

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年3月10日(10.03.2022)



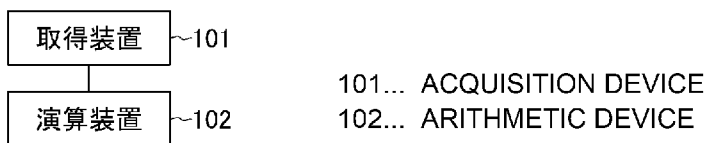
(10) 国際公開番号
WO 2022/049620 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/41 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/033032
- (22) 国際出願日: 2020年9月1日(01.09.2020)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 日本電信電話株式会社 (NIPPON TELEGRAPH AND TELEPHONE CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008116 東京都千代田区大手町一丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 井上 鈴代(INOUE, Suzuyo); 〒1808585 東京都武蔵野市緑町3丁目9-11 NTT 知的財産センタ内 Tokyo (JP). 岩崎 弦(IWASAKI, Yuzuru); 〒1808585 東京都武蔵野市緑町3丁目9-11 NTT 知的財産センタ内 Tokyo (JP). 瀬山 倫子(SEYAMA, Michiko); 〒1808585 東京都武蔵野市緑町3丁目9-11 NTT 知的財産センタ内 Tokyo (JP). 深田 健太(FUKADA, Kenta); 〒1808585 東京都武蔵野市緑町3丁目9-11 NTT 知的財産センタ内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 山川 茂樹, 外(YAMAKAWA, Shigeki et al.); 〒1006104 東京都千代田区永田町2丁目11番1号 山王パークタワー4階 山川国際特許事務所内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,

(54) Title: CALIBRATION SYSTEM AND METHOD

(54) 発明の名称: 検量システムおよび方法

[図1]



(57) Abstract: An acquisition device (101) acquires peak-like shape data that is measured via a measurement method in which obtained as the measurement result is waveform data having a peak indicating a feature of a measurement target. An arithmetic device (102) reconstructs peak-like shape data using some of a plurality of bases obtained by performing Karhunen-Loeve transformation on peak-like shape data. The arithmetic device (102) reconstructs peak-like shape data using a first base, second base, third base, and fourth base obtained by performing Karhunen-Loeve transformation on peak-like shape data.

(57) 要約: 取得装置(101)は、測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データが得られる測定方法で測定されたピーク様形状データを取得する。演算装置(102)は、ピーク様形状データをカルーネンレーベ変換することで得られた複数の基底の中の一部を用いてピーク様形状データを再構築する。演算装置(102)は、ピーク様形状データをカルーネンレーベ変換することで得られた、第1基底、第2基底、第3基底、および第4基底を用いてピーク様形状データを再構築する。

WO 2022/049620 A1

SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称： 検量システムおよび方法

技術分野

[0001] 本発明は、測定により得られる測定対象の特徴を示すピークを有する波形データを再構築する検量システムおよび方法に関する。

背景技術

[0002] 測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データの、ピーク形状の認識とその位置や高さを基準として用いる検量は、頻繁に用いられている。例えば、クロマトグラフィーにより分子量の決定や対象分子の濃度を求める場合には、測定によって得られた波形データにおけるピークの位置、ピークの大きさなどから特徴量を計算し、測定対象の分子量や濃度を算出する。

[0003] また、共焦点顕微鏡では、得られた波形データより、物体からの散乱光が投影面で最も明るくなる対物距離に関するピークを求め、サンプルの厚さを測定する。また、蛍光共鳴エネルギー移動法（FRET）では、得られた蛍光スペクトルのピーク位置で示される波長シフトから分子間の距離を評価する。また、表面プラズモン共鳴法では、反射強度の入射角度依存性を求め、求めた入射角度依存性のプロファイル（波形データ）から屈折率を求める。これらの処理では、ピーク様形状の波形データから、ピークの位置や高さを計算し、測定値に変換する。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：工藤 恵栄 著、「分光の基礎と方法」、オーム社、1985年出版。

非特許文献2：K. Kurihara et al., "Asymmetric SPR sensor response curve-fitting equation for the accurate determination of SPR resonance angle", Sensors and Actuators B, vol. 86, pp. 49-57, 2002.

非特許文献3 : K. Johansen et al., "Surface plasmon resonance: instrumental resolution using photo diode arrays", Measurement Science Technology, vol. 11, pp. 1630-1638, 2000.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] ところで、ノイズは、静止画像や動画であれば、撮像デバイスそのものより発生するノイズを主として規定される。一方で、上述したような、実際にサンプルを測定する化学的あるいは生化学的分析においては、測定装置そのものが発生するノイズ以外のノイズ成分の割合が高くなる。
- [0006] 上述した測定において、実際に測定される波形にノイズが含まれていると、その信号を処理して得た測定値もノイズを含むため、測定毎に異なった値が得られる。さらに、測定対象が時間的に変化する場合は、被測定値の真の値の変動を、ノイズの中から分離する必要がある。例えば、多数回測定して平均値を求めることによって、ノイズを抑制することができる。しかしながら、平均化に使える時間すなわちデータ点数は、時間分解能を平均に用いた時間幅に制限され、ノイズ抑制にも限界がある。
- [0007] 一般に、ピーク形状から、ピーク位置やピーク高さの計算において、ピーク形状を表すモデル関数が既知の場合には、既知のモデル関数に最小二乗法などで最適化することによって、モデル関数のパラメーターを求めることができる。モデル関数が完全な場合には、モデル関数と測定値との残差は、ピークを構成する形状に無関係に正規分布する。
- [0008] ところが、実際に物質を利用する物理的、化学的な測定を行う場合は、測定系を完全に記述できるモデル関数が得られないことが多い。また、モデル関数を記述するパラメーターが線形でない場合には、代数式で一意にパラメーターを求めることができず、繰り返し式を計算することによって、適当な精度で経験的なパラメーターを求めることになる。
- [0009] また、パラメーター間に相互作用がある場合、別途、測定系に依存する制約条件を課して、モデル関数を最適化する必要がある。このように、物理的

、化学的な測定においてモデル関数を使う場合には、パラメータを決定するために、事前確率を設定する必要がある。

[0010] しかしながら、事前確率の設定には、得られたデータに関する知識を数式化するなどの作業が必要であり、適切な設定には、しばしば時間や作業項数の点から困難が伴う。また、同じ測定データであっても、適用される事前確率によって推定値が変わってしまう問題がある。

[0011] 表面プラズモン共鳴（SPR）法では、実際に物質の存在の有無によって反射率の変化を求める。そのシグナルについては、p偏光反射率の入射角依存性をフレネル多層膜反射の式をつかったモデル化が知られている（非特許文献1）。また、5個のパラメータを使って近似する方法が提案されている（非特許文献2）。いずれの場合でも、非線形の最適化を行う必要があり、パラメータを一意に決定することはできず、求めるパラメータは最適化の計算方法に依存する。

[0012] パラメータの数を削減し、2次の（多項式）曲線でピーク位置を近似した場合には、最小二乗法によりパラメータを一意に決定できるが、残差は均一ではなく、パラメータの推定値の時間変動のノイズは大きくなる。これを防ぐために、推定区間をピーク周辺に限定し、時間的にピークの位置が移動するにつれて、推定区間を移動する方法が提案されている（非特許文献3）。この方法は、事前確率の設定の一つである。しかしながら、この方法においても、推定区間の切り替えが起こる前後で、推定値が不連続に変化する場合がある。

[0013] アレイ型受光素子で受光する一般的な構成の装置を用いた測定では、推定区間の移動は、物理的性質の異なる受光素子からのデータを処理することになる。この場合、複数の受光素子の各々の間の量子効率の違いのために、ピーク位置の変化が推定区間の幅に比較して小さいとき、パラメータの不連続な変化が顕著になる。ピーク位置の変化が推定区間の幅に比較して小さい状態は、屈折率の変化が小さいか、変化が遅い場合である。

[0014] ピーク位置だけの推定では、パラメータをさらに削減し、図形的重心を

求める方法が知られている。この方法では、ピークの高さ以下のしきい値を決め、しきい値以上のピーク部分を重みとするピーク位置の平均を計算する。この方法では、ピークの高さに関する情報を無視するが、ピークの位置を単純な計算で一意に決定できる。しかし、しきい値はデータのノイズレベルや装置の物理的構成を勘案して別途経験的に算出する必要がある。

[0015] 以上に説明したように、従来の技術では、測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データを用いる測定において、ノイズが少なく時間分解能が高い測定が容易に実施できないという問題があった。

[0016] 本発明は、以上のような問題点を解消するためになされたものであり、測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データを用いる測定において、ノイズが少なく時間分解能が高い測定が容易に実施できるようにすることを目的とする。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明に係る検量システムは、測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データが得られる測定方法で測定されたピーク様形状データを取得する取得装置と、ピーク様形状データをカルーネンレーベ変換することで得られた複数の基底の中の一部を用いてピーク様形状データを再構築する演算装置とを備える。

[0018] また、本発明に係る検量システム方法は、測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データが得られる測定方法で測定されたピーク様形状データを取得する第1ステップと、ピーク様形状データをカルーネンレーベ変換することで得られた複数の基底の中の一部を用いてピーク様形状データを再構築する第2ステップとを備える。

発明の効果

[0019] 以上説明したように、本発明によれば、ピーク様形状データをカルーネンレーベ変換するので、測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データを用いる測定において、ノイズが少なく時間分解能が高い測定が容易に実施できる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図 1 は、本発明の実施の形態に係る検量システムの構成を示す構成図である。

[図2]図 2 は、本発明の実施の形態に係る検量方法を説明するためのフローチャートである。

[図3]図 3 は、実験 1 に用いた測定システムの測定チップ 200 の構成を示す断面図である。

[図4]図 4 は、実験 1 に用いた測定システムの構成を示す構成図である。

[図5A]図 5 A は、実験 1 に用いた測定システムで測定された、特定の時間での p 偏光反射率を示すデータである。

[図5B]図 5 B は、実験 1 に用いた測定システムで測定された、特定の位置での p 偏光反射率の様に p 偏光の反射率を示すデータである。

[図5C]図 5 C は、実験 1 に用いた測定システムによる測定結果を、ピーク位置付近で 2 次の曲線に当てはめて、当てはめた 2 次の曲線の極値を与える入射角度位置を得る方法で計算した SPR 角度を示す特性図である。

[図6]図 6 は、SPR 装置で得られる画像の例を示す説明図である。

[図7A]図 7 A は、SPR 角度の時間変化を、2 次最小二乗法、図形的重心、KL 変換による計算法で比較した結果を示す特性図である。

[図7B]図 7 B は、SPR 角度の標準偏差を、2 次最小二乗法、図形的重心、KL 変換による計算法で比較した結果を示す特性図である。

[図8]図 8 は、実験 2 における測定結果を、2 次最小二乗法、図形的重心法による計算の結果と KL 変換により計算した結果とを示す特性図である。

[図9]図 9 は、実験 3 で用いたフローセル 300 の構成を示す斜視図である。

[図10A]図 10 A は、実験 3 における測定における送液のイベント毎の応答値の変化を示す特性図である。

[図10B]図 10 B は、実験 3 における測定における送液のイベント毎の応答値の変化を示す特性図である。

[図11]図 11 は、実験 3 における測定の結果から抽出された、濃度によるピ

一様形状の変化を示す特性図である。

[図12A]図12Aは、電気化学SPR測定における、観測されるSPRカーブの酸化還元状態に応じた複雑なp偏光反射率の例を示す特性図である。

[図12B]図12Bは、実験4における電気化学SPR測定を説明する説明図である。

[図13]図13は、実験4における電気化学SPR測定の手順を示す説明図である。

[図14]図14は、実験4における電気化学SPR測定で得られたSPR応答値に示される時間変化率を元に、グルタミン酸濃度とSPR応答値の時間変化速度をプロットして得られた検量線である。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、本発明の実施の形態に係る検量システムについて図1を参照して説明する。この検量システムは、取得装置101および演算装置102を備える。

[0022] 取得装置101は、測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データが得られる測定方法で測定されたピーク形状データを取得する。取得装置101は、測定対象の定量および定性をするための測定結果として、測定対象の特徴として定量情報（濃度）および定性情報（物性、物質名など）の少なくとも1つが示されるピークを有する波形データが得られる測定方法で測定されたピーク形状データを取得する。取得装置101は、測定対象の測定を実施する装置（分析装置）とすることができる。

[0023] 演算装置102は、ピーク形状データをカルーネンレーベ変換することで得られた複数の基底の中の一部を用いてピーク形状データを再構築する。演算装置102は、ピーク形状データをカルーネンレーベ変換することで得られた、第1基底、第2基底、第3基底、および第4基底を用いてピーク形状データを再構築する。

[0024] 次に、本発明の実施の形態に係る検量方法について、図2を参照して説明する。まず、第1ステップS101で、測定結果として測定対象の特徴を示

すピークを有する波形データが得られる測定方法で測定されたピーク様形状データを取得する。第1ステップS101では、測定対象の定量および定性をするための測定結果として、測定対象の特徴として定量情報および定性情報の少なくとも1つが示されるピークを有する波形データが得られる測定方法で測定されたピーク様形状データを取得する。

[0025] 次に、第2ステップS102で、ピーク様形状データをカルーネンレーベ変換することで得られた複数の基底の中の一部を用いてピーク様形状データを再構築する。第2ステップS102では、ピーク様形状データをカルーネンレーベ変換することで得られた、第1基底、第2基底、第3基底、および第4基底を用いてピーク様形状データを再構築する。再構築したピーク様形状データより、例えば、ピークの位置、ピークの大きさなどから特徴量を求め、測定対象の分析を実施する。

[0026] なお、上述した演算装置102は、CPU (Central Processing Unit ; 中央演算処理装置) と主記憶装置と外部記憶装置とネットワーク接続装置となどを備えたコンピュータ機器である。コンピュータ機器である演算装置102は、主記憶装置に展開されたプログラムによりCPUが動作する(プログラムを実行する)ことで、上述した機能(検量方法の第2ステップ)が実現される。上記プログラムは、上述した実施の形態で示した検量方法の第2ステップをコンピュータが実行するためのプログラムである。ネットワーク接続装置は、ネットワークに接続する。

[0027] 前述したように、測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データを用いる測定において、ノイズが少なく時間分解能が高い測定が容易に実施できないという問題があった。

[0028] 一方、この種の計算に対して、カルーネンレーベ (Karhunen-Loeve transform ; KL) 変換を用いると、モデル関数を使用せず、得られたデータからピーク形状の位置を決定できる(参考文献1)。KL変換を用いる前提条件としては、とりえるピーク形状に関する実際の測定系でのデータを事前取得しておく。次に、測定系のモデルを立てる代わりに、測定系で得られたデ

ータを解析し、ノイズに対して最も信号が大きくなるようにデータの重み付き平均化を行う。この重みは、事前に取得したピーク様形状のデータから決定される。

[0029] したがって、実際にサンプル物質を用いた計測において、KL変換を用いることで、計測原理の物理法則に係る理想的応答と現実の測定系に依存する非理想的応答の両方が同時に処理されるメリットがあり、経験的に決めるパラメーターが不要となる。

[0030] 以上のように、KL変換と、それに適した実測定方法を確立することで、実際に物質を測定する実測定に依存する誤差成分を毎回取得しつつ、分析に必要なピーク形状の位置と高さを求めることができるようになる。また、本発明は、結果的に測定系の自動化に適した技術となりえる。

[0031] KL変換を使ってピーク様形状の位置と高さを求めるには、測定系から得られるデータ列を記録し、KL変換係数を学習する必要がある。表面プラズモン共鳴（SPR）法などの屈折率変化から測定する技術においては、屈折率を変化させる機構が必要である。本発明は、このようにKL変換を使うピーク様形状の測定を行うのに必要なデータ収集方法を備える装置に関する。

[0032] 特に、SPR測定においては、入射角度に対する反射率の画像データに現れるピーク様形状から液体サンプルの屈折率を求める。液体サンプルの屈折率を測定対象範囲において一連に変化させたデータを取得することによって、あらかじめ取りうるピーク様形状のデータを収集し、屈折率が未知のサンプルの屈折率の測定において、迅速測定に適用でき、時間的平均操作を行うことなく時間分解能があり、低ノイズで一意に計算できるようになる。また、再構築されたピーク様形状データは、ものとのデータよりデータボリュームを小さくすることができるので、定量情報や定性情報を得るための計算負荷を小さくすることができ、また、保存のための記憶容量を小さくできるようになる。

[0033] 以下、実験の結果などを用いてより詳細に説明する。

[0034] [実験1]

はじめに、実験1について説明する。まず、実験1に用いた測定システムについて、図3、図4を参照して説明する。まず、実験1では、図3に示す測定チップ200を用いた。測定チップ200は、BK7ガラスからなる基板201と、膜厚50nm程度のAu層202と、流路基板203とから構成されている。Au層202は、例えば、スパッタリング法などのよく知られた堆積技術により形成できる。

[0035] また、流路基板203は、マイクロ流路204となる溝部、導入口205、および排出口206を備える。例えば、ポリジメチルシロキサン(PDMS)から流路基板203を形成することができる。これらは、例えば、よく知られた生検トレパンにより形成すればよい。また、基板201と流路基板203とは個別に作製し、最後に、マイクロ流路204が測定領域に重なるように測定チップ200を組み立てた。

[0036] 例えば、Au層202を形成した基板201および流路溝を形成した流路基板203の各々の貼り合わせ面を、紫外線照射などにより活性化させた後、各々の貼り合わせ面を当接させて貼り合わせることで、両者を一体とした。紫外光光源には、ウシオ電機社製のミニエキシマを用いた。紫外線の照射時間は、5秒とした。なお、流路となる部分をくりぬいた両面テープを用いることで、上述した貼り合わせを実施することもできる。また、レーザー加工装置により、測定(分析)対象の液体を注入する導入口205を形成した。

[0037] また、排出口206には、フッ素樹脂製のチューブ207を介してポンプ208が接続され、マイクロ流路204内の液体を、排出口206を介して牽引(吸引)可能としている。なお、ポンプ208と排出口206との間には、チューブ207で接続された廃液タンク209が設けられている。ポンプ208は、例えば、Fluigent社製の(MFCS-EASYとすることができる。ポンプ208は、接続されたチューブ207内を大気圧より低い一定の圧力を保つことができる。また、ポンプ208は、分注装置214からのトリガー信号を受信して一定に保持する圧力をプログラムで変更す

ることができる。

[0038] 測定においては、SPR装置211の測定プリズムに形成されている測定面の上に、屈折率がBK7ガラスと等しいマッチングオイル（不図示）を塗布し、この上に測定チップ200の基板201裏面を配置する。また、SPR装置211の光源から出射される光の光軸上に、測定チップ200の測定領域が重なる状態に配置する。SPR装置211は、例えば、エヌ・ティ・ティ・アドバンステクノロジー株式会社製の「Smart SPR SS-100」である。

[0039] 測定においては、SPR装置211の光源から出射される光の光軸上に、測定チップ200の測定領域が重なる状態に配置する。光源から出射された光を、シリンドリカルレンズなどにより所定の長さライン状に集光してプリズムに入射させ、プリズムの測定面に密着させている測定チップ200の測定領域に照射する。測定チップ200の測定領域となるマイクロ流路204にはAu層202が形成されており、Au層202の裏面に、測定チップ200を透過してきた集光光が照射される。

[0040] このようにして照射された集光光は、流速測定対象の流体が接触したAu層202の裏面で反射し、いわゆるCCDイメージセンサーなどの撮像素子よりなるセンサーで光電変換されて強度（光強度）が得られる。このようにして得られた光強度の変化により屈折率の変化が求められる。センサーは、例えば、480ピクセルの受光部を備えるライン型の撮像素子であり、多点屈折率測定を可能としている。

[0041] 液体を分注するための分注装置214として、武蔵エンジニアリング社製のピペットマスターを使用した。分注装置214は、96穴マイクロプレート212に用意されているサンプルを、ピペット213により分取し、分取したサンプルを導入口205に供給する。分注装置214は、ピペット213のピストンの分注動作時にトリガー信号を出力することができる。

[0042] 測定においては、所定のプログラムにより、ポンプ208による圧力を順次変更させた。分注装置214とポンプ208とは、前述したように連携し

ており、以下に示すように動作する。

- [0043] 1. ポンプ208を負圧 p_5 に設定し、マイクロ流路204内の液体を空気に置換し、マイクロ流路204の内部を乾燥させる。これを初期状態とする。
- [0044] 2. ポンプ208の設定圧力を、マイクロ流路204による毛細管先端部となる導入口205で生じる最大の表面張力(p_1)よりも大きく、次のステップで注入する液体の体積をマイクロ流路204に引き込む呼び水吸引できる時間が1 s以下である、圧力 p_2 に設定する。
- [0045] 3. 分注装置214で、マイクロ流路204内の体積と同じ体積の水を、導入口205に注入する。注入の1 s後にポンプ208の圧力を p_1 に設定する。
- [0046] 4. 導入口205に注入された水は、導入口205からマイクロ流路204に、ポンプ208による負圧力で吸い込まれるが、1 s後に圧力が p_1 に変更されるために、水の後端面が導入口205に達し、そこでの表面張力とポンプ208の吸引圧力がバランスした状態で停止する。この結果、マイクロ流路204の全体に液体が満たされる。
- [0047] 5. ポンプ208の圧力を p_3 に設定する。導入口205での気液界面の形状が変形し、 p_3 と導入口205における表面張力が釣り合う新たな位置で停止する。
- [0048] 6. SPR装置211の測定および測定結果の記録を開始する。
- [0049] 7. 96穴マイクロプレート212用意されているサンプルを、分注装置214およびピペット213を用い、導入口205に $10\ \mu\text{L}$ 注入する。導入口205の狭隘部は、サンプル液体で満たされ、表面張力が大きく低下するため、サンプルは p_3 の圧力で、マイクロ流路204に送液される。
- [0050] 8. サンプルの全体積が、マイクロ流路204に入ったらSPR装置211の記録を停止する。
- [0051] 9. ポンプ208の圧力を p_4 に設定し、流路内の液体を排出する。 p_4 は、 $10\ \mu\text{L}$ の水を分注装置214で連続して注入して排出する場合に、マイ

ク口流路204に空気が絡まない最大圧力とする。

[0052] 10. 分注装置214で連続して水をマイクロ流路204に注入し、マイクロ流路204を洗浄する。十分な回数で水を注入し、最後の分注時にトリガーを送信し、圧力をマイクロ流路204が乾燥する初期状態に設定できる圧力にp5にする。

[0053] 例えば、P1は750Pa、p2は3000Paとすることができる。

[0054] 上述したように、同期する送液機構を備えた装置を用いることで、水の液送とサンプルの液送を自動的に行うことができる。

[0055] 上述した一連の動作によって、SPR装置211の被測定部分で測定される屈折率は、水の屈折率からサンプルの屈折率まで変化し、変化している屈折率のデータが記録される。SPR装置211では、マイクロ流路204の内の流れに沿った方向に4.8mmの長さにわたる部分の屈折率が、10μm間隔で一秒間に150回測定される。

[0056] この結果、図5Aに示す、特定の時間でのp偏光反射率が画像として得られた。このデータは、縦軸が流れ方向の位置、横軸が入射角度、p偏光反射率が等高線で示されている。また、図5Bに示す、特定の位置でのp偏光反射率の様にp偏光の反射率が画像として得られた。このデータは、縦軸が入射角度で横軸が時間、p偏光反射率が等高線で示されている。この2次元データが1秒間に150枚得られる。

[0057] SPR測定では、上述したようなデータから、流れ方向の各点で反射率の入射角度依存性が測定され、このデータから液体の金薄膜表面での濃度を計算する。図5Aに示す特定の時間でのp偏光反射率の横軸1要素につき1個の濃度データを得る（特定の時間・位置でのp偏光反射率）。このようにして得られるデータのグラフには、縦軸方向に1個の下向きのピーク形状を備える波形データとなる。この波形データのピーク位置は、SPR角度と呼ばれるが、この角度は金表面の局所的屈折率と相関がある。この波形データは、測定対象の特徴として定量情報（濃度）が示されるピークを有するものである。この相関はフレネル多層膜反射によって記述できる。

[0058] まず、このピーク位置を得るために、ピーク位置付近で2次の曲線に当てはめて、当てはめた2次の曲線の極値を与える入射角度位置を得る方法で計算したSPR角度を、図5Cの特定の時間・位置でのp偏光反射率に示す。この方法では、まず、ピーク最大点になる入射角度を求め、求めた角度前後の17点を使って、最小2乗法で、ピークの位置の極値を与える入射角度を求める。従って、ピーク最大点が1ピクセル幅以上移動すると、撮像素子の異なる受光部（画素）からのデータを計算することになる。

[0059] SPR測定では、サンプルの複素屈折率の虚部が小さく、実部だけが濃度で変化する場合には、入射角度に対するp偏光反射率は、入射角度方向に平行移動する。濃度変化が小さい場合SPR角度は、撮像素子の1画素内を移動する。濃度変化が大きくなると、1画素の入射角度の幅を超えて移動する。SPR測定では、この両方を連続的に処理できれば、大きなダイナミックレンジを持つ測定が可能である。

[0060] 次に、反射率にしきい値を設けて、設けたしきい値よりも大きな反射率を示す入射角度に対して、しきい値を超える値を重いとして、平均位置を計算する方法でSPR角度を求めた。次に同じ反射率データに対して、KL変換を用いて濃度に相関する値を計算した。この手順は以下のとおりである。

[0061] SPR装置で得られる画像（図6）を、入射角度 q ，流れ方向の位置 y の反射強度の配列 qy に格納する。さらにこの画像の1/150秒ごとの連続する画像を、時間 t の配列として qyt に格納する。配列 qyt は3次元となる。この配列から流れ方向の位置 y の配列 $qt = qyt (:, y, :)$ を取り出す。この式の中で、「 $:$ 」はその位置の配列のインデックスすべてを意味する。配列 qt は2次元である。この2次元の配列を入射角度が連続し、その繰り返しが時間的に連続するように1次元に並び替え、これを元信号 a とする。元信号 a は、長さが時間 \times 入射角度幅の1次元配列である。

[0062] 元信号 a をKL分解する。このために、特異値分解を利用する。元信号 a は特異値分解 svd によって、「 $[U, V, D] = svd(b)$ 」と計算できる。 $b = U * V * D$ である。Uは、直交行列でUの列ベクトルは独立基底

(正規直交基底)である。Vは特異値が対角成分である対角行列、Dは直交行列である。配列bは、元信号aの平均値からの偏差である。特異値分解 $s v d$ は、参考文献2などに記載の既知の方法で計算することができる。

[0063] $b = a - \text{mean}(a)$; mean は a の平均値を与える。特異値分解によって、元信号 a を再構成すると「 $Q y = \text{transpose}(U) * b + \text{mean}(a)$ 」となり、元信号 a の独立基底 U の各成分が計算される。Q y の行ベクトルは、流れ方向の y 位置での濃度の時間変化を表し、時間変化に関する第 1 基底からこれに直交する基底成分の変化を表す。b の Q y を各位置 y について計算し、各基底の成分ごとに積み上げると、 $Q(y, t, n)$ なる配列を構築できる。これは位置 y, 時間 t, 基底 n での濃度を表す。

[0064] SPR測定の場合、元信号 a のグラフは、一個のピークを含む形状である。サンプルの濃度が変わると、ピークの位置が q 軸上を移動する。この形状は、フレネル多層膜反射を考えると層の数の級数として求めることができる。これに撮像素子のノイズ、撮像素子の各画素の量子効率ばらつき、ADコンバータの精度とノイズ、光学系による画像のひずみ、SPR現象による熱的ゆらぎ、光路上のごみ・傷による散乱、Au層の厚さ・複素屈折率分布、サンプルの屈折率分布、励起光による発熱の効果を含む。

[0065] このために、測定系に固有の光強度のパターンと変化のために、全体を記述するモデルを構築するには不明確な要素が多い。特に可搬型の SPR 装置を構築する場合は、補正光学系や厳密なごみ除去機構が機器の堅牢性と軽量化に相反する。

[0066] 以上のように、あらかじめ規定したモデルを用いることなく、KL変換でデータから最も大きく変化する成分を独立基底として抽出することができる。

[0067] SPR測定で得られる信号をKL変換すると、多く場合、主要第4基底までで元信号を表現でき、第5基底以降はノイズまたは、装置に固有のパターンになる。このために、元データを保存する代わりに、第1基底～第4基底でデータを保存することによって、保存するデータ量の削減と元データの保

持を両立することができる。

- [0068] 一方、KL変換では、計算過程で元信号の代表値に対する相対値とするために、特異値分解の結果の符号は不安定になり、濃度の変化方向に対して絶対値は相関するが、符号が反転することがある（参考文献3）。
- [0069] y方向に位置分解能があるSPR測定でこのような場合、yごとに計算した特異値分解では、y位置ごとに濃度に対する相関の符号が不統一になる。この問題を解消するには、特定の時間でのUの符号を、U全体にアダマール積を施すことで、変化の方向をyによらずそろえることができる。または、濃度を別アルゴリズムで計算した配列（これをBとする）から濃度の変化方向を決定し、これに合うようにQの符号を選べばよい。
- [0070] さらにQを定量的に濃度に一致させるには、Qのy平均とBのy平均値の相関係数を用いてQを多項式で補正する方法を採用できる。また、流路に濃度が異なる既知の溶液の系列を流し、その系列の濃度とQの相関を用いることができる。
- [0071] 既定の濃度のサンプルをこのように計算した結果、図7A、図7Bで比較するように、KL変換の第1基底を用いて、モデルベースの計算方法に比してノイズの少ない濃度データを得ることができた。図7A、図7Bでは、屈折率変化がない時間でのSPR曲線、観測時間でのSPR角度の時間変化と標準偏差を2次最小二乗法、図形的重心、KL変換による計算法を比較している。標準偏差のグラフの通り、同じ画像から計算したSPR角度の中で標準偏差が最も小さい。
- [0072] モデルベースの方法でも、測定される濃度変化が、測定間隔（カメラの露光間隔または、露光時間）に対して遅ければ、元データの時間平均を取ることによってノイズを減らすことができる。このような場合でも、KL変換を用いた方法では、時間分解を高く保ったままノイズを減らせる利点がある。また、元信号aの平均値 $\text{mean}(a)$ を適切に計算するには、aの取得範囲が十分に取りうる値を網羅していることが望ましい。
- [0073] このために、マイクロ流路内で濃度が増加する時間を t_c 、水のSPR信

号を記録する時間を t_{pre} 、マイクロ流路内の液体がサンプルに置き換わった後の時間を t_{post} とすると、「 $T_{pre} > t_c$ 、 $T_{post} > t_c$ 、 $T_{pre} \sim t_{post}$ 」となるように選ぶことが望ましい。このように選ぶことによって、流路の中の一部にごみが入っていた場合、事前または事後に測定したごみの入っていないときに計算した U を用いて Q を計算すると、第2基底以降の成分が大きくなる。これを用いて、流路中のごみの検出、流路内の異常の検出を行うことができる。

[0074] [実験2]

次に、実験2について説明する。実験2では、抗原の検出（分析）を実施した。マイクロ流路として、参考文献4記載のマイクロ流路チップ（フローセル）を用いた。実験1と同様に、SPR装置としてSmart SPRを用いた。フローセルの流路を乾燥状態から、ブロッキングバッファー（Stabilcoat）に続いて、水（サンプル）を流した。このフローセルのマイクロ流路の壁面に抗体を固定した。

[0075] 上述したように抗体を固定しているマイクロ流路に供給されたサンプルに抗体原子が存在し、この抗原分子が、固定されている抗体と結合すると、SPR測定における屈折率の変化として測定される。この屈折率変化は、ブロッキングバッファーからサンプルへの屈折率の変化よりも小さく、時間的には1秒以上要する遅い変化である。溶液の交換による屈折率の変化は、1秒以下で終了する。第2の液体に続いて、固定した抗体に対する抗原を含む溶液をこの流路に流し、SPRで反射率の入射角度依存性を、抗体が固定された部分とそれ以外の部分で測定する。

[0076] この測定により得られたデータを、非特許文献3記載のモデルベースの計算方法（2次最小二乗法、図形的重心法）とKL変換による計算とを実施した。計算の結果、図8に示すようになった。図8において、各グラフの縦軸は標準偏差で規格化している。抗体とサンプル中の分子との反応は t_2 の期間である。これら、屈折率の時間変化と、特異抗体固定部分と特異抗体非固定部分との違いを比較すると、どの計算方法でも、屈折率の時間変化は同様

に計算され、特異抗体の有無による違いも同様である。しかし、各プロットを細かく見ると、KL変換による計算方法では、プロットが滑らかでノイズが小さくなっていることがわかる。したがって、計測可能濃度下限を下げることができる。

[0077] [実験3]

次に、実験3について説明する。実験3では、クロマト電流測定を実施した。SPRの入射角反射率データに限らず、本発明は、ピーク様形状の変化を定量化するのに使用できる。以下、マイクロ流路を利用した濃度変化測定の例を示す。実験3では、図9に示すフローセル300を用いた。

[0078] フローセル300は、測定対象の液体が導入される導入口302と、導入口302に一端が接続して液体が移送されるマイクロ流路303と、マイクロ流路303の一部に形成された測定領域304とを備える。また、マイクロ流路303の他端には、排出口308が形成されている。排出口308には、例えば、吸引ポンプ（不図示）が接続され、導入口302に供給された検体溶液を、マイクロ流路303に送液可能とされている。マイクロ流路303は、例えば、断面視で、幅1mm、高さ10~100 μ m程度に形成されている。また、マイクロ流路303の他端に、よく知られた吸引流路を設け、吸引流路を吸引ポンプとして用いることもできる。吸引流路には、吸引流路に到達する複数の貫通孔が設けられ、これらにおける毛細管現象を用いて吸引ポンプとして機能する。

[0079] また、測定領域304のマイクロ流路303には、作用極305a、作用極305b、作用極305c、対極306、参照極307が配置されている。作用極305a、305b、305cは、例えばAuなどの金属から構成され、マイクロ流路303の第1壁面に形成されている。対極306は、マイクロ流路303の第1壁面に対向する第2壁面に形成されている。一般に、第2壁面が大地の側となるように、フローセル300は配置される。また、参照極307は、測定領域304のいずれかの壁面に形成されている。例えば、参照極307は、第2壁面に、作用極305a、305b、305c

とは接触することなく配置されている。

[0080] また、作用極 305 a, 305 b, 305 c の上には、機能層 309 a, 309 b, 309 c が形成されている。例えば、機能層 309 b は、作用極 305 b の側の酵素固定層と酵素固定層の上に形成されたメディエータ層とから構成されている。機能層 309 a, 309 c も同様である。なお、各機能層は、各々異なる酵素固定層、メディエータ層から構成されている。

[0081] なお、フローセル 300 は、支持基板と、マイクロ流路 303 となる溝形成部を備える流路基板とを貼り合わせた構成となっている。支持基板は、例えば、ガラスなどの透明な材料から構成することができる。流路基板は、例えば、親水性のポリジメチルシロキサンから構成することができる。

[0082] また、フローセル 300 は、第 1 引出配線 311 a, 311 b, 311 c、第 2 引出配線 312、第 3 引出配線 313 を備える。

[0083] 第 1 引出配線 311 a, 311 b, 311 c の各々は、作用極 305 a, 305 b, 305 c に接続し、第 1 壁面に垂直な側のフローセル 300 を貫通して外部に引き出され、電気化学測定部 301 に接続する。電気化学測定部 301 は、例えば、ポテンショスタットである。第 2 引出配線 312 は、対極 306 に接続し、第 2 壁面の側のフローセル 300 を貫通して外部に引き出され、電気化学測定部 301 に接続する。第 3 引出配線 313 は、参照極 307 に接続し、第 1 壁面に垂直な側のフローセル 300 を貫通して外部に引き出され、電気化学測定部 301 に接続する。

[0084] ここで、電気化学測定部 301 は、作用極 305 a, 305 b, 305 c、対極 306、参照極 307 を用いた電気化学測定を行う。この実験 3 では、SPR 測定は行わず電流測定に注目する。実験 1 と同様の分注装置およびポンプを用い、マイクロ流路 303 に異なる水溶液を順次送液した。また、各々の作用極には、HRP（過酸化水素還元酵素）を含むオスミウムビピジル（オスミウムビピリジン）錯体を側鎖に持つポリマーが固定されている。このため、一定の電位を印加し、電流を測定しながらマイクロ流路に過酸化水素水溶液を流すと、過酸化水素溶液が流れている間に過酸化水素の濃度に

応じた電流が流れる。しかし、マイクロ流路303に導入された過酸化水素は、流路中で希釈されながら流れるために、電流の時間変化はピーク様形状になる。

[0085] さらに、マイクロ流路303内の過酸化水素を洗浄するために、続いて水を送液すると、図10A、図10Bに示すように、送液のイベントのたびに、流れる電流の絶対値が一時的に増えるものの、電流値ゼロの状態に戻っていく。このグラフから、過酸化水素濃度の検量線を得るには、一般的には、バックグラウンド値を設定し、グラフの特徴を代表する形状を決定し、例えば最大のピーク電流値、あるいは、ピーク面積などから選択して決定し、これを計測したうえで最小二乗法などで濃度に関連させる。

[0086] しかし、ピーク電流付近でノイズが大きい場合は、区間を定めて平均化するなどの処理が必要になったり、また、ピーク形状が明らかでは無かったりすることが度々ある。このようなグラフ特徴を代表する形状から求める方法では、表面を修飾した作用極の種類が変わるたびに、物質の反応速度や拡散速度によって変化が予測されるピーク形状も変化するので、特徴量の決定を改めて行う必要がある。

[0087] 一方、図10A、図10Bに示すグラフのサンプルの濃度が同一である電流変化の全体（洗い過程を含む）をピーク様形状列ベクトル d とみなし、 d を濃度ごとに並べた配列を実験1の元信号 a とみなして特異値分解を行えば、独立変数の範囲やしきい値などのパラメーターを設定することなく、濃度によるピーク様形状の変化が、図11に示すように抽出できた。

[0088] この場合では、マイクロ流路303にサンプルを注入した直後のメインピークと、マイクロ流路303お洗浄中の電流も検量線に使われている。このような処理を行うためには、前提条件として、各濃度のサンプルを流す時間を同一にして、時間方向におけるズレを極力小さくする必要がある。本例では、分注装置およびポンプを用いてそのタイミングを同一にすることによって、この条件を満たしている。

[0089] [実験4]

次に、実験4について説明する。実験4では、電気化学SPR測定を実施した。実験2で説明したように、SPR測定では、被測定面に分子認識分子や特定の反応を触媒する修飾層を構築し、この層の屈折率変化を測定することによって特定の分子や特定の反応を検出する。また、マイクロ流路と組み合わせると、SPRの感度域が200nm程度で検出領域体積が極めて小さい性質により、微小体積のサンプルの測定に有利である。

[0090] しかし、修飾層の厚さに不均一さがあったり、修飾層内の化学活性に不均一さがあったり、修飾層の複素屈折率の虚部が変化したりする場合には、SPRカーブは、修飾層の厚さの分布がないフレネル反射モデルから予想されるカーブと異なる形状になる。観測されるSPRカーブは、酸化還元状態に応じて、例えば図12Aに示す複雑なp偏光反射率の例のように、ピーク的位置を判定できない形状になる。さらに、その修飾層の屈折率変化のとの関係を記述するにはパラメーターの多いモデルが必要になる。

[0091] 電気化学計測をSPR法で実現するために、実験4に使用したオスミウムビピリジル（オスミウムビピリジン）側鎖を持つポリマーで修飾した作用極をもつ電気化学電極付きマイクロ流路チップ（フローセル）で、作用極上にさらにグルタミン酸酸化酵素を固定した。この酵素修飾電極で酵素の基質（グルタミン酸）の濃度を、SPR法で読み出す方法で計測した。

[0092] まず、作用極上でオスミウムイオンとHRPとグルタミン酸酸化酵素を修飾した積層膜からのp偏光反射率をSPR装置で測定しながら、作用極で充放電反応を繰り返すと、オスミウムイオンの酸化還元に依存してSPR装置で記録される反射率の入射角度依存性（屈折率変化）は充放電の周期で周期的に変化する。この変化は、オスミウムイオンの酸化還元状態を反映しているので、ネルストの式で、電位に関連付けることができ、結局SPR法による光測定によって電極電位を測定することができる（参考文献5）。言い換えると、測定対象の溶液の作用極、参照極、および対極を用いた電気化学測定における作用電極の対極に対する電位の変化は、表面プラズモン共鳴法による溶液の屈折率の変化として測定することができる。

- [0093] この場合のSPR曲線の形状と電位の関係を低ノイズで計算できることを確かめるために、SPR法による入射角度反射率測定と同時に、電位を掃引しながら電流を測定し、SPR曲線から電位を測定する。または、SPR法による入射角度反射率測定と同時に、一定電流での充放電を行いながら電位を測定し、SPR曲線から電位を測定する。
- [0094] この反応に伴うSPR曲線の変化は、複素屈折率の虚部も変化し、入射角度方向への平行移動にならないため、SPR曲線の極大点を求める方法では、特徴量を計算できない。また、修飾層の厚みの分布のために、SPR曲線が典型的なディップ形状から乖離し、その変化が位置依存的になる。また、SPR曲線の変化が大きく、装置の光学系で定められた入射角度範囲にピークが入らないこともある。
- [0095] そこで、オスミウムイオンが固定化されている電極全体の領域の入射角一反射率の画像の2次元配列をg1として、g1をシリアル化して縦ベクトルとしてその時間変化を列に並べた2次元配列をg2とする。オスミウムイオンの酸化還元電位から離れて、酸化側電位での静止電位時間から出発して式量酸化還元を超えて、還元側電位で折り返して最初の電位に戻る、サイクリックボルタンメトリーを行い、電位と電流とSPR曲線を同時に測定する。
- [0096] ポテンショスタットの時間とSPR装置の時間の関係を正しく保つために、両装置をトリガー信号で同期させて稼働させることが望ましい。トリガー信号を用いない場合では、電位にパルスや、電位制御開始を瞬時に行うなど、SPR装置のデータから電位開始時間を推定しやすい電位プログラムを用いる。
- [0097] 図12Bの(a)に示す電位プログラムのような電位の時間変化で、サイクリックボルタンメトリーを行ったところ、電流応答として表面反応に特徴的である、ピークセパレーションが小さく、電流軸に対称なオスミウムイオンの酸化還元を示す[図12Bの(c)]サイクリックボルタモグラムを得た。同時に測定したSPR測定では、図12Bの(b)に示すように、入射角度一反射率曲線の変化g2を得た。作用極の電位はオスミウムイオンの酸

化還元電位の両側をスキャンするので、g 2は電極上のオスミウムイオンの酸化還元状態の全状態を含んでいる。

[0098] このg 2から実験1と同様に計算し、第1基底の固有値を電位の関数としてプロットすると、図12Bの(d)に示すように、SPR角度とSPR角度変換値となったグラフを得た。図12Bの(d)では、KL変換を用い場合、およびSPR曲線の各々を、2次の最小二乗法で近似する方法で得た値を規格化して表示している。KL変換で計算した値のノイズが小さいことがわかる。さらに、SPR曲線がモデル化できない場合や、固定化層の状況に依存する場合での計測できることがわかる。

[0099] 次にこの電極に定電流での充放電を行い、酵素反応の基質の定量を行った。図13に示す電位電流プログラムを使用し、SPR装置で得られる入射角—反射率データから、電位を測定する方法で実験(測定)を行った。この例では、修飾層の複素屈折率分布が、固定化操作に依存するため、以下のプログラム(手順)を使用し、固定化層の屈折率変化をKL変換で適切に学習できるように行った。

[0100] (ステップ1)

まず、酸化還元物質を含まない電解質を、ポンプを用いて送流し流路に導入する。図13に示すt1でポテンショスタットを電位規制モードで電位をオスミウムイオンが酸化される電位に設定し、固定したオスミウムイオンを酸化する。

[0101] (ステップ2)

次に、図13に示すt2で電位を還元電位に保持して固定したオスミウムイオンを還元し、SPR法で測定される屈折率を一定値にする。

[0102] (ステップ3)

次に、電位を還元電位に保持して固定したオスミウムイオンを還元し、SPR法で測定される屈折率を一定値にする。

[0103] (ステップ4)

次に、図13に示すt3で電位をオスミウムイオンの酸化還元電位に設定

して、固定化されたオスミウムイオンの半分を酸化する。この電位の変位で、屈折率も階段状に変化する。これによって、ポテンショスタットで保持される時間と、SPR法で保持する時間の同期をとることができる。この同期は、別途同期信号のポテンショスタットとSPR装置間で共有する方法でも取ることができる。

[0104] (ステップ5)

次に、グルタミン酸酸化酵素の基質（グルタミン酸）を含むサンプル電解質を一定量、流路入口に投入し液送する。これによって、一定量のサンプルがマイクロ流路に入り停止する。

[0105] (ステップ6)

次に、図13に示すt4でポテンショスタットを電流3nAの電流規制モードにする。この状態では、電極からの電流によって、オスミウムイオンが電流で規定される一定の速度で酸化され、これに伴って電極電位が高くなる。この電位が0.3Vを超えると電流の正負を反転するようにプログラムする。

[0106] HRPと過酸化水素の反応でHRPは酸化され、このHRPが還元状態のオスミウムイオンと反応し、固定化されたオスミウムイオンは徐々に酸化される。これに伴って電位は上昇し、SPR法で測定される信号も酸化還元状態の信号に変化していく。

[0107] これらポテンショスタットから供給される電荷による酸化還元状態の変化とHRPから供給される電荷による酸化還元状態の変化は畳重してSPR法で検出される。

[0108] 規制電流が負に反転した後では、グルタミン酸の濃度が低いときは過酸化水素によるオスミウムイオンの酸化速度がポテンショスタットによる還元速度よりの遅いために電位は下がる。一方グルタミン酸の濃度が高く、過酸化水素によるオスミウムイオンの酸化速度がポテンショスタットによる還元速度よりの速い場合は、電位は上昇をつづける。この電位の傾きは、濃度が低いときでは、ポテンショスタットとの電流によって、固定されたオスミウム

イオンがすべて還元または酸化するまで続く。

[0109] ポテンシostatからは一定の電流が供給されるために、過酸化水素濃度が0の場合でも一定の時間以内に電位の変化が終了するので、有限時間内で定量が完了する。また、ポテンシostatからの電流の正負を切り替えるたびに同じ信号が得られるために、再現性を高くすることができる。

[0110] 以上の測定はポテンシostatで測定される電位として観測される（図13の電位）が、同様に、SPR信号でも観測される。全体を前実験と同様にKL変換しSPR測定から電位を求めることができる。この結果が、図13のSPR応答値に示されている。このプログラム（手順）を用いることにより、KL変換に必要な修飾層の酸化還元のすべての状態のSPR曲線を電位規制モードで取得できるので、電流規制時のSPR角度を正しく変換することができる。

[0111] 図13のSPR応答値に示される時間変化率は、グルタミン酸の濃度に依存するので、グルタミン酸濃度とSPR応答値の時間変化速度をプロットすると、図14に示すように、グルタミン酸の濃度の検量線を得ることができた。

[0112] 以上に説明したように、本発明によれば、ピーク様形状データをカルーネンレーベ変換するので、測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データを用いる測定において、ノイズが少なく時間分解能が高い測定が容易に実施できるようになる。

[0113] なお、本発明は以上に説明した実施の形態に限定されるものではなく、本発明の技術的思想内で、当分野において通常の知識を有する者により、多くの変形および組み合わせが実施可能であることは明白である。

[0114] [参考文献]

[参考文献1] V. V. Zaharov et al., "Karhunen-Loève treatment to remove noise and facilitate data analysis in sensing, spectroscopy and other applications", *Analyst*, vol. 139, pp. 5927-5935, 2014.

[参考文献2] C. M. ビショップ 著、「パターン認識と機械学習 上

ヘイズ理論による統計的予測」、シュプリンガー・ジャパン株式会社発行、丸善出版。

[参考文献3] R. Bro et al., "Resolving the sign ambiguity in the singular value decomposition", *Journal of Chemometrics*, vol. 22, pp. 135-140, 2008.

[参考文献4] 国際公開第2009/096527号

[参考文献5] S. Koide et al., "A novel biosensor using electrochemical surface plasmon resonance measurements", *Chemical Communications*, pp. 741-742, 2000.

符号の説明

[0115] 101…取得装置、102…演算装置。

請求の範囲

- [請求項1] 測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データが得られる測定方法で測定されたピーク様形状データを取得する取得装置と、
- 前記ピーク様形状データをカルーネンレーベ変換することで得られた複数の基底の中の一部を用いて前記ピーク様形状データを再構築する演算装置と
- を備える検量システム。
- [請求項2] 請求項1記載の検量システムにおいて、
- 前記演算装置は、前記ピーク様形状データをカルーネンレーベ変換することで得られた、第1基底、第2基底、第3基底、および第4基底を用いて前記ピーク様形状データを再構築することを特徴とする検量システム。
- [請求項3] 請求項1または2記載の検量システムにおいて、
- 前記取得装置は、測定対象の定量および定性をするための測定結果として、測定対象の特徴として定量情報および定性情報の少なくとも1つが示されるピークを有する波形データが得られる測定方法で測定された前記ピーク様形状データを取得することを特徴とする検量システム。
- [請求項4] 測定結果として測定対象の特徴を示すピークを有する波形データが得られる測定方法で測定されたピーク様形状データを取得する第1ステップと、
- 前記ピーク様形状データをカルーネンレーベ変換することで得られた複数の基底の中の一部を用いて前記ピーク様形状データを再構築する第2ステップと
- を備える検量方法。
- [請求項5] 請求項4記載の検量方法において、
- 前記第2ステップは、前記ピーク様形状データをカルーネンレーベ

変換することで得られた、第1基底、第2基底、第3基底、および第4基底を用いて前記ピーク様形状データを再構築することを特徴とする検量方法。

[請求項6]

請求項4または5記載の検量方法において、

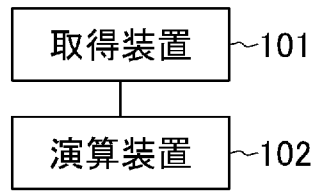
前記第1ステップは、測定対象の定量および定性をするための測定結果として、測定対象の特徴として定量情報および定性情報の少なくとも1つが示されるピークを有する波形データが得られる測定方法で測定された前記ピーク様形状データを取得することを特徴とする検量方法。

[請求項7]

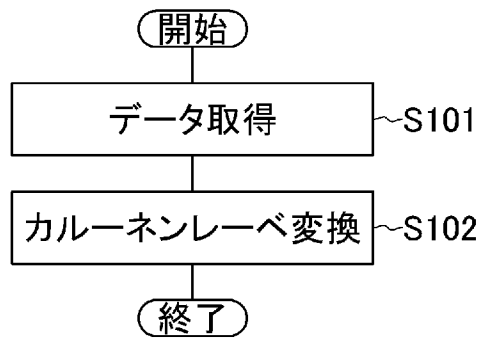
請求項4～6のいずれか1項に記載の検量方法において、

前記第1ステップは、作用極、参照極、および対極を用いた電気化学測定における作用電極の対極に対する電位の変化を、表面プラズモン共鳴法による屈折率の変化として測定して前記ピーク様形状データを取得することを特徴とする検量方法。

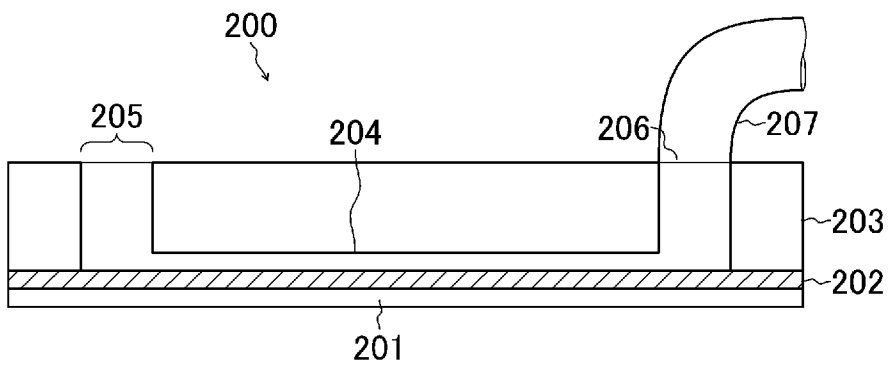
[図1]



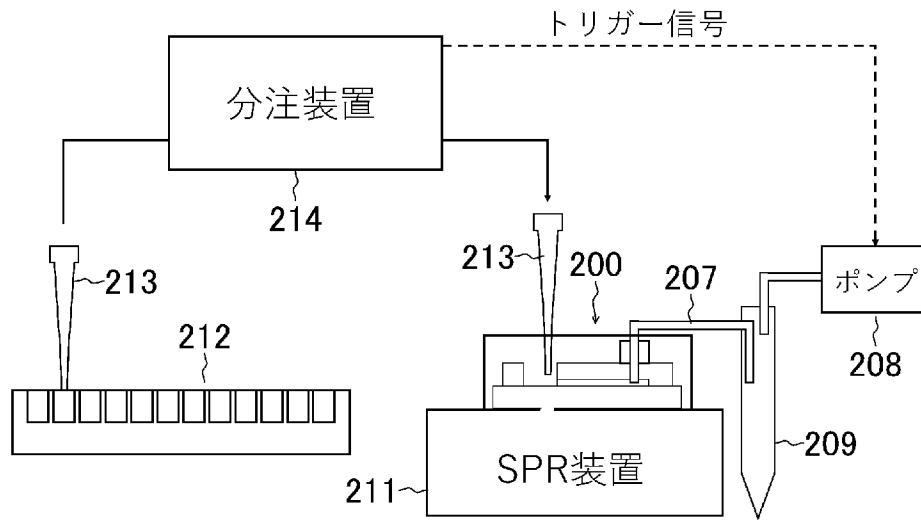
[図2]



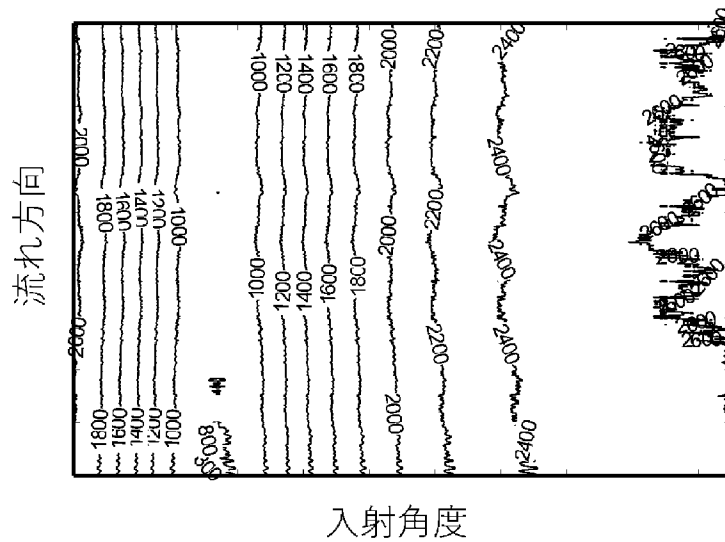
[図3]



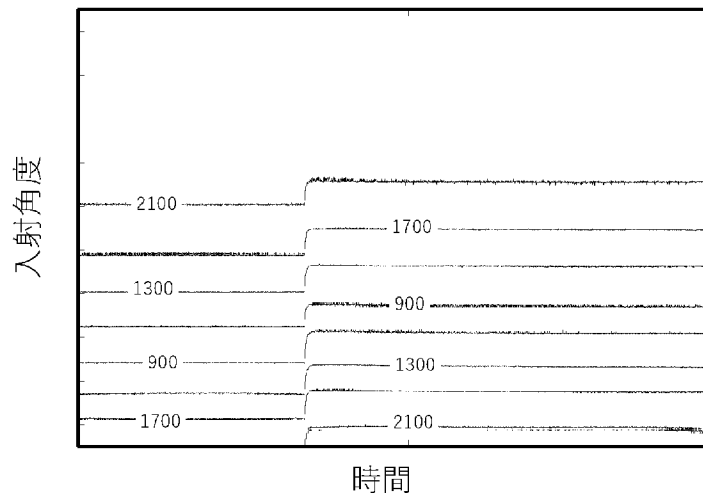
[図4]



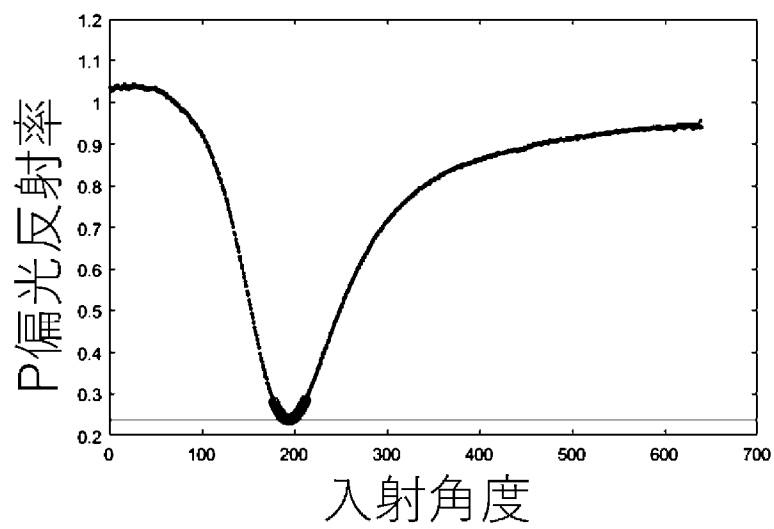
[図5A]



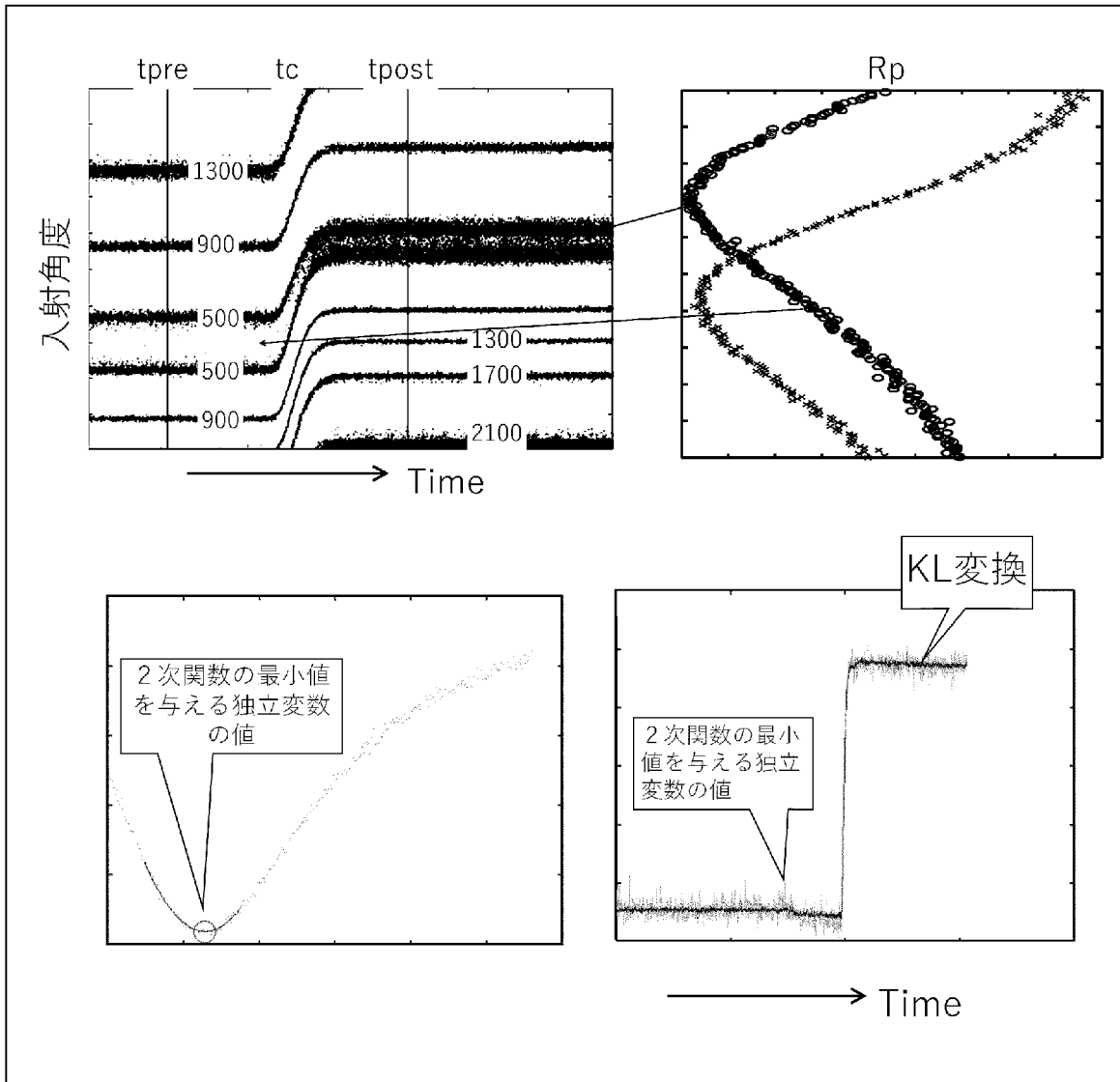
[図5B]



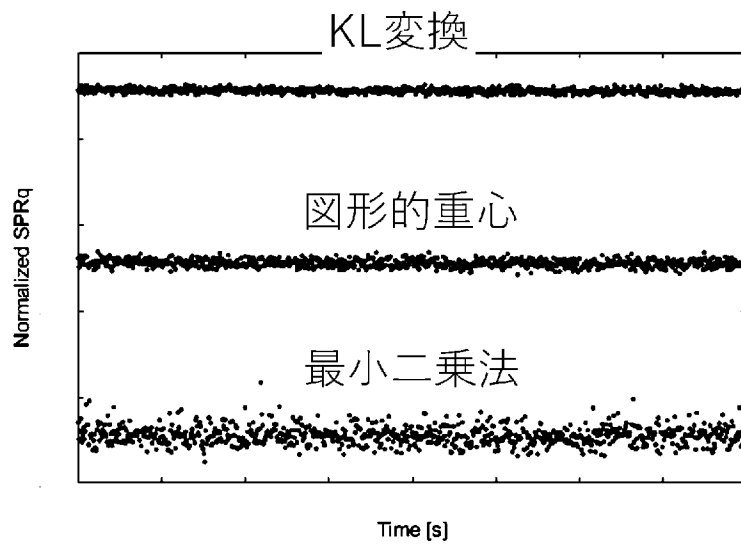
[図5C]



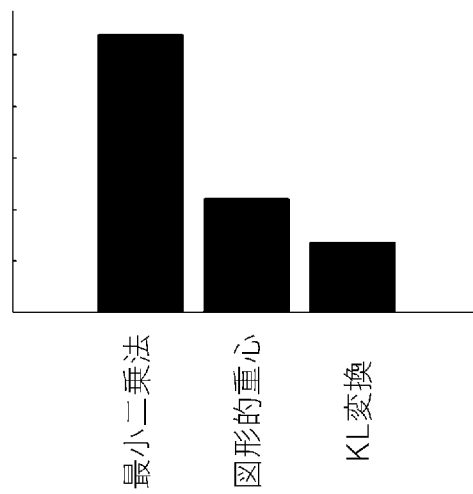
[図6]



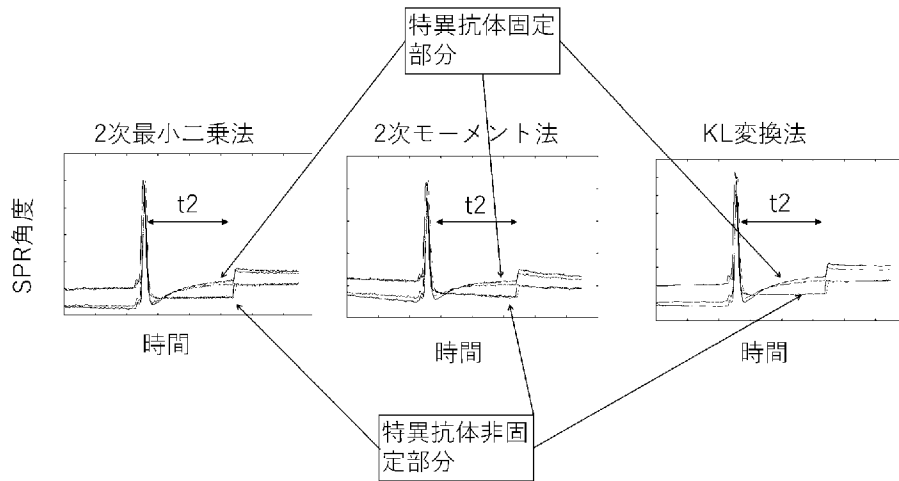
[圖7A]



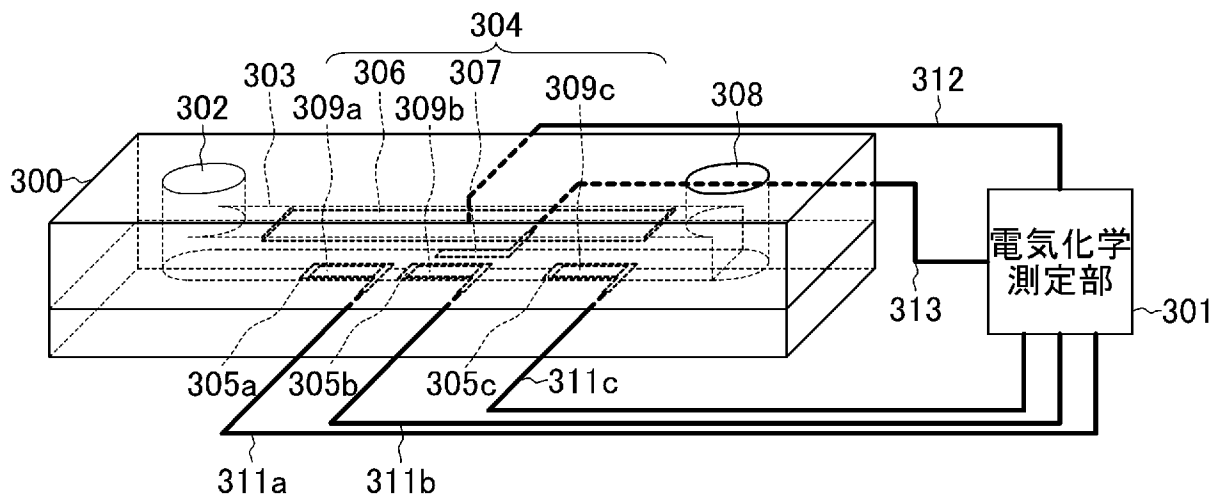
[圖7B]



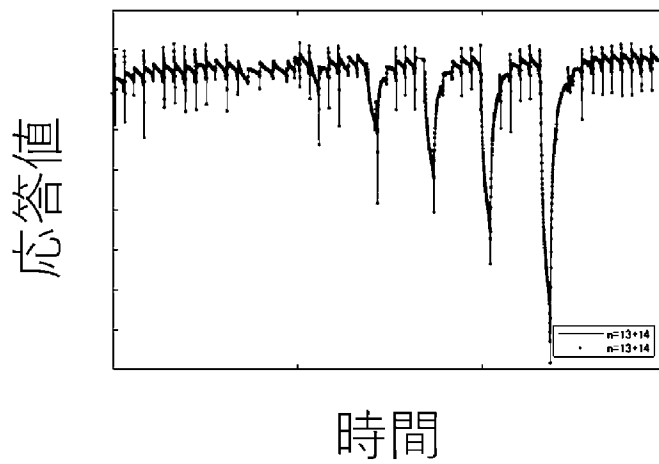
[図8]



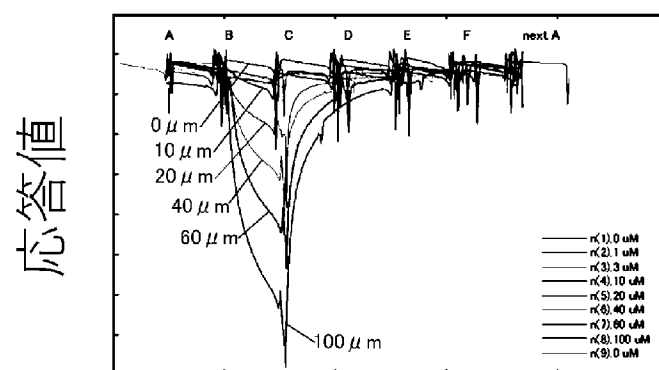
[図9]



[図10A]

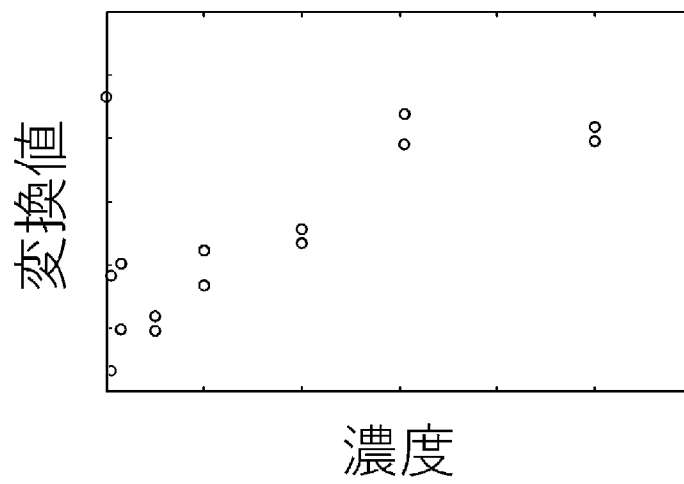


[図10B]

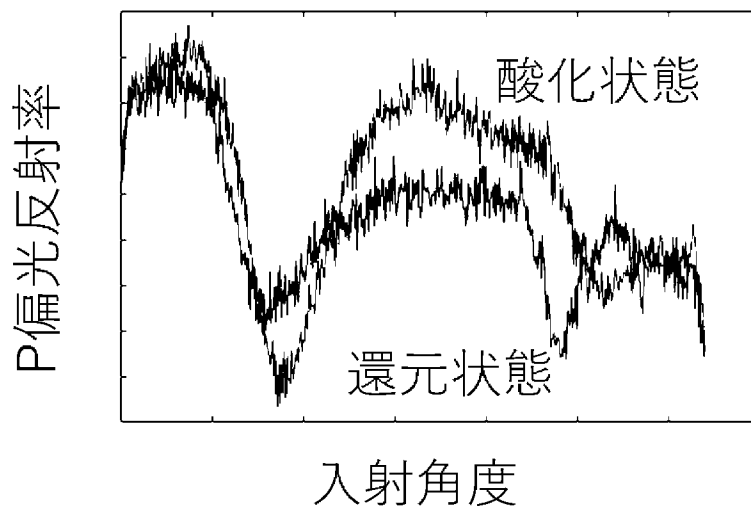


時間 (濃度ごとに折り返し)

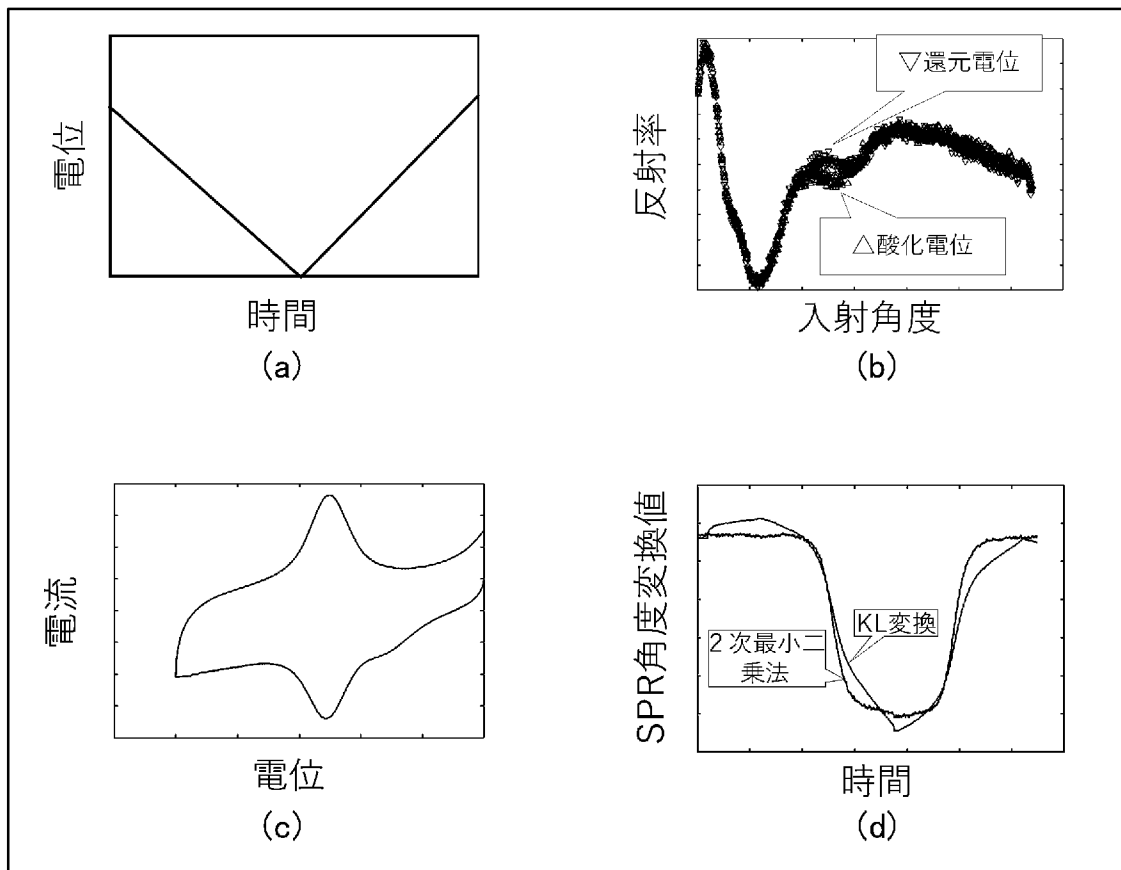
[图11]



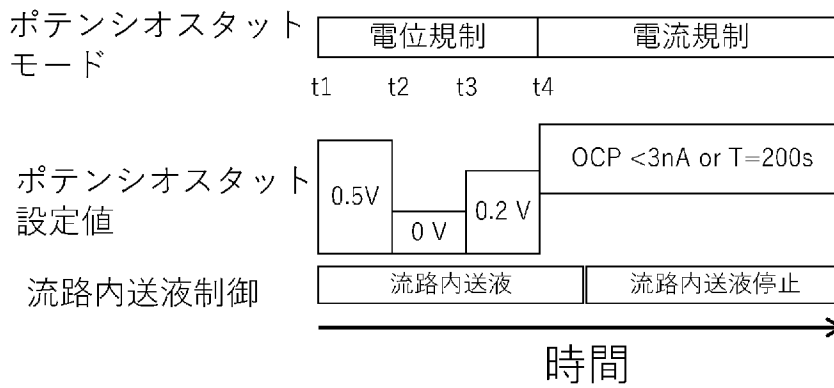
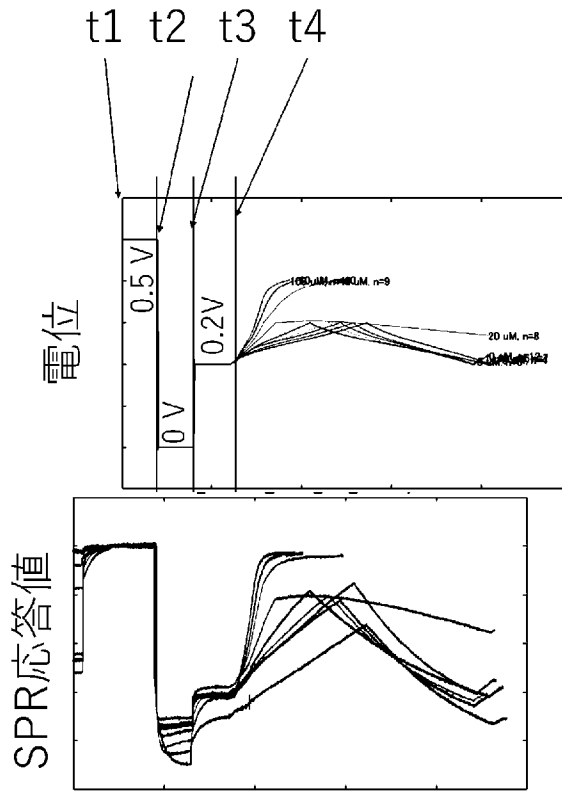
[图12A]



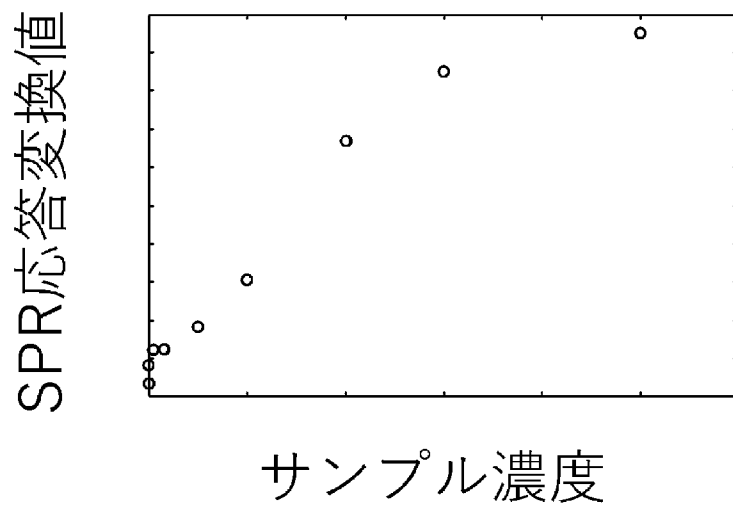
[圖12B]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/033032

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. G01N21/41 (2006.01) i FI: G01N21/41101 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>										
<p>B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. G01N21/00-21/958</p>										
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:70%;">Published examined utility model applications of Japan</td> <td style="width:30%;">1922-1996</td> </tr> <tr> <td>Published unexamined utility model applications of Japan</td> <td>1971-2021</td> </tr> <tr> <td>Registered utility model specifications of Japan</td> <td>1996-2021</td> </tr> <tr> <td>Published registered utility model applications of Japan</td> <td>1994-2021</td> </tr> </table>			Published examined utility model applications of Japan	1922-1996	Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021	Registered utility model specifications of Japan	1996-2021	Published registered utility model applications of Japan	1994-2021
Published examined utility model applications of Japan	1922-1996									
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021									
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021									
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021									
<p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)</p>										
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p>										
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.								
X Y	OISHI, Satoru, Signal processing using Karhunen-Loeve expansion for wafer focus measurement in lithography, Japanese Journal of Applied Physics, 2011, vol. 50, pp. 06GJ06-1 to 06GJ06-6, particularly, "2. Focus signal processing using KL expansion"	1-6 7								
Y	JP 2001-194298 A (NIPPON TELEGRAPH AND TELEPHONE CORPORATION) 19 July 2001 (2001-07-19), paragraph [0011], fig. 2, 4	7								
A	石川富久, 体表面電位図の Karhunen-Loeve 展開の臨床応用 - 陳旧性前壁中隔梗塞を用いて-, 心電図, 1987, vol. 7, no. 1, pp. 57-63, entire text, all drawings, (ISHIKAWA, Tomihisa, Clinical application of Karhunen-Loeve unfolding of body surface mapping. Its application to old infarctions of anterior wall and septum, Electrocardiogram)	1-7								
<table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%;"><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.</td> <td style="width:50%;"><input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.									
<table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align:top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width:50%; vertical-align:top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family						
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family									
Date of the actual completion of the international search 04 January 2021		Date of mailing of the international search report 19 January 2021								
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/033032

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MITSCHANG, L., Application of the Karhunen-Loeve transformation to the suppression of undesired resonances in three-dimensional NMR, Journal of Magnetic Resonance, 1991, vol. 92, pp. 208-217, entire text, all drawings	1-7
A	JP 2005-24483 A (NIPPON TELEGRAPH AND TELEPHONE CORPORATION) 27 January 2005 (2005-01-27), entire text, all drawings	1-7
A	US 4951266 A (SCHLUMBERGER TECHNOLOGY CORPORATION) 21 August 1990 (1990-08-21), entire text, all drawings	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/033032

JP 2001-194298 A	19 July 2001	US 6649361 B1 column 2, line 46 to column 3, line 26, fig. 2A, 2B, 4A, 4B
JP 2005-24483 A	27 January 2005	(Family: none)
US 4951266 A	21 August 1990	EP 395500 A2

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 21/41(2006.01)i FI: G01N21/41 101		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） G01N21/00-21/958		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	OISHI, Satoru, Signal Processing Using Karhunen-Loeve Expansion for Wafer Focus Measurement in Lithography, Japanese Journal of Applied Physics, 2011, Vol. 50, pp.06GJ06-1~06GJ06-6 特に「2. Focus Signal Processing Using KL Expansion」欄	1-6
Y		7
Y	JP 2001-194298 A (日本電信電話株式会社) 19.07.2001 (2001-07-19) 段落 [0011]、図2, 4	7
A	石川富久, 体表面電位図のKarhunen-Loeve 展開の臨床応用 - 陳旧性前壁中隔梗塞を用いて-, 心電図, 1987, Vol.7 No.1, pp.57-63 全文、全図	1-7
A	MITSCANG, L., Application of the Karhunen-Loeve Transformation to the Suppression of Undesired Resonances in Three-Dimensional NMR, JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE, 1991, Vol.92, pp.208-217 全文、全図	1-7
A	JP 2005-24483 A (日本電信電話株式会社) 27.01.2005 (2005-01-27) 全文、全図	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）		
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献		
国際調査を完了した日 04.01.2021	国際調査報告の発送日 19.01.2021	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 田中 洋介 2W 3009 電話番号 03-3581-1101 内線 3258	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	US 4951266 A (SCHLUMBERGER TECHNOLOGY CORPORATION) 21.08.1990 (1990 - 08 - 21) 全文、全図	1-7

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/033032

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2001-194298 A	19.07.2001	US 6649361 B1 col.2 1.46-col.3 1.26, figs. 2A, 2B, 4A, 4B	
JP 2005-24483 A	27.01.2005	(ファミリーなし)	
US 4951266 A	21.08.1990	EP 395500 A2	