

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第3区分

【発行日】平成23年2月17日(2011.2.17)

【公表番号】特表2008-521104(P2008-521104A)

【公表日】平成20年6月19日(2008.6.19)

【年通号数】公開・登録公報2008-024

【出願番号】特願2007-541880(P2007-541880)

【国際特許分類】

G 0 6 F 19/00 (2011.01)

G 0 1 N 21/78 (2006.01)

【 F I 】

G 0 6 F 19/00 6 0 0

G 0 1 N 21/78 C

【誤訳訂正書】

【提出日】平成22年12月24日(2010.12.24)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも目的試料の現行個体群の内容物数を表す実験に基づく測定値が取得され、個体群の増幅処理の反応の連続した適用に供される、目的試料中の核酸の初期個体群を、絶対的および/または相対的やり方で、定量化することを、コンピュータ手段により実施する方法であって、以下の段階：

a) 増幅処理の反応の増幅産物量の増幅効率のモデルが増幅処理の連続数の関数として与えられること、前記モデルは：

- ・ 増幅処理の反応の適用の第一の部分に関する実質的に一定の局面；および
- ・ 増幅処理の反応の適用の第二の部分に関する一定ではない局面；を含み

前記第一および第二の部分は、前記一定のおよび一定ではない局面の間で増幅産物量の増幅効率が切替わる切替領域により一体化され、前記領域には、実質的に前記切替に対応する増幅処理の指数値を有し；

b) 少なくとも前記切替の指数値および目的試料中の初期個体群の内容物数を表すパラメータを含む関係を表すために前記増幅産物量の増幅効率のモデルを用いること；

c) 実験に基づく測定値との比較により、少なくとも前記切替の指数値を決定すること；および、後の、または直後の段階において、d) それから、目的試料中の初期個体群の内容物数を導出すること、を含む方法。

【請求項2】

・ 段階b)において、前記増幅処理の連続数の関数としてパラメータ化された、切替の指数値を表す少なくとも一のパラメータを含む、変化量を表すために前記増幅産物量の増幅効率のモデルを用いること；および

・ 段階c)において、少なくとも、切替の指数値を表す前記パラメータを、実験に基づく測定値との比較により決定すること、を含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記パラメータ化された変化量が目的試料中の現行個体群の内容物数を表し、

・前記変化量が目的試料中の初期個体群の内容物数を表すパラメータを更に含み；および

・段階c)およびd)において、前記増幅処理の指数値および目的試料中の初期個体群の内容物数を表すパラメータが、実質的に同時に決定される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記パラメータ化された変化量が増幅産物量の増幅効率を表し、および、段階c)において、パラメータ化された変化量を実験に基づく変化量と比較するために、増幅産物量の増幅効率の実験に基づく変化量が前記実験に基づく測定値から決定される請求項2に記載の方法。

【請求項5】

段階d)において：

d1) 目的試料中の現行個体群の内容物数を表し、そして、少なくとも前記増幅処理の指数値を表すパラメータ、および目的試料中の初期個体群の内容物数を表すパラメータを含む、第二のパラメータ化された変化量を決定すること；

d2) 段階c)で決定された指数値に関するパラメータ化された値を、前記第二の変化量に適用すること；および

d3) 前記第二の変化量を実験に基づく測定値と直接比較することにより、少なくとも初期個体群の内容物数を表すパラメータを調整すること、を包含する請求項4に記載の方法。

【請求項6】

段階d2)において、指数値に対して概略値を適用すること、他方

段階d3)において、初期個体群の内容物数を表すパラメータも調整しながら、指数値の値を正確化すること、を包含する請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記パラメータ化された変化量または、前記第二のパラメータ化された変化量が：

・前記実験に基づく測定値を表し；および

・初期個体群の内容物数を表す測定値に対応するパラメータを包含し、

並びに、初期個体群の内容物数の測定値が、前記パラメータ化された変化量を実験に基づく測定値と比較することにより決定される、場合を含む請求項3又は6に記載の方法。

【請求項8】

測定値から背景雑音を差し引くこと、および、初期個体群の内容物数を表す非ゼロの測定値を用いるために補償を導入することを含む段階であって、実験に基づく測定値を処理する前段階を適用することを包含する請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

公知の初期個体群の内容物数を有する標準試料中の初期個体群の内容物数に関する測定値を得ること、およびその間の比例関係を導出すること；および、初期個体群の公知の内容物数とその測定値の間と同じ比例関係を目的資料に適用することにより、目的試料中の初期個体群の内容物数の値を決定すること、を包含する請求項7又は8に記載の方法。

【請求項10】

公知の初期個体群の内容物数を有する標準試料中の初期個体群の内容物数に関するそれぞれの測定値を得ることを包含し、および：

・標準試料の初期個体群の内容物数とこれらのそれぞれの初期個体群の内容物数に関する対応する測定値の間の従属関係を定めること；および

・目的試料の初期個体群の内容物数に関する測定値を決定したあと、前記従属関係に基づく補間により目的個体群の初期内容物数を決定すること；による請求項7又は8に記載の方法。

【請求項11】

それぞれ公知の初期個体群の内容物数を有する一以上の標準試料を準備すること、目的試料に関するのと実質的に同じ条件下で前記標準試料に前記連続した増幅処理を適用すること、およびパラメータ化された変化量を実験に基づく値と比較することによりそれらの有効な初期測定値を決定することを包含する請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】

それぞれ公知の初期個体群の内容物数を有する多数の標準試料を準備すること、目的試料に関するのと実質的に同じ条件下でそれらに前記連続した増幅処理を適用すること、並びに段階 a)、b)、および c) の適用においてそれらそれぞれの指数値を決定することを包含し、並びに、段階 d) において：

・標準試料の初期個体群の内容物数とそれらの指数値との間の従属関係を定めること；および

・目的試料に関する指数値を決定した後、前記従属関係に基づく補間により目的個体群の初期内容物数を決定すること；による

請求項 3 に記載の方法。

【請求項 13】

相対的な定量化のために、目的個体群だけではなく、増幅処理の反応の連続した適用に供せられる参照個体群も準備し、それぞれ：

・目的個体群の内容物数を表す実験に基づく測定値；および

・参照個体群の内容物数を表す実験に基づく測定値；を取得することにあり、

参照個体群に段階 a)、b)、および c) を適用することに続き、

それぞれの目的個体群の初期内容物数と参照個体群の初期内容物数の間の比を決定することの段階 d) を包含する、

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

増幅産物量の増幅効率の実験に基づく変化量の形式の実験に基づく測定値を前記増幅処理の連続数の関数として表現すること；および

・低い増幅処理の指数値の数に関する雑音に実質的に左右される第一の領域；および

・それに続くより高い増幅処理の指数値の数に関するより低い雑音を伴う第二の領域

を含む増幅処理の連続数の関数として増幅産物量の増幅効率の実験に基づく変化量を得ること、

を包含する請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

増幅産物量の増幅効率が一定ではない局面が、増幅産物量の増幅効率が低下する局面の一つであり、

・増幅産物量の増幅効率が一定の局面に関する概略値を見積もりすること；および

・少なくとも前記切替領域中の指数値を求めるとき、見積もりされた増幅産物量の増幅効率が閾値の下で、好ましくは一定の局面の部分の下である、前記雑音がより低い第二の領域中の測定値の少なくとも幾つかを採択しないこと、

を包含する請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

増幅産物量の増幅効率が一定ではない局面が増幅産物量の増幅効率が低下する局面であり、雑音がより低い第二の領域から出発した増幅処理の指数値の数が減少する方向に変化することにより前記切替領域を特定すること、および増幅産物量の増幅効率が所定の値 ( $E_0 = 1$ ) を認識できるほどに超える増幅処理の概略指数値を検出することを包含する請求項 14 又は 15 に記載の方法。

【請求項 17】

増幅産物量の増幅効率が前記所定の値 ( $E_0 = 1$ ) にほぼ等しい増幅処理の指数値を検出することにより、概略指数値から出発して増幅処理の指数値の数が増大する方向に変化することにより、前記切替領域における増幅処理の指数値の見積もり値が、分数の値を得

ることを含んで正確化される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

減少パラメータを包含する減少する指数関数により前記増幅産物量の増幅効率の一定ではない局面をモデル化すること、および実験に基づく測定値と比較することにより切替領域中の指数値を伴う段階 c) において前記減少パラメータを決定することを包含する請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

増幅処理の反応がリアルタイムで遂行されるポリメラーゼ連鎖反応である請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記測定値が放出された蛍光の測定された量である請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 1 に記載の方法を実施するための設備であって、  
・少なくとも目的試料を支持するための試料支持体；  
・少なくとも目的試料中の目的個体群に対して、前記連続した増幅処理の反応を適用するための第一の装置；  
・目的個体群の現行の内容物数を表す測定値を取得するための第二の装置；および  
・前記第二の装置から測定信号を受信すること、および請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法を実施することに適するコンピュータ手段、を含む設備。

【請求項 22】

プロセッサユニットのメモリに、または前記プロセッサユニットの読取機と協働するのに適する取り外しできるメモリ媒体上に貯蔵するコンピュータプログラム製品であって、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法を実施するための命令を含むプログラム製品。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】特に PCR による、核酸の個体群の初期内容物数を見積もりする方法、設備、およびコンピュータプログラム

【技術分野】

【0001】

本発明は、連続した増幅処理の反応に供される試料中の、目的個体群の初期内容物数を見積もりすることに関する。

【0002】

背景技術

本発明は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に供される試料中の核酸の初期量の、リアルタイムでの決定において、特に有利な、しかし限定的ではない、応用を見いだしている。「PCR 定量化」として公知のこの型の技術は、典型的には検診との関連で、特に患者から採取された体液試料中の病原体 (例えば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)) のコピーの数を評価するために使用される。

【0003】

リアルタイム PCR 増幅処理曲線の図の外観を概略説明するための図 1 を参照する。示した例では、横軸に PCR サイクル指数値の数がプロットされ、縦軸に各 PCR サイクルに関して測定した、放射された蛍光の量 (任意単位) がプロットされている。各 PCR サイクルに関して、試料は、DNA ポリメラーゼに核酸の増幅処理を可能にさせる、および

対応するPCR生成物の蛍光性分子による検出を可能にさせる温度変化量に供されることを理解すべきである。測定された蛍光 $F_n$ を、PCRサイクル数 $n$ の関数としてプロットすることにより、変化量は、図1に示した型が得られ、および、少なくとも：

- ・ 蛍光の測定値が、蛍光測定用装置の背景雑音に実質的に一致する第一の部分BN；
  - ・ 蛍光の測定量が実質的に指数関数的に増加する第二の部分EXP；
  - ・ 蛍光の測定量の増加が顕著に減衰し、全体として、実質的に直線的に振る舞う第三の部分LIN；および
  - ・ 蛍光の測定値が水平局面に達する第四の部分PLA、
- を含む。

【0004】

初期のPCRサイクル（第一および第二の部分）では、目的 個体群は実質的に指数関数的に増加し、一方、それに続くサイクル（第三および第四の部分）では、他の現象が目的 個体群の成長と競合するようになり、そのため前記成長が削がれて、水平局面PLAになることが観察されるべきである。

【0005】

Nucleic Acids Research、2003、Vol. 31、No. 16中に公開されている、R. G. RutledgeおよびC. Coteによる文献、「Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves」は、目的 試料中の、公知ではない核酸の初期量を、PCRにより評価する方法を開示する。この方法の本質は、目的 試料中に存在する核酸の初期量を補間により決定するために、「標準」と呼ばれる、核酸の公知の初期量を有する多数の試料を用いる点にある。

【0006】

一般的に、試料中の核酸の初期量が多いほど、より早く、検出可能量のPCR生成物が得られる、即ち、より早く、検出可能な量の、放射される蛍光が得られる。先行技術に関連する図2を参照して、標準St1に関するサイクルCt1は対応する標準St2に関するサイクルCt2より前に起こり、標準St2に関するサイクルCt2は標準St3に関するサイクルCt3より前に起こる等から、標準St1中の初期個体群は標準St2中のそれより大きいこと、標準St2中の初期個体群は標準St3中のそれより大きいこと、等が理解されるであろう。

【0007】

斯くして、蛍光の測定値が蛍光閾値THR（図2に示した）に到達するサイクルに対応するようなCTサイクルは、任意のレベル（典型的には背景雑音より下）の位置にあり、PCRサイクルに供される核酸の個体群の初期内容物数 $N_0$ を表すパラメータとしての役目を果たす。上記の先行技術におけるこの観察は、公知の初期個体群を有する多数の標準に関するサイクル数Ct1、Ct2、Ct3、Ct4と、それらの初期個体群 $N_0^1$ 、 $N_0^2$ 、 $N_0^3$ 、 $N_0^4$ の間の、図3に示した種類の関係を構築するために用いられている。斯くして、縦軸にサイクルCt1、Ct2、Ct3、Ct4等をプロットし、横軸に初期個体群の内容物数 $N_0^1$ 、 $N_0^2$ 、 $N_0^3$ 、 $N_0^4$ の対数をプロットすることにより、回帰傾斜REGが得られる。この回帰傾斜REG上に、目的 試料に関して検出されたサイクルCt<sub>int</sub>がプロットされる（破線の矢印F1）。回帰傾斜REG上の補間（破線の矢印F2）により、目的 試料に関する初期個体群の内容物数 $N_0^{int}$ が、次いで、決定される。

【0008】

この方法は、広範に用いられているが、それにも拘わらず、いくつかの難点を示す。

【0009】

第一に、これは、それぞれ公知の初期個体群を有する多数の標準試料の使用を必要とする。

【0010】

第二に、この方法は利用者の判断に依存する。利用者に選択される蛍光の閾値は、増幅 処理 曲線中のCtサイクル値に直接の影響を有し、その結果、目的 試料中の初期個体群の

内容物数に関する見積もり値に直接の影響を有するためである。精度は、一般的に、増幅処理曲線の指数的な成長局面EXP中に在るように選択されるとより良いので、閾値も、結果の精度に対する影響力を有する。そうは言っても、実技においては、利用者にとって、設定されている蛍光閾値THRが、曲線の指数的な局面に本当に対応しているのか、および、全ての試料（標準試料及び目的試料）に対してそうなのか、知ることは困難である。

【0011】

最後に、この方法は、如何なる証明も伴わずに、目的試料および全ての標準試料において、個体群は同じ増幅処理増幅産物量の増幅効率を有すると仮定している。斯くして、もし目的試料がPCR抑制剤を含有していると、典型的にはそうなのだが、その結果は偽って低くされるであろう。

【0012】

斯くして、先行技術の技法は、利用者によって定義される蛍光閾値THRに依存することを理解すべきである。選択される値はCtサイクルの値に、およびその結果、目的試料中の初期量の決定に影響を及ぼす。これは、Ctサイクル検出を自動化してそれを信頼性があるものとするため、近年数多くの研究が為されてきた理由の一つである。

【0013】

発明の目的及び概要

本発明は、全く異なる道筋を提案することによりこの状況を改善することを目指している。

【0014】

第一に、本発明は方法を提供し、その方法は、目的試料中の核酸の初期個体群を、絶対的および/または相対的な手法において定量化するコンピュータ手段により実施される。試料は、目的個体群を増幅処理するための反応の、連続した適用に供される。非常に普遍的なやり方で、この増幅処理は、連続するPCRサイクルを実施することにより着手してよいが、任意の他の増幅処理技術を用いることもできるであろう。とりわけ、下に説明するように、増幅処理は、単に反応増幅産物量の増幅効率によって定義される必要があることを理解すべきである。これらの連続的な増幅処理操作の間、実験に基づく測定値が取得され、これは少なくとも目的試料中の、現在の個体群の内容物数を表す。一般性の喪失を伴わずに、各増幅処理の反応の後または間に、1以上の測定値を取得できることが理解されるであろう。

【0015】

目下好ましい本発明の定義において、本発明の意味における方法は以下の段階：

a) 増幅処理の反応の増幅産物量の増幅効率のモデルが増幅処理の連続数の関数として与えられること、前記モデルは：

- ・ 増幅処理の反応の適用の第一の部分に関する実質的に一定の局面；および
- ・ 増幅処理の反応の適用の第二の部分に関する一定ではない局面；

を含み、

前記第一および第二の部分は、前記一定のおよび一定ではない局面の間で増幅産物量の増幅効率が切替わる切替領域によって一体化され、前記領域には、前記切替に実質的に対応する増幅処理の指数値を有し；

b) 少なくとも前記切替の指数値および目的試料中の初期個体群の内容物数を表すパラメータを含む関係を表すために前記増幅産物量の増幅効率のモデルを用いること；

c) 実験に基づく測定値との比較により、少なくとも前記切替の指数値を決定すること；および、後の、または直後の段階において、d) それから、目的試料中の初期個体群の内容物数を導出すること、

を含む。

【0016】

さらなる詳細な説明

上記の方法の特徴を実証する、本発明の幾つかの原理を概略説明している図4Aおよび4Bを参照する。

## 【0017】

初めに、図4Aは、各反応が指数値 $n$ のインデックスを付されている、連続した増幅処理の反応に漸次供されている目的个体群の現時点における内容物数を表す、連続した実験に基づく測定値 $F_n$ をプロットしていることを理解すべきである。ここで説明する非限定的な例において、この連続した反応は、連続したPCRサイクルに対応する。この非限定的な例において、実験に基づく測定値 $F_n$ は、各PCRサイクルに対する蛍光の測定量に対応する。斯くして、PCR反応および目的試料により放出される蛍光を組み合わせる定量化方法において、PCRサイクルの間に放出される蛍光が試料中の核酸个体群の内容物数に比例するように、試料中に蛍光試薬が導入される。実際には、あるPCRサイクルに対して、多数の測定を行うか、または全く測定を行わないことが好ましい場合があり得る。更に、もっと一般的に、蛍光がPCRによる定量化に対して頻繁に用いられる方法であるにしても、測定方法は、蛍光以外の技術を用いてよい。最後に、他の増幅処理技術を、その増幅処理に対応する反応増幅産物量の増幅効率における変化量を追跡可能な場合には、本発明の状況の中で実施できるであろうことを理解すべきである。以下に説明する例は優先的にPCRサイクルに関連するので、増幅処理の反応の増幅産物量の増幅効率に言及するために、指数値 $n$ の各PCRサイクルについての「PCRの効率値」を $E_n$ と記載する。

## 【0018】

図1を参照して上に述べたように、図4Aは、2つの領域を主に含み、その場合：

- ・初期のPCRサイクル（部分EXP）の間、个体群は実質的に指数関数的に増加する；他方
- ・引き続くサイクル（LINおよびPLA部分）の間、目的个体群の成長に伴って他の現象が競合し始め、それで、成長が鈍化する。

## 【0019】

以下の2つの仮定をする：

- ・反応の増幅産物量の増幅効率 $E_n$ は、部分EXPにわたる初期サイクルの間、比較的一定である；および
- ・ある回数のサイクルが実行された後、反応の増幅産物量の増幅効率 $E_n$ は、部分LINおよびPLAにわたって減少を始める。

## 【0020】

増幅産物量の増幅効率におけるこの減少には種々の説明、特に、PCR試薬（DNAポリメラーゼ、dNTP、プライマー、等）の劣化および/または欠乏および/または自身から造られた生成物による阻害があり得る。

## 【0021】

ここでは、増幅産物量の増幅効率は、初期は一定で、その後減少すると仮定する。そうは言っても、

- ・初期に一定である、これは増幅処理による成長に関する通常の状態に対応する；および
- ・その後一定ではない（減少する、または増加する）、これは実質的に正常ではない状況に対応する、  
という増幅産物量の増幅効率の状況に対して、本発明がより一般的に適用されることを理解すべきである。

## 【0022】

核酸の量を増幅処理するための反応の状況において、増幅産物量の増幅効率は、一定の局面から一定ではない局面にわたって、しばしば変わることが見いだされている。以下に詳細に説明するように、本発明の意味において、この観察は、それから核酸の初期量を導出するために有利である。当初、増幅産物量の増幅効率も、早期のサイクルの間の一定ではない局面から後の一定の局面へと変わり得るとだけ、述べられている。本発明は、等しく、そのような環境に適用可能である。一般的に、それ故、本発明の意味において、一定の局面と一定ではない局面との間の増幅産物量の増幅効率の切替が検出されることが理解

されるべきである。

【0023】

目的は、増幅処理に供される個体群の初期内容物数見いだすことである。図4を参照して、この初期個体群の内容物数を表す測定値  $F_0$  は、これは実際には背景雑音  $BN$  の測定値に一致するが、初期個体群の内容物数を直接決定するためにそのまま用いることはできないことが理解されるであろう。先行技術において、指数関数の局面、即ち、背景雑音から抜け出る際に典型的に起こる局面を用いることにより、この初期個体群の内容物数を定量化する試みが為されてきた。次いで、図4Aにおいて、閾サイクル  $C_t$  が決定される（「先行技術」に対する点  $PA$  に対応する）。上述のとおり、この領域において、測定値は、しばしば、雑音に影響され、背景雑音からの抜けだしを表す閾サイクル  $C_t$  を正確に決定することは困難である。

【0024】

全く異なる取組により、本発明は、その代わりに、増幅産物量の増幅効率が一定の局面から一定ではない局面の間で、本環境においては、典型的には指数関数の局面  $EXP$  から線形関数の局面  $LIN$  の間で切替わる領域  $CHO$  を正確に決定するために、増幅処理曲線の殆ど全ての点を利用する。領域  $CHO$  はより遅いサイクルの間に起こるため、測定は、この領域  $CHO$  における方が背景雑音出口領域におけるより、論理的に雑音による影響が少ないことが理解されるであろう。更に、特に、増幅産物量の増幅効率が伴う数学的な特性故に、最も有利なことに、目的個体群の初期内容物数の定量化に用いる必要がある標準の数は、先行技術の定量化において用いる標準の数より少ないことが、以下に示される。

【0025】

切替領域  $CHO$  を目的個体群の初期内容物数と結び付ける関係を、概略以下に示す。増幅処理の反応の増幅産物量の増幅効率は：

$$N_{n+1} = N_n + E_n \times N_n$$

で与えられ、ここで：

・  $N_n$  は、連続した増幅処理における、指数値  $n$  の増幅処理後の目的個体群の内容物数であり；

・  $N_{n+1}$  は、上述の連続した増幅処理における、それに続く、指数値  $n+1$  の増幅処理後の目的個体群の内容物数であり；および

・  $E_n$  は、上述の連続した増幅処理における、指数値  $n$  の増幅処理の反応の増幅産物量の増幅効率である。

【0026】

この関係を回帰関係に再定式化すると、我々は：

$$N_{n+1} = (1 + E_n) (1 + E_{n-1}) (1 + E_{n-2}) \cdots (1 + E_0) N_0$$

を得、ここで、 $N_0$  は目的個体群の初期内容物数である。増幅産物量の増幅効率  $E_n$  が一定である限り、上の関係は更に単純に、以下のように書けることが理解されるであろう：

$$N_{n+1} = N_0 \times (1 + E_0)^{n+1}$$

ここで、指数値  $n+1$  は未だ切替領域  $CHO$  に達していない。初期サイクルの間、増幅産物量の増幅効率は一定なので、以下が適用される：

$$E_n = E_{n-1} = E_{n-2} = \cdots = E_0$$

ここで、 $E_0$  は一定の局面の間の増幅産物量の増幅効率の値である。とは言っても、指数値  $n+1$  が切替領域  $CHO$  中に移動するとき、関係は：

$$N_{n+1} = N_0 \times (1 + E_0)^{C_{EEP}} \times \text{関数}(C_{EEP}, n+1)$$

となり、ここで、

・  $(C_{EEP} - 1)$  は、増幅産物量の増幅効率がなおも一定である間の増幅処理の反応の最後の指数値であり（それ故、指数値  $C_{EEP}$  それ自身が、指数関数の局面と線形関数の局面の間の固有の切替の指数値を表していることが理解されるであろう）；および

・ 関数  $(C_{EEP}, n+1)$  の項は、増幅産物量の増幅効率の一定ではない局面を特徴付け、並びに、少なくとも切替の指数値  $C_{EEP}$  および現行の増幅処理の指数値  $n+1$  に依存する、特有の関数である。

## 【 0 0 2 7 】

斯くして、如何にして切替の指数値  $C_{E E P}$  と目的個体群の初期内容物数  $N_0$  を結びつけることが可能かを見ることができる。この局面において、上で定義した方法の段階 a ) および b ) は、既の実施されていることが理解できる。

## 【 0 0 2 8 】

最初の実施は、実験的に切替の指数値  $C_{E E P}$  を決定すること、および、目的試料と同じ増幅処理に供される多数の標準試料を用いる回帰により、それを初期内容物数に関連づけることにある。このような環境下、初期には、切替の指数値  $C_{E E P}$  (段階 c ) は実験的に決定され、および、後において、指数値  $C_{E E P}$  と初期内容物数  $N_0$  (段階 b ) の関係は、初期内容物数  $N_0$  (段階 d ) で終わるために決定されるので、上で定義した方法の段階 b ) および c ) は単に入れ替えられることが理解されるであろう。

## 【 0 0 2 9 】

第一の実施の意味においてこれらの段階を全て詳細に説明する前に、実験に基づく測定値に基づいて指数値  $C_{E E P}$  を決定するための方法を説明する。特に、実験的に指数値  $C_{E E P}$  を決定する方法は、上述の第一の実施とは異なる別の実施に適用できることが理解されるであろう。

## 【 0 0 3 0 】

あるサイクル  $n$  の効率値  $E_n$  と、同じサイクル  $N_n$  及び引き続くサイクル  $N_{n+1}$  における目的個体群の現在の内容物数の関係に戻って、増幅処理の効率値は以下のように表される：

$$E_n = (N_{n+1} / N_n) - 1$$

## 【 0 0 3 1 】

ある環境においては、特に測定において背景雑音  $BN$  を考慮する必要がないときは、第一近似に対して、測定値が目的個体群の現行の内容物数に実質的に比例すると仮定することができる。そうは言っても、実際には、図 4 A に示されるように、直接の測定値  $F_n$  に基づいて決定される、補正された実験に基づく測定値  $F'_n$  を伴って、もっとしばしば測定値のドリフトが考慮されるであろう。

## 【 0 0 3 2 】

背景雑音  $BN$  を差し引くこと、およびその後、初期個体群の内容物数を表す非ゼロの測定値を考慮するために補償を導入することにある、実験に基づく測定値  $F_n$  を処理する前段階は、好ましく適用される。図 4 A に示された例において、テスト結果が、PCR における蛍光測定に対して線形モデルが満足のいくことを示しているので、指数値  $n$  の関数としての背景雑音  $BN$  の変化量は線形関数により表すことができる。そうは言っても、環境によっては、指数関数的に変化するモデルを用いることが好ましい可能性がある。いずれにせよ、典型的には初期測定点により与えられる背景雑音  $BN$  の変化量に最も適合するモデルが適用される。以降、背景雑音  $BN$  の変化量に関する選択されたモデルを、全ての実験に基づく測定値  $F_n$  から差し引く。この段階を適用することにより、理論的な蛍光の測定値  $F_0$  は、初期個体群の内容物数  $N_0$  がゼロに対応する、ゼロの測定値に減らされ、これは物理的実態を表していない、ということが理解されるであろう。その結果、以下のように、この補正に対する補償を適用することが有利である：

$$F'_n = F_n - BN +$$

ここで：

- ・ 項  $F'_n$  は、現行の指数値  $n$  に対する補正された測定値に対応する；
- ・ 項  $F_n$  は、前記現行の指数値  $n$  における生の実験に基づく測定値に対応する；
- ・ 項  $BN$  は、現行の指数値  $n$  に関してモデル化された背景雑音に対する値に対応する

；および

・ は、説明されている例において一定であると仮定され、および、初期個体群の内容物数  $N_0$  を直接表す、対応する補償項である。

## 【 0 0 3 3 】

背景雑音を補正するこれらの段階は切替の指数値  $C_{E E P}$  の決定において非常に有利で

あるが、これらは、背景雑音が初期個体群の内容物数  $N_0$  の測定値を歪曲しがちな場合はいつでも、前記個体群の内容物数  $N_0$  のいかなる決定及び定量化にも、適用できるであろう。この点において、これらの段階は、適切な場合は、別個の保護の主題を構成する可能性がある。

【0034】

この様にして得られる補正された測定値  $F'_n$  は、目的試料における現行個体群の内容物数  $N_n$  に対して有利に比例するので、増幅産物量の増幅効率  $E_n$  は、今や、測定値（上述のように補正された）の関数として、以下の関係により直接表される：

$$E_n = (F'_{n+1} / F'_n) - 1$$

【0035】

斯くして、図4Aの実験に基づく測定値  $F_n$  から、補正された測定値  $F'_n$  が得られ、それから、図4Bに示すように、その後、(くり返) [連続] した指数値  $n$  の関数として効率値 における変化量が決定される。

【0036】

要するに、実験に基づく測定値は、連続した増幅処理  $n$  の関数として図4Bに示された種類の、効率値  $E_n$  における実験に基づく変化量の形式で表される。これは：

- ・低い増幅処理の指数値  $n$  に対する認知できる程度に雑音がある第一の領域（具体的には、図4Bの例におけるサイクルCGに先立つ）；および
  - ・それに続くより高い増幅処理の指数値 に対するより少ない雑音を示す第二の領域（少なくとも切替領域CHOの後）、
- を含む、増幅産物量の増幅効率に関する実験的に決定された変化量が与えられる。

【0037】

少なくとも、PCRによる増幅処理及び蛍光による測定の最も普通の環境において、増幅産物量の増幅効率の一定ではない局面は減少しており、殆ど雑音を示さない前記第二の領域に一致する（図4Bに示すように）。具体的には、増幅産物量の増幅効率の変化量に適用するためにモデルを選択するとき結果を改ざんする危険を冒す測定点を取り除く目的で：

- ・一定の増幅産物量の増幅効率の局面に対して、生の値  $E_0$  を見積もりする；および
- ・特に切替の指数値  $C_{EEP}$  を求めるとき、例えば一定の局面  $E_0$  の幾つかの部分（fraction）に対応する、見積もりされた増幅産物量の増幅効率が閾値より低い、雑音がより低い第二の領域における少なくとも幾つかの測定値を採択しない。

【0038】

取り除かれるこれらの点NEG（図4）は、典型的には非常に高い増幅処理の指数値  $n$  に対応する点であり、および実質的に切替領域CHOの周囲で選択される効率値に関するモデルを最早満足しないかもしれない点である。一例として、これらを取り除くために、増幅産物量の増幅効率  $E_0$  が一定の局面、典型的には初期指数値  $n$  に関して、平均を評価する。その後、一定の局面  $E_0$  に関して見いだされる平均の一部分、例えば10%に対応する閾値を選択する。その後、最高の指数値  $n$  から出発して、測定された増幅産物量の増幅効率が前記閾値以下の全ての測定点NEGを取り除く。指数値  $C_{EEP}$  の検出に対して最も有利であるこの段階は、それでもなお増幅産物量の増幅効率  $E_n$  に基づく任意の決定に対して適用でき、および、適切な場合には、別個の保護の主題を構成するであろう。

【0039】

図4Bに示すように、増幅産物量の増幅効率が、増幅産物量の増幅効率が減少して一定ではない局面を示し、および、その局面が、一定である局面に続くとき、切替領域CHOは、雑音がより少ない第二の領域から出発して、指数値の数  $n$  が減少する方向に変化することにより、および増幅産物量の増幅効率が所定の値を通り過ぎる概略指数値 CGを検出することにより、特定される。斯くして、図4Bを参照して、減少する指数値の数  $n$  の方向に進み、切替領域CHOに向かって昇って行き、各指数値の数と関連する増幅産物量の増幅効率が評価される。上述の所定の値より顕著に大きい増幅産物量の増幅効率の第一の測定点に関して、上述の概略指数値 CGが検出されており、その測定点の指数値に対

応すると考えられる。

【0040】

引き続き実施において以下に説明するとおり、各測定点に関して、あたかも、前記設定された点自身が切替の指数値  $C_{EEP}$  に対応するかのよう、その増幅産物量の増幅効率の変化量をモデル化することができる。その実施において、もし一定の増幅産物量の増幅効率の局面  $E_0$  が見積もりされ、および、もし見積もりされた値が上述の所定の値を超えるなら、その点は概略指数値  $C_G$  に対応すると考えられる。

【0041】

一般的に、最大の増幅産物量の増幅効率は1の値を持ち、それ故、上述の所定の値は1に等しいと選択することができる。そうは言っても、これは変化量させることができ、および、例えば、初期反応サイクルにわたって評価された平均の増幅産物量の増幅効率  $E_0$  に対応するように所定の値を設定するために条件を設けることができる。

【0042】

その後、概略指数値  $C_G$  から出発して、増幅処理の指数値の数が増加する方向に進めることにより、および、増幅産物量の増幅効率が上述の所定の値とほぼ等しい増幅処理の指数値を検出することにより、切替領域における増幅処理の指数値  $C_{EEP}$  の値の見積もりを正確化する。その値は有利に少数であってよい。斯くして、再度図4Bを参照して、概略指数値  $C_G$  が決定された後、切替の指数値  $C_{EEP}$  に対する検索を正確化するために、概略指数値  $C_G$  から出発して、および指数値の数  $n$  が増加する方向に向けて、一の全指数値より内容物数が小さい段階で検索が下方へ為され、および、例えば補間により、横軸値が決定され、そこで所定の値が交差する。典型的には、一定の局面の値が1より大きいままである限りは、検索は、数  $n$  が増大する方向に続けられ、および、切替に先行する指数値 ( $C_{EEP} - 1$ ) は、定常値  $E_0$  が1に等しいか、または非常に近いときは直ちに決定される。それが、指数値の一部、例えば1サイクル  $n$  の10%に対応する検索段階内容物数を選択することが適切な理由である。

【0043】

上述の第一の実施において、それぞれ公知の初期個体群の内容物数を有する多数の標準試料が提供され、および、目的試料に対するのと実質的に同じ条件下で、それらに連続した増幅処理が適用される。これらそれぞれの切替の指数値は、上記の段階 a)、b)、および c) に対応して決定される。段階 d) において：

- ・標準試料の初期個体群の内容物数  $N_0^{st}$  とそれらの指数値  $C_{EEP}^{st}$  の間に、従属関係を構築する；および
- ・目的試料に関する指数値  $C_{EEP}$  を決定した後、その従属関係に対する補間により、目的個体群の初期内容物数  $N_0$  を決定する。

【0044】

斯くして、図5を参照して、例えば回帰により、標準の切替サイクル  $C_{EEP}^1$ 、 $C_{EEP}^2$  とそれらの初期濃度  $N_0^1$ 、 $N_0^2$  (実際にはそれらの対数) との間に従属関係を構築できる。目的試料に関する切替の指数値  $C_{EEP}^{int}$  を測定することにより、および、図5の回帰勾配上にその値をプロットすることにより、補間によって目的試料における初期濃度  $N_0^{int}$  が得られる。

【0045】

この第一の実施は、このように、図3を参照して説明した先行技術のそれに非常に似ている。そうは言っても、この第一の実施が従属している切替の指数値  $C_{EEP}$  は、先行技術の閾サイクル  $C_t$  と決して対応しないことを忘れるべきではない。

【0046】

この第一の実施と顕著に異なる取組において：

段階 b) において、増幅処理の連続数の関数としてパラメータ化された変化量を表すために増幅産物量の増幅効率のモデルの使用が為される、前記変化量は、切替の指数値  $C_{EEP}$  を表す少なくとも一のパラメータを用いている；および

段階 c) において、少なくとも切替の指数値  $C_{EEP}$  を表す前記パラメータを、実験

に基づく測定値と比較することにより決定する。

【0047】

第二の実施において、このパラメータ化された変化量は、目的試料中の現行個体群の内容物数  $N_n$  を表す。

【0048】

典型的には、このパラメータ化された変化量は、上に挙げた型の式：

$$N_{n+1} = N_0 \times (1 + E_0)^{C_{EEP}} \times \text{関数}(C_{EEP}, n+1)$$

から導くことができる。

【0049】

斯くして、切替の指数値  $C_{EEP}$  を表すパラメータに加えて、この変化量は、目的試料中の初期個体群の内容物数  $N_0$  を表すパラメータを利用する。

【0050】

その後、この第二の実施の段階 c) および d) において、これら 2 個のパラメータ -  $C_{EEP}$  および  $N_0$  は、実質的に同時に決定される。

【0051】

あらかじめ、段階 a) において、上述した関数、関数  $(C_{EEP}, n+1)$  に関するモデルを決定することが必要である。

【0052】

通常、PCRの定量化に対して、下で遙かに詳細に説明する減少パラメータ を有する、減少する指数関数に対応する、増幅産物量の増幅効率の一定ではない局面に関するモデルが選択される。この減少パラメータ は、次いで、実験に基づく測定値との比較により、少なくとも切替の指数値  $C_{EEP}$  と共に、段階 c) で決定される。

【0053】

斯くして、この第二の実施において、一旦増幅産物量の増幅効率のモデル  $E_n$  が選択されてしまうと、これは、上記の関係により与えられる現行個体群の内容物数  $N_n$  に対する一般式に適用される。これは、現行個体群の内容物数  $N_n$  における変化量に対するモデルが与えられる。

【0054】

そうは言っても、実験に基づく測定値が現行個体群の内容物数  $N_n$  に関する値を直接与えるのでなければ（これは、目下、実際問題としてめったに事実ではない）、上記のように、差し引かれた背景雑音、および引き続き補償 を考慮して、続いて、実験に基づく測定値  $F_n$  それ自身をモデル化することが適切である。

【0055】

斯くして、目下好ましい実施において、上述のパラメータ化された変化量は：

- ・ 実験に基づく測定値を表す；および
- ・ 初期個体群の内容物数を表す測定値  $F_0$  に対応するパラメータを包含する。

【0056】

その後、初期個体群の内容物数の測定値  $F_0$  は、前記パラメータ化された変化量  $F_n$  を実験に基づく測定値と比較することにより決定される。

【0057】

この比較を遂行するために、例えば、生の実験に基づく測定値に適用される統計的な相関関係（典型的には最小二乗法）を用いることにより、測定値  $F_n$  のモデル中のパラメータ  $F_0$ 、 $E_0$ 、 $C_{EEP}$  および減少パラメータ を調整することができる。

【0058】

例えば図 6 A に示すように、初期には、変化量は、適用された PCR サイクルの数の関数として、測定されおよび調整された蛍光量に関して得られる。この図は、核酸、この場合は供給者 BI-RAD（登録商標）由来の I-Cycler IQ（登録商標）装置上で遂行される PCR 反応の間 SYBRGREEN インターカラントによって印を付けた、100,000 コピーの初期量を有する DNA のフラグメントを含有する目的試料に関する増幅処理曲線を示す。

【0059】

説明した例において、増幅処理の反応がリアルタイムのPCR反応であることが理解されるであろう。実験に基づく測定値は、放射された蛍光の量を示す。

【0060】

上述したように、背景雑音に対する調整後のサイクルnの蛍光を、以下、 $F_n$ と記す。第一のサイクルより前の理論的な初期蛍光を $F_0$ と記す。サイクルnにおけるPCRの効率値を $E_n$ と記す。PCR反応の間に遂行されるサイクルの合計数をNと記す。

【0061】

仮定により、PCR反応サイクルの各サイクルnにおいて測定される蛍光は：

【0062】

【化1】

$$F_{n+1} \approx F_n(1+E_n) \quad \text{ここで} \quad n \in \{0, 1, 2, \dots, N-1\} \quad (1)$$

【0063】

により定義される。ここで $0 \leq E_n < 1$ である。

【0064】

各サイクルnにおける反応の効率値は、以下のように計算される：

【0065】

【化2】

$$E_n = \frac{N_{n+1}}{N_n} - 1 \approx \frac{F_{n+1}}{F_n} - 1 \quad \text{ここで} \quad n \in \{0, 1, 2, \dots, N-1\} \quad (2)$$

【0066】

等式(1)は $n=0$ に対して成り立つと仮定されていることに気付くべきである。そうは言っても、定義により、初期蛍光 $F_0$ は公知ではない。それ故、第一のサイクル $E_0$ に対する効率値を、等式(2)に関して直接計算することはできない。

【0067】

図6Bは、等式(2)で近似され、および図6Aの蛍光における調整された変化量に基づくPCR反応の効率値を、サイクル数nの関数として示す。

【0068】

以下の仮定が好ましく為される：

- ・反応の効率値は、初期サイクルの間、比較的一定である；および
- ・ある数のサイクルが遂行された後、反応の効率値は減少する。

【0069】

図6Bは第二の仮定を裏付けている。効率値はサイクル $n=17$ から減少していることが見られるからである。しかしながら、サイクル1から16における測定された効率値は非常に雑音が多く、これは、グラフ的に第一の仮定を証明することを困難にしている。

【0070】

そうは言っても、効率値の変化量は：

- ・第一のPCRサイクルと、 $C_{E E P}$ と書かれる切替サイクルに先立つサイクル( $C_{E E P} - 1$ )との間で一定である第一の局面；および
- ・サイクル( $C_{E E P} - 1$ )以上の数のサイクルに対してそれが減少する第二の局面

を包含する型のモデルに従うと仮定することが好ましい。

【0071】

斯くして、サイクル( $C_{E E P} - 1$ )は効率値が一定であり続ける最後のサイクル(これは部分(fraction)であってよい)を表す。

【0072】

次いで、反応の効率値を以下のようにモデル化することを提案する：

【0073】

【化3】

$$E_n = \begin{cases} E_0 & \text{ここで } 0 \leq n \leq (C_{EEP} - 1) \\ (1 + E_0)^{\exp(-\beta(n - C_{EEP} + 1))} - 1 & \text{ここで } (C_{EEP} - 1) \leq n \leq (N - 1) \end{cases} \quad (3)$$

【0074】

ここで  $E_0$  および  $\beta$  は、下に示すように、図6Aの増幅処理曲線を用いて、または図6Bの効率曲線を用いて見積もりされる実数のパラメータである。

【0075】

変形においては、例えば下に与えられたモデルF1からF3から、特に、定量化すべき核酸の型に依存して、何らかの他の選択が好ましい可能性がある。

$$F1: E_n = \exp(-\mu(n - C_{EEP} + 1)) - 1$$

$$F2: E_n = \exp(-\mu(n - C_{EEP} + 1)) - 1$$

$$F3: E_n = \exp(-\mu(n - C_{EEP} + 1)) - 1$$

【0076】

好ましくは、幾つかの候補の切替サイクル  $C_{EEP}$  に関して、段階  $c$  ) において幾つかの組のパラメータが見積もりされ、および各切替サイクル  $C_{EEP}$  に関して、関連したパラメータが、段階  $c$  ) において保証できる統計的な相関関係を最大にする、最小の候補サイクルが選択される。

【0077】

上記したように、式(1)は、

【0078】

【化4】

$$F_n = F_0 \prod_{k=0}^{n-1} (1 + E_k) \quad \text{ここで } n \in \{1, 2, \dots, N\} \quad (4)$$

【0079】

の形に書くことも可能である。

【0080】

このように、効率値に関する式(3)を式(4)に導入することにより、調整された放出された蛍光  $F_n$  に関して、4個のパラメータ ( $F_0$ 、 $E_0$ 、 $\beta$ 、 $C_{EEP}$ ) を有する新しいモデルが得られる：

【0081】

【化5】

$$F_n = \begin{cases} F_0 (1 + E_0)^n & \text{ここで } 1 \leq n \leq C_{EEP} \\ F_0 (1 + E_0)^{C_{EEP} + \frac{1 - \exp(-\beta(n - C_{EEP}))}{\exp(\beta) - 1}} & \text{ここで } C_{EEP} \leq n \leq N \end{cases} \quad (5)$$

【0082】

目的個体群の初期内容物数  $N_0$ 、 $n = 0$  の反応の効率値  $E_0$ 、パラメータ  $\beta$ 、および切替サイクル  $C_{EEP}$  は、切替サイクル  $C_{EEP}$  と等しい最小サイクル値に対して得られる統計的な相関最大を見いだすために、切替領域  $CHO$  付近におけるいくつかのサイクル値に対して繰り返し評価される。

【0083】

この第二の実施において、測定されおよび調整された蛍光の量における変化量を、効率値のモデルまたは変化量に基づくサイクル数の関数としてモデル化し、その後、直接、測定されおよび調整された蛍光の量に対して相関を行うことが好ましい。

【0084】

背景雑音に対して、測定された放出された蛍光を調整することにより、初期の蛍光  $F_0$  に対しても人為的な調整が為されることに気付くべきである。斯くして、調整された蛍光の測定値から導出される効率値の測定値に基づいて効率値のモデルのパラメータを見積も

りすることは、追加の誤差源を構成し、第三の実施に関して下に記載したような2つの局面に進むことが好ましいかもしれない。

【0085】

そうは言っても、説明した第二の実施は、より単純であり、および蛍光の測定値を用いるPCR定量化に良く適合する。それは、測定に対する補償と共に背景雑音におけるドリフトに対して調整された蛍光の測定値に対応する、 $F'_n$ の実際の測定値に基づく。一旦背景雑音が差し引かれると、我々は以下の型の関係を有する：

$$F'_n = F_n +$$

ここで、 $\varepsilon$  はサイクル数  $n$  に依存してもしなくてもよい量である。一定と選択されるのが好ましい。

【0086】

このような環境下、サイクル  $n$  に対して  $E'_n$  と書かれる、測定されおよび「調整された」効率値 は：

【0087】

【化6】

$$E'_n = \frac{F'_{n+1}}{F'_n} - 1 = \frac{F'_{n+1} + \varepsilon}{F_n + \varepsilon} - 1 \quad \text{ここで } n \in \{1, 2, \dots, N-1\} \quad (7)$$

【0088】

で定義される。

【0089】

上の関係(5)のモデルは、斯くして：

【0090】

【化7】

$$F'_n = \begin{cases} F'_0(1+E'_0)^n & \text{ここで } 1 \leq n \leq C_{EEP} \\ F'_0(1+E'_0)^{C_{EEP} + \frac{1-\exp(-\beta'(n-C_{EEP}))}{\exp(\beta')-1}} & \text{ここで } C_{EEP} \leq n \leq N \end{cases} \quad (8)$$

【0091】

となる。

【0092】

このような環境の下、効率値  $E'_n$  は、効率値が減少している局面の間に最小の許容できる効率値閾を設定できるように、測定値から実験的に近似される。閾サイクルはどのように決定され、それを超えては、調整された蛍光の測定値はこのモデルの目的には用いられない(図4B中の点NEG)。典型的には、閾サイクルは、効率値が減少している局面において、効率値がある最小の受容できる効率値閾(例えば、 $0.1E_0$ )より下に落ちる、最初のサイクルに対応する。

【0093】

さらに一般的には、効率値閾の値は、好ましくは0から0.5の範囲にあり、およびこの閾より下の効率値を有するPCRは、制御されていない抑制現象により、潜在的にバイアスをかけられている。

【0094】

図7に示した例において、効率値に対する閾値は0.02に設定された(即ち、 $E_0$ の2%)。閾サイクル $C_s$ は、サイクル $n=36$ に対応した。図7は、放出された蛍光の調整された測定値を示す。サイクル $n=36$ まで、これらの実験に基づく測定値(「 $\square$ 」で印をつけた)に対してモデル(連続線)と満足できる相関があることが判る。図8も、測定されおよび調整された蛍光に基づくモデルを用いて図7から得られた予言的な効率値に対して実験に基づく測定値と良好な相関を示す。

【0095】

この実施の主な段階は、図9を参照して、以下のように要約できる。

## 【0096】

図6Aに示すように、開始段階70において、蛍光の量に関する測定値は、サイクル数  $n$  の関数として得られ、および背景雑音に対して調整されている。

## 【0097】

段階71において、サイクル  $n$  における反応の効率値に関する近似は、サイクル  $n = 1, 2, \dots, (N - 1)$  の各々に関して上記の式(2)を用いて計算される。

## 【0098】

段階72において、最小サイクル  $C_s$  が決定され、これに関して以下の2つの条件が満たされる：

- ・サイクル  $C_s$  は効率値が減少している局面中にある；および
- ・閾サイクルの効率値は、閾効率値  $E_s$  (例えば、 $E_s = 0.1 E_0$ ) より小さい：  
 $E_{C_s} > E_s$

## 【0099】

効率値が  $E_s$  未満の点NEGを取り除くことは既に可能である。

## 【0100】

段階73において、補償  $\beta = F'_0$  により与えられると仮定している式(8)を用い、サイクル範囲  $C_{EEP} = (C_s - 5)$  から  $C_s$  にわたって効率値が減少している調整され、放出された蛍光の曲線に関して、モデルが形成される：

## 【0101】

## 【化8】

$$F_n = F'_0 (1 + E'_0)^{C_{EEP} + \frac{1 - \exp(-\beta(n - C_{EEP}))}{\exp(\beta) - 1}} - F'_0$$

## 【0102】

その後、値  $E'_0$  に関して見積もられた値

## 【化9】

$$\hat{E}'_0$$

、および切替サイクル  $C_{EEP}$  に関する値の段階75における減少に対する試験74は、段階の内容物数  $P$  (これは1に等しくてよい)を用いて、および

## 【化10】

$$\hat{E}'_0$$

の値が1未満でありさえすれば繰り返し段階73において、 $C_{EEP}$  の予期された値を見つけ出そうと努める。

## 【0103】

その後、見積もりされる効率値が値1を超えるととき(試験74から立ち去る際の矢印  $n$ )、指数値  $C_{EEP}$  の値は、段階76において、内容物数  $h$  の段階(一単位より小さい部分であってよい)だけ増やされ、および段階77において、蛍光  $F_n$  は、段階73におけるのと同じやり方でモデル化される。段階78において、見積もられた効率値

## 【化11】

$$\hat{E}'_0$$

が1以上である限りは、段階76から78が繰り返される。見積もられた効率値が1未満

の値を取るときは、見積もりされたパラメータ

【化 1 2】

$$(\hat{F}'_0, \hat{E}'_0, \hat{\beta}'_0, \hat{C}_{EEP})$$

は、最終段階 7 9 において保存される。

【0 1 0 4】

この段階において、値

【化 1 3】

$$\hat{F}'_0$$

が最終的に得られ、これだけが目的試料中の初期個体群の内容物数  $N_0$  を表す。目的試料中の初期個体群の内容物数  $N_0$  を段階 8 0 において決定するように、次いで、公知の個体群の内容物数  $N_{0st}$  を有する少なくとも一の標準試料を用いることができる。

【0 1 0 5】

この目的のために、公知の標準試料中の初期個体群  $N_{0st}$  における初期個体群の内容物数の測定値  $F_{0st}$  が得られる。その後、標準試料に関する測定値とその公知の初期個体群の内容物数 の間の比例関係を導出すること、およびその関係を、実際の初期個体群の内容物数  $N_0$  を得るための測定値  $F'_0$  に適用することにより、目的試料中の初期個体群の内容物数  $N_0$  の値を得る。

【0 1 0 6】

言い換えると、図 9 の段階 8 0 において、標準  $N_{0st}$  中の初期個体群の内容物数、並びに蛍光モデルを調整することにより補償されおよび見積もりされた補正された蛍光の比は、目的試料および標準試料の両方に適用されることを暗示する、型：

【0 1 0 7】

【化 1 4】

$$N_0 = \hat{F}'_0 \left( N_{0st} / \hat{F}'_{0st} \right)$$

【0 1 0 8】

の単純な比例関係を適用して、目的試料中の初期個体群の内容物数 の値  $N_0$  を決定することができる。

【0 1 0 9】

斯くして、目的試料における目的個体群の初期内容物数を決定するために、たった一つの標準で十分であるに違いないことが理解されると思われ、これは、本発明により提供される利点である。

【0 1 1 0】

そうは言っても、変形においては、および必要な場合は、公知の初期個体群の内容物数  $N_{0st}$  を有する多数の標準試料中の初期個体群の内容物数

【化 1 5】

$$\hat{F}'_{0st}$$

に関するそれぞれの測定値を得るために、対策がなされるであろう。その後、標準試料の初期個体群の内容物数  $N_{0st}$  とそれらの初期個体群の内容物数に関するそれぞれの測定値

【化 1 6】

$$\hat{F}'_{Ost}$$

の間に、従属関係が確立される。その後、目的試料の初期個体群の内容物数

【化 1 7】

$$\hat{F}'_0$$

に関する測定値を見いだした後、目的の実際の初期個体群の内容物数  $N_0$  を、従属関係を用いて補間により決定する。この従属関係も典型的には図 5 に示す型の回帰であり得るが、しかし、切替の指数値  $C_{E E P}$  に関する値をプロットする代わりに、縦軸にプロットされた、標準および目的試料の初期蛍光値

【化 1 8】

$$\hat{F}'_{Ost}$$

および

【化 1 9】

$$\hat{F}'_0$$

(またはそれぞれの対数值) を有することが理解されるであろう。

【0 1 1 1】

一旦以上の標準を利用すると、それぞれ公知の初期個体群の内容物数  $N_{0st}$  を有する一以上の標準試料に対する対策がなされ、目的試料に関するのと実質的に同じ条件下で、連続した増幅処理の反応が適用される。その後、目的試料について、パラメータ化された変化量を実験に基づく測定値と比較することにより、これら初期個体群の内容物数に関する測定値

【化 2 0】

$$\hat{F}'_{Ost}$$

を決定する。

【0 1 1 2】

言い換えると、標準に対するおよび目的試料の両方に対する、測定されおよび調整された蛍光に関して、当然ながら、同じ計算が適用される。上で説明したとおり、第一のサイクルの前の蛍光の量

【化 2 1】

$$\hat{F}'_{Ost}$$

は、目的試料に関する

## 【化 2 2】

$$\hat{F}'_0$$

を決定するために用いられるのと同じ方法を用いて、標準に関して見積もりされる。

## 【0 1 1 3】

上記の第二の実施の変形に対応する第三の実施は、全体として、効率値  $E_n$  に関するモデルを実験に基づく測定値に対して調整すること、および、引き続き、前記調整された効率値のモデルを現行個体群の内容物数  $N_n$  に関するモデル、または測定値  $F_n$  に関するモデルに投入する点にある。この第三の実施は、以下のように要約できる。

## 【0 1 1 4】

段階 b) で構築されたパラメータ化された変化量は、増幅産物量の増幅効率を表し、および段階 c) において、パラメータ化された変化量を実験に基づく変化量と比較するため、実験に基づく測定値に基づいて、増幅産物量の増幅効率の実験に基づく変化量が決定される。その後、初期個体群の内容物数  $N_0$  を表すパラメータを得るために、段階 d) において以下の段階が実行される：

d 1) 少なくとも切替の指数値  $C_{E E P}$  を表すパラメータを利用して、目的試料中の現行個体群の内容物数  $N_n$  を表す第二のパラメータ化された変化量を、および初期個体群の内容物数  $N_0$  を表すパラメータを決定すること；

d 2) 段階 c) で決定された切替の指数値  $C_{E E P}$  に関するパラメータ化された値を、前記第二の変化量に適用すること；および

d 3) 前記第二の変化量を実験に基づく測定値と直接比較することにより、少なくとも初期個体群の内容物数  $N_0$  を表すパラメータを調整すること。

## 【0 1 1 5】

有利に、以下が実行される：

- ・段階 d 2) において、切替の指数値  $C_{E E P}$  に関する概略値を、上記図 4 B を参照してそれを検出するために説明したのと同じやり方で、適用すること；および

- ・段階 d 3) において、その後、初期個体群の内容物数  $N_0$  を表すパラメータを調整することと共に、指数値を正確化すること。

## 【0 1 1 6】

最後に、目下好ましい図 7 および 8 の第二の実施は、効率値に対する相関を実行するための試みを為しているのではなく、正確なおよび補償された蛍光の見積もりをモデル化しおよび正確化するために、単に効率値変化量に関する数学的モデルを利用しているという事実により、この第三の実施とは異なることを理解すべきである。

## 【0 1 1 7】

当然ながら、本発明は、例として上で説明した態様に限定はされず、他の変形にまで及ぶ。

## 【0 1 1 8】

斯くして、本発明は、相対的な定量化、特に PCR による、にも適用できることが理解されるであろう。この適用において、目的個体群を増幅処理することと共に、参照個体群も同じ媒体中で同時に、または別個に増幅処理される。測定値は、以下のように選ばれる：

- ・目的個体群の内容物数を表す実験に基づく測定値；および
- ・参照個体群の内容物数を表す実験に基づく測定値。

## 【0 1 1 9】

この方法は、段階 a)、b)、および c) を参照個体群に適用することにより継続することができ、他方、段階 d) は、単に、目的個体群および参照個体群のそれぞれの初期内容物数の間の比を決定することにある。

## 【0 1 2 0】

相対的定量化は、生命体の発展の間における目的遺伝子の発現を分析するために用いることができる。異なる時間に生命体から採取した試料の間の、特に量的および質的変化量を矯正するために、目的標的遺伝子を分析することに加えて、発展の間に安定なままである、ある水準の発現を有していることが公知の参照遺伝子も分析される。

【0121】

最終段階は、次に、採取されている種々の試料の間の比

【0122】

【化23】

$$\frac{N_{0\text{標的}}}{N_{0\text{参照}}}$$

【0123】

を比較することにある。

【0124】

所望の結果を達成するために、2つの方策が可能である。

【0125】

先行技術の方策は閾サイクル Ctを検出することに基づき、それは、通常以下のように行われる。異なる瞬間  $t_0$ 、 $t_1$ 、 $t_2$ 、 $\dots$ 、 $t_n$  において採取された各試料に関して、少なくとも一の標準（即ち、 $N_{0\text{標的}}$  および  $N_{0\text{参照}}$  が公知の標準）を利用して、比

【0126】

【化24】

$$\frac{N_{0\text{標的}}}{N_{0\text{参照}}}$$

【0127】

を決定する。これは、後に比を計算することが続く、2つの連続的な絶対的定量化を行うということに等しい。

【0128】

本発明の状況の中で特に有利な別の方策は、異なる瞬間  $t_0$ 、 $t_1$ 、 $t_2$ 、 $\dots$ 、 $t_n$  において採取された各試料に関して、比：

【0129】

【化25】

$$\frac{\left( \frac{N_{0\text{標的}}}{N_{0\text{参照}}} \right)_{\text{試料}}}{\left( \frac{N_{0\text{標的}}}{N_{0\text{参照}}} \right)_{\text{試料}_{t0}}}$$

【0130】

を、以下の式：

【0131】

【化26】

$$\frac{\left( \frac{N_{0\text{標的}}}{N_{0\text{参照}}} \right)_{\text{試料}}}{\left( \frac{N_{0\text{標的}}}{N_{0\text{参照}}} \right)_{\text{試料}_{t0}}} = \frac{\frac{(E_{0\text{標的}})_{\text{試料}}}{(E_{0\text{標的}})_{\text{試料}_{t0}}}}{\frac{(E_{0\text{参照}})_{\text{試料}}}{(E_{0\text{参照}})_{\text{試料}_{t0}}}}$$

【0132】

を用いることにより、直接決定することにある。

## 【0133】

本発明の技術と組合せて、結局パラメータ $F_0$ だけを利用するこの第二の実施において、標準試料は必要とされず、これは特に有利である。

## 【0134】

ここで、本発明の方法を実施するための設備を示す図10を参照する。それは、この場合、目的試料ECHを含有する窪み、および、例えば、Stと参照される標準試料を含有する窪みを含む、支持体SUPPを含む。支持体SUPPは、例えば、標準および目的試料にPCR反応を適用するための加熱手段（図示せず）が取り付けられた、囲いENCの中に囲われている。

## 【0135】

説明した例において、標準Stおよび目的試料ECHの両者により、各サイクルにおいて放出される蛍光の量を測定するための対策がなされることが好ましい。この目的のため、窪みの中に選択された試薬を挿入し、並びに、適用される各PCRサイクルにおいて、目的試料および標準試料由来のそれぞれの蛍光の量を測定するために、試料をランプ（例えば、ハロゲン-タングステンランプ）により照射する。更に、蛍光検出装置は、例えば、蛍光由来の光を収集するための対物レンズ11、並びに、目的試料からのおよび標準からの、各PCRサイクルにおける放出された蛍光を測定するため、フォトン計数手段10、例えば電荷結合素子(CCD)カメラおよび/または光電子増倍管を含む。斯くして、各窪みにより放出された蛍光は、レンズ11により有利に集められ、次いで、好ましくは、コンピュータの中央ユニット20に設置された、例えばPersonal Computer Memory Card International Association (PCMCIA)型の収集カード21に接続されたCCDカメラ10により検出される。

## 【0136】

コンピュータを、次いで、上述の測定手段10に接続し、それから各PCRサイクルに関して検出された蛍光の測定量を表す信号を受け取り、および、第一のサイクルに先立つ目的個体群に関する初期内容物数を決定するために、本発明の方法を実施することにより、これらの信号を処理する。

## 【0137】

典型的には、プロセッサユニットは以下を含む：

- ・測定手段10に接続された収集カード21；
- ・上述の信号の一時的貯蔵及び処理用のワーキングメモリ25（例えば、ランダムアクセスメモリ(RAM)型の）；
- ・本発明の意味におけるコンピュータプログラム製品を貯蔵するための、および、処理されて、例えばその後の診断に、使用する用意ができていたデータを貯蔵するための永久メモリ24；
- ・適切な場合には、当初コンピュータプログラム製品を携行してよい、例えばCD-ROMのような記憶媒体の読取機22；
- ・場合により、近くのまたは遠方の場所と通信するための、例えば、患者から遠く離れて診断を可能にするために、処理データを通信するための通信用インターフェイス26（連結部28）；
- ・典型的にはディスプレイスクリーン30に接続されたグラフィックインターフェイス27；および
- ・機材のこれら種々の品目間の相互作用を管理するためのプロセッサ23。

## 【0138】

コンピュータは、中央ユニット20に接続されたキーボード41および/またはマウス42等の入力部材を有してもよい。

## 【0139】

そうは言っても、本発明の意味において、設備は：

- ・少なくとも目的試料用の、試料支持体SUPP；
- ・少なくとも目的試料中の目的個体群に前記連続した増幅処理の反応を適用するため

の第一の装置 E N C ;

- ・ 目的个体群の現行の内容物数を表す測定値を得るための第二の装置 1 0 ; および
- ・ 第二の装置 1 0 から測定信号を受け取るために、および本発明の方法の、全部のまたはいずれかの段階を実施するために適するコンピュータ手段 2 0 、

を全体として含むことを理解すべきである。

【 0 1 4 0 】

この目的のため、コンピュータ手段を制御するためにコンピュータプログラム製品を用いることができる。プログラムは、プロセッサユニット 2 0 のメモリ中に、またはプロセッサユニットの読取機と協働するのに適する取り外しできるメモリ媒体 ( C D - R O M 等 ) 上に貯蔵されてよい。本発明の意味におけるコンピュータプログラムは、ひいては、本発明の方法の、全てのまたはいずれかの段階を実施するための指示を含有する。例えば、プログラムのアルゴリズムは、図 9 の線図と同等のフローチャートで表されてよい。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 4 1 】

発明の他の利点及び特徴は、以下の、図を伴う実施例による実施の詳細な記載から見てとれる。

【 図 1 】 図 1 は先行技術に関連し、および、上述したように、蛍光の測定量における変化量を、P C R サイクル数の関数として示す。

【 図 2 】 先行技術に関連し、および、上述したように、P C R サイクル数の関数としての、放出される蛍光の増加している量を表わす例である。

【 図 3 】 先行技術で公知であり、また上述した方法を用いた、目的試料中の、目的个体群の初期の量を決定するための補間方法を示す。

【 図 4 A 】 上述の実験に基づく測定値における変化量を、目的試料に適用された増幅処理の連続数の関数として示す線図である。

【 図 4 B 】 実験に基づく測定値から得られた、増幅処理の反応の増幅産物量の増幅効率における変化量を、目的試料に適用された増幅処理の連続数の関数として示す線図である。

【 図 5 】 第一の実施で用いられる、一定の局面と一定でない局面の間の切替で起こる増幅産物量の増幅効率切替の指数値と、標準試料および目的試料に関する初期个体群の対数の間の、回帰関係をプロットする。

【 図 6 A 】 その測定値に特有の背景雑音を考慮して調整され、および P C R 反応サイクルの数 n の関数としてプロットされた後の、蛍光の測定量における典型的な変化量を示す。

【 図 6 B 】 図 6 A に示した P C R の効率値における変化量を、サイクルの数 n の関数として示す。

【 図 7 】 図 6 A に示した放出される蛍光における実験に基づく変化量と、第二の実施において効率値のモデルを包含することにより得られる放出される蛍光モデルを適用して得られる結果を比較する。

【 図 8 】 図 6 B の効率値における変化量と、図 7 の放出される蛍光モデルから導出される効率値のモデルの適用の比較である。

【 図 9 】 本発明の提案された実施における方法中の主な段階を概説する流れ図である。

【 図 1 0 】 目的試料の初期个体群を定量化するための設備の図解である。