないが、透過、吸収、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、濁度、散乱光、化学発光及び蛍光を含む種々の光学検知法及び測定値を使用又は行うことができる。

【 0 0 4 6 】

検知される光は、単一波長、もしくはスペクトルバンド、又は複数波長もしくはバンドのものであり得る。複数光バンドを使用してシグナルを増加させる又は干渉及びノイズを減少させることができる。例えば、複数周波数で光学濃度の変化を監視することにより、不安定な試料の色の干渉を減少させることができるだろう。ラマン分光法、磁気共鳴及び表面プラズモン共鳴などのより複雑な光学法、並びに静電容量、粘度、磁性、音波抵抗及び音波屈折などの非光学法を含む、使用される検知法は、流体の変化を離れて検知することができる。

10

【 0 0 4 7 】

本発明の別の実施形態では、水性試料中の L A L 反応性物質の濃度を測定するシステムが開示される。システムは、メモリと、メモリに作動的に接続されたプロセッサとを含み得る。プロセッサは、試料測定値を含む 1 以上の入力を受信するようプログラムされ得る。試料測定値は、水性試料に特徴的な測定された物理特性であり得る。プロセッサはまた、曲線あてはめを使用して 1 以上の出力を生成するようプログラムされ得る。出力は、試料測定値及び相関に基づいて、水性試料が将来の指定された時間に有する L A L 反応性物質の予測された濃度を含み得る。相関は、既知の濃度の L A L 反応性物質を中に含む溶液の物理特性の 1 以上の基準測定値間で明らかなり得る。出力はまた、検証された試料測定値を含み得る。履歴データ及び / 又は基準測定値を用いて、試料測定値の品質を検証することができる。プロセッサはまた、メモリ中に出力を報告及び / 又は保存するようプログラムされ得る。報告は上記モニター上の視覚表示であり得る。報告はまた、上記のプリンターからのプリントアウトであり得る。さらに別の実施形態では、システムが、プロセッサに作動的に接続された光学読取装置をさらに含み得る。光学読取装置は、1 以上の試料測定値及び / 又は 1 以上の基準測定値を含む入力をプロセッサに提供することができる。

20

【 0 0 4 8 】

システムの別の実施形態では、物理特性が光学特性であり得る。適当な光学特性には、それだけに限らないが、透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度が含まれる。

30

【 0 0 4 9 】

さらに別の実施形態では、物理特性が反応速度論などの非線形特性であり得る。適当な反応には、それだけに限らないが、エンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せが含まれる。別の実施形態では、プロセッサが、反応のカスケード開始の 1 以上の見かけの時間遅延を変数として曲線あてはめステップに含めるようさらにプログラムされ得る。

【 0 0 5 0 】

本発明の別の実施形態では、水性試料中の L A L 反応性物質の濃度を測定するシステムが開示される。システムは、メモリと、メモリに作動的に接続されたプロセッサとを含み得る。プロセッサは、1 以上の入力を受信するようプログラムされ得る。入力は、水性試料に特徴的な測定された物理特性である 2 以上の試料測定値を含み得る。プロセッサは、既知の濃度の L A L 反応性物質を中に含む溶液の物理特性の 3 以上の基準測定値の非線形挙動間で明らかなり得る相関を使用して 1 以上の出力を作成し得る。出力は、水性試料が将来の指定された時間に有し得る L A L 反応性物質の予測された濃度を含み得る。プロセッサはまた、メモリ中に出力を報告及び / 又は保存するようプログラムされ得る。さらに別の実施形態では、システムが、プロセッサに作動的に接続された光学読取装置をさらに含み得る。

40

【 0 0 5 1 】

50

別の実施形態では、物理特性が光学特性であり得る。適当な光学特性には、それだけに限らないが、透過率、吸光度、濁度、光散乱、光学濃度、色、色値、色相、スペクトル、化学発光、蛍光、経時的な吸光度の磁気共鳴、吸光度の一定の変化までの時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度が含まれる。

#### 【 0 0 5 2 】

さらに別の実施形態では、物理特性が非線形特性であり得る。非線形特性は、検出試薬と L A L 反応性物質との間の反応の既知の反応速度論に基づき得る。適当な反応には、それだけに限らないが、エンドトキシン反応、グルカン反応及びこれらの組合せが含まれる。

#### 【 0 0 5 3 】

本明細書に開示される方法は、統計学的相関、試料測定値を既知のエンドトキシン濃度と相関させる統計学的に有効な手段を示す開放型の方法、又はこれらの測定値から導き出される因子を使用して、未知であるエンドトキシン濃度を予測する。このような測定値には、開始時間、経時的な吸光度の最大勾配、及び一定時間後の吸光度などの測定値が含まれ得る。さらなる測定値又は因子には、それだけに限らないが、時間対光学濃度、時間対フィルタリングした光学濃度（フィルタ - 種々の方法を使用してシグナル、この場合、経時的な光学濃度への変動又はノイズの効果を減少させること、最も単純なのは平均化及び「データスムージング」（デジタルフィルタ、セグメント回帰、及び外れ値拒否を含む）の方法）、応答の勾配、フィルタリングした応答の勾配、応答の二次導関数、フィルタリングした応答の二次導関数、応答の高次導関数、フィルタリングした応答の高次導関数、応答の曲率（その最も単純な形では、種々の導関数の関係）、フィルタリングした応答の曲率、応答に曲線あてはめされた式からの因子（例えば、単純回帰、切片による）、フィルタリングした応答にあてはめられた式からの因子、導出値のゆがみ、積分和又はベクトル積などの他のデータストリーム因子、割り当てられた重みに基づいて応答に曲線あてはめされた式からの因子、及びこれらの組合せが含まれ得る。前述のように、データセット又は各データポイントは、最終的なあてはめに対するポイントの重要度がデータポイントの重みに基づくように重みを割り当てられ得る。重みは、それだけに限らないが、重要度、変動、情報フロー及び実証的検定を含む因子に基づいて割り当てられ得る。

#### 【 0 0 5 4 】

さらに、データの品質は、経時的な応答への曲線あてはめによって評価され得る。適当な曲線あてはめ法には、前に列挙された方法が含まれる。

#### 【 0 0 5 5 】

別の実施形態では、予想的様式で L A L に基づくアッセイからのデータを分析する方法が開示される。予想は、時間に対する光学応答の動的線形勾配を監視することを含み得る。線形勾配は、アッセイの初めから現時点までの全てのデータポイントにわたって測定され得る。別の実施形態では、線形勾配は、現時点の前のより小さな数の連続データポイントにわたって測定され得る。選択される連続データポイントの数は、エンドトキシン検出の所望の範囲に基づいて変化し得る。別の実施形態では、少なくとも 3 個の連続データポイントを使用して勾配を測定することができる。さらに別の実施形態では、勾配が 3 個より多いが 7 個未満の連続データポイントで測定され得る。或いは、連続データポイントの数は 7 個より多い。

#### 【 0 0 5 6 】

さらに別の実施形態では、測定される線形勾配を、経時的に測定される 3 個以上の連続データポイントの最新の収集セットに関して連続的に更新することができる。線形勾配の閾値がエンドトキシンレベルと相関し得る。線形勾配の閾値は、約 0 . 0 0 0 0 1 ~ 約 0 . 0 0 0 0 5 光学濃度単位 / 秒に及び得る。

#### 【 0 0 5 7 】

勾配が事前設定された閾値に達した後、線形曲線あてはめ又は高次曲線あてはめアルゴリズムを生光学応答データに適用することができる。或いは、生応答が指定された開始値の一定割合に達した後、曲線あてはめアルゴリズムを生応答データに適用することができ

10

20

30

40

50

る。

#### 【0058】

閾値光学応答についての予想開始時間は、試料容器の幾何学に基づいて再定義することができる。例えば、閾値OD値は、典型的な96ウェルプレート実験のカイネティック発色法については0.2に設定される。OD値は、例えば、マイクロ流体カートリッジを使用する場合などの他の幾何学については適当に再定義することができる。

#### 【0059】

線形又は高次関数を用いて生応答データをあてはめて、予想開始時間を計算することができる。別の実施形態では、予想開始時間を、時間とともに連続的に更新し、予想で収束についての適当な基準にしたがって報告することができる。さらに別の実施形態では、測定開始時間と同様に、予想開始時間がエンドトキシンレベルと関連し、応答の線形性についてチェックされる。さらに別の実施形態では、予想開始時間が、同じ試料の反復について計算される。予想開始時間を、同じ試料からの陽性スパイク回復実験の反復について計算することもできる。さらに別の実施形態では、予想開始時間が、較正に使用される基準の反復について計算される。予想開始時間を、対照スパイク回復実験について計算して、計算された較正式を検証することもできる。さらに別の実施形態では、動的線形勾配計算及び予想開始時間計算を使用して回収している光学応答データの品質を検証する。例えば、光学応答データの品質を検証することによって、データの異常を発見することができる。このような異常は、それだけに限らないが、インサイツでの気泡形成による光学応答データの不連続、読取装置光路による反応ウェルの誤整列、又は試料読取装置の断続的/組織的な機械誤動作を含む種々の状態によって引き起こされ得る。

#### 【実施例】

#### 【0060】

##### 相関法

以下の実施例は、LAL測定試験の相関法を記載する。LAL測定試験手順及びこれらの試験手順の結果も記載する。カイネティック発色法のように試料を調製した。この方法については、エンドトキシン水溶液を種々の濃度(0.005 EU/ml、0.05 EU/ml、0.5 EU/ml及び5 EU/ml)で調製した。いかなるエンドトキシンも含まない溶液、すなわちブランクも調製し、対照溶液として使用した。次いで、溶液を37℃で10分間インキュベートした。インキュベーション後、各エンドトキシン濃度及びブランクを、NaOH及びデオキシコレートで洗浄した試料ホルダーに分配(3連で)した。

#### 【0061】

次いで、各試料の光学濃度、すなわち吸光度を、1時間にわたって分光計を用いて405 nmで測定した。開始時間、すなわち0.2の吸光度に達するのに要する各基準時間も測定した。Perkin Elmer 1420マルチラベルカウンターを用いて測定値を記録した。いったん全ての測定値を収集及び記録したら、時間に伴う試料の吸光度変化をプロットした。

#### 【0062】

種々の濃度でのOD応答の初期遅延時間及び初期勾配をプロットから得て、これを図1に示す。これらの初期遅延時間及び初期勾配は、所与の試料中のエンドトキシン濃度とよく関連し得る。したがって、これらの初期遅延時間及び初期勾配を用いて較正曲線を作成することができる。

#### 【0063】

試料を、較正曲線を作成するために使用する試料と同様に処理する場合、作成された較正曲線を使用して対象となる試料中のエンドトキシンの濃度を測定することができる。

#### 【0064】

##### 予測及び検証

上に論じられるように、エンドトキシンとグルカンの両方の速度論サインを監視することにより、使用者が、試料中に存在し得る任意のエンドトキシン又はグルカンの濃度を予

10

20

30

40

50

想することに加えて、試料分析において異常が存在するかどうかを検証又は評価することが可能になる。実際のカスケード反応も、酵素の各々を阻害する1つ又は複数の因子を有する。エンドトキシンカスケードは4ステップカスケードであり、グルカンカスケードは2ステップカスケードである。しかしながら、エンドトキシン反応とグルカン反応の両方が、その速度論に影響を及ぼす阻害因子を有する。カプトガニでは、閾値に達するまでこれらの因子が凝固を防止し、このことが、閾値が感度を制限するためにこれらの因子を分析システムにとって望ましくないものにしている。試薬の処理の一部は、製造業者及びロットによって変化するこれらの因子を除去することである。速度論への効果は、各反応の順序へのわずかな調整として最も単純にモデル化される。実際、反応速度論がモデルである検出力関数の挙動を利用する種々の数値技法を使用することができるので、正確な程度は問題でない。

10

#### 【0065】

これらの単純化モデルを使用して、関数がアッセイの早期解決に適合し、データストリームがLAL反応によって作成されているのであって、ある異常又は誤差によって作成されているのではないことを検証し、応答が統計学的に類似であるかどうかを決定するように指定することができる。モデルを複雑にすることによって、モデルが常に実際の挙動をよく表すようにすることができるが、限定されたセットの変数を用いた単純なモデルの利点がモデルをこのような数値分析にとって好ましいものにする。

#### 【0066】

##### 実施例 - 開始時間予測のための検出力曲線関数

20

発色又は比濁カイネティック法のいずれについても、光学濃度を経時的に測定する。エンドトキシンレベルの測定基準として使用する開始時間は、LAL反応の光学濃度又は光吸収が指定された量変化した時間である。通常、この時間は、このレベルを超過した測定ポイント間の補間によって計算される。反応がまだエンドポイントに達していないが、その初期状態から、背景ノイズと区別可能なほど十分な変化を示した場合、その結果を検出力関数にあてはめて、開始時間を含む将来の性能を予測することができる。

#### 【0067】

将来の反応性能を予測することは、応答が最新の記録値に対するノイズのために正規分散よりも大きいポイントからのデータの部分をとり、光学応答の変化及び時間を対数に変換することによって行うことができる。検出力関数は、ログ-ログ変換後に線形であるので、結果としてこれらのデータへの最良線形あてはめを用いてこれらを適合させることができる。最終結果にとっての重要度を含む、いくつかのスキームに基づいて、これらのデータのあてはめに重みを与えることができる。

30

#### 【0068】

図2は30秒毎に測定した吸収値についての、3.1mm経路長を有する10μLセル中のブランク水の発色カイネティックLAL法からのデータストリームのチャートである。エンドトキシンレベルの較正及び計算に使用する開始時間は、光学濃度の変化が0.1吸収単位に達するのにかかる時間とした。約4500秒(75分)でこの閾値を超える。データはいくぶんノイズが多い(nois y)ので、異なる補間法はわずかに異なる解答を与え、4514秒がその平均値である。

40

#### 【0069】

時間と吸収の変化の両方のログ値の線形回帰を用いて最後の20個のデータポイント(10分の読取)を検出力曲線にあてはめて、適合曲線が閾値に達するポイントを求めることによって、予測開始時間を予測することができる。得られた予測開始時間を図3に示す。

#### 【0070】

また、図3に示される実線は、4514秒開始時間閾値 $\pm 1.0\%$ を表し、誤差帯を形成する。予測開始時間(ひし形記号による線)は、3000秒後に誤差帯内にある。2以上の連続する読取について0.999超のピアソンの積率相関係数(「ピアソンのr」)を用いると、予測開始は、分析の3300秒で誤差帯に入る。したがって、分析時間を1

50

200秒、すなわち20分超減らす。さらに、誘発される誤差は、並列して実行される同一ブランク試験の正規変動（典型的には2%超）未満であり、正規の又はブランク水分析にとって十分に正確な解答となる。

#### 【0071】

##### 実施例 - 遅延を有する検出力曲線

エンドポイント予測のために検出力関数を用いることの単純であるがより正確なバリエーションは、エンドトキシシンレベルのC因子活性への移行によるカスケード開始の見かけの時間遅延、及びカスケードステップ遅延を含めることである。全てのロットが異なるので、一定の時間遅延の使用は、変化し得るものより望ましくない。

#### 【0072】

この方法は、時間遅延が追加の変数である式をあてはめることを伴う。これは、分析を実質的に複雑にし、代数的に解くことができない式をもたらす。より単純な方法は、離散時間遅延オフセットデータストリームを計算し、ピアソンのr及び残差（これらは範囲にわたって最も均一に分布している）のバランスを用いて最良適合を有するものがどれかを決定することである。

#### 【0073】

上記の同じデータセットを、時間遅延又は0、30、60、90、120、150、180、210及び240秒のログ変換前の実際の時間から減じられた時間で試験することができる。1200秒の時間後、ピアソンのrと残差バランスの両方を用いた最良適合が120秒の遅延オフセットで達成される。4530秒で丸められた開始時間値について2610秒でピアソンのr値基準が満たされる。これは1920秒、すなわち32分の減少である。

#### 【0074】

90又は150秒の遅延を用いる場合、結果はわずかに正確でないが、類似である。この理由のために、密接に間隔をあけられた遅延時間を試験することは必要ではなく、30秒などの粗い間隔が適当であることが分かった。「最良」遅延時間を見出すことは、シグナルを維持しながらノイズを有効に減らす代表的かつ安定な適合を得ることほど重要ではない。

#### 【0075】

##### 実施例 - データストリーム検証

関数がデータストリームを十分に記載する場合、新たなデータポイントは適合関数を解答に収束させる。解答が収束しない場合には、関数はデータを十分に記載していない。このことを、データストリームの妥当性についてチェックする単純な方法の1つとして使用することができる。

#### 【0076】

例えば、光学濃度の変化と時間の両方がログに変換され、単純な検出力関数にあてはめられた場合、勾配の連続解答と切片との間の差は経時的に小さくなるはずである。勾配と切片解答が小さくなら（収束し）ない場合、データストリームが非カスケード効果によって破損していた。履歴データから収束に限界を設けることができ、統計学的にありそうにない様式でこのような限界を超える場合に、正当な理由によってアッセイを拒否することができる。

#### 【0077】

データストリームを検証するために、異常を上を示されるのと同じデータに加えた。異常は、粒子、気泡又はある他の現象が光路を破壊した同様のセルにおける異なるアッセイからの実際の光学的異常であった。中断がないと、20ポイントの適合（10分）についてのデータストリームのピアソンのrは、時間が進むにつれて1.00に収束する。中断があると、これは、図4のデータストリームに示されるように直ちに逸脱し始める。したがって、1.00というピアソンのrの限界値を設定して、正しい反応速度論に相当するデータと異常に相当するデータを区別することができる。図5に示されるように「正常」及び「異常」データストリーム中に見られ得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 8 】

本明細書は、ベストモードを含む、実施例を用いて本発明を開示し、また当業者が、任意の装置又はシステムを製造及び使用し、任意の組み込まれた方法を行うことを含めて本発明を実施することを可能にもしている。本発明の特許性のある範囲は、請求項によって定義され、当業者の心に浮かぶ他の実施例を含み得る。このような他の実施例は、請求項の文字通りの言語と異ならない構造的要素を有する場合、又は請求項の文字通りの言語との実態のない差異を含む同等の構造的要素を含む場合には、請求項の範囲に入ることが意図されている。

【 図 1 】

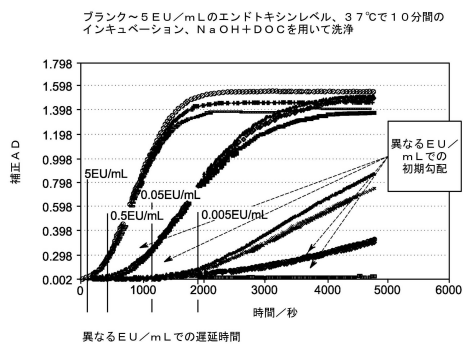


FIG. 1

【 図 3 】

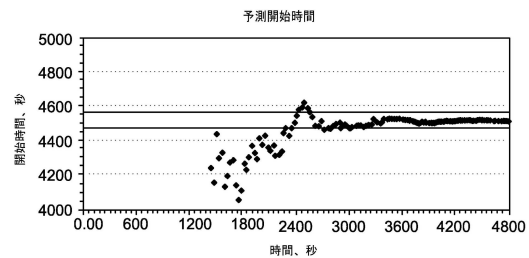


FIG. 3

【 図 2 】

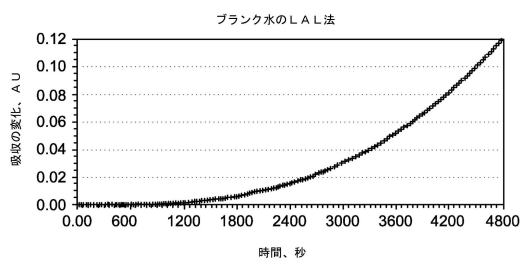


FIG. 2

【 図 4 】

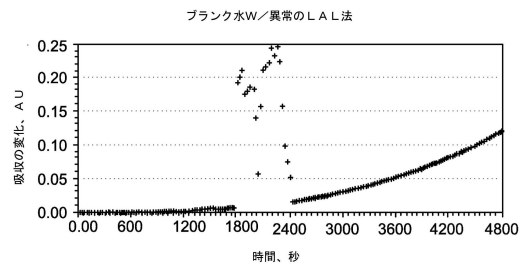


FIG. 4

【図 5】

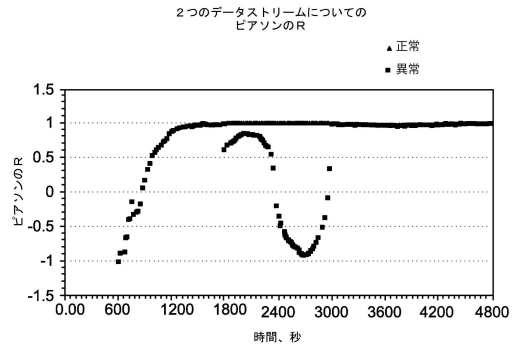


FIG. 5

## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/710,990

(32)優先日 平成24年10月8日(2012.10.8)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/710,903

(32)優先日 平成24年10月8日(2012.10.8)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 メランソン, ポール・チャールズ

アメリカ合衆国、コロラド州・80301、ボルダー、スパイン・ロード、6060番

(72)発明者 サンドルサン, ヴィディヤサンカール

アメリカ合衆国、ペンシルベニア州・19053、トレヴォース、ソマートン・ロード、4636番

(72)発明者 ゴデック, リチャード・ダグラス

アメリカ合衆国、コロラド州・80301、ボルダー、スパイン・ロード、6060番

(72)発明者 デン, ショウクワン

中華人民共和国、201203、シャンハイ、ジャンジアン・ハイテク・パーク、カイ・ルン・ロード、1800番

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特開2004-212120(JP, A)

欧州特許出願公開第00957366(EP, A1)

特開昭61-093958(JP, A)

特開平03-220456(JP, A)

国際公開第2008/139544(WO, A1)

Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic-QCL, [ONLINE], 2011年 1月 1日, URL, [http://www.lonzabio.jp/products/endotoxin/pdf/00190169\\_en.pdf](http://www.lonzabio.jp/products/endotoxin/pdf/00190169_en.pdf)

KOTARO MITSUMOTO, Novel Endotoxin Assay by Laser Light-Scattering Particle-Counting Method, JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS, 2009年 1月 1日, V23 N2, P117-124

BAINES ALAN, ENDOTOXIN TESTING, HANDBOOK OF MICROBIOLOGICAL QUALITY CONTROL, CRC PRESS, 2003年, P144-167

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)