

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5599986号  
(P5599986)

(45) 発行日 平成26年10月1日(2014.10.1)

(24) 登録日 平成26年8月22日(2014.8.22)

(51) Int.Cl.

G06F 17/17 (2006.01)

F 1

G06F 17/17

請求項の数 5 外国語出願 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2009-115321 (P2009-115321)  
 (22) 出願日 平成21年5月12日 (2009.5.12)  
 (65) 公開番号 特開2010-15546 (P2010-15546A)  
 (43) 公開日 平成22年1月21日 (2010.1.21)  
 審査請求日 平成24年4月16日 (2012.4.16)  
 (31) 優先権主張番号 12/120,151  
 (32) 優先日 平成20年5月13日 (2008.5.13)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCHE  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラツセ124  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敏  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】リアルタイムPCR蛍光データ内のステップ型不連続部除去用のシステム及び方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

処理装置、ストレージ装置、及び表示装置を有するコンピューターにより実行される成長プロセスを表すデータ内のステップ型不連続部を自動的に除去する方法であって、

- 成長プロセスを表すデータセットをストレージ装置により受信する段階、ここで、前記データセットは、複数のデータポイントを含み、それぞれのデータポイントは、座標値のペアを具備し、前記データセットが、不連続部が生じるサイクルに対応するデータポイントを含むことがあり、ここで当該不連続部が生じるサイクルがアニーリング温度の変化が生じるサイクルであり、 - 受信したデータセットをストレージ装置から処理装置に送り、処理装置により Levenberg - Marquardt (LM) 回帰プロセスを前記データポイントに適用して、当該データポイントに基づく下記第1非線形関数のパラメータを決定することにより、前記データセットにフィットする曲線の第1近似を算出する段階、

ここで、前記第1非線形関数が、以下のダブルシグモイド関数であり：

【数1】

$$a + b \cdot x + \frac{c}{(1 + \exp(-d \cdot (x - e)))(1 + \exp(-f \cdot (x - g)))} + h \cdot (\text{UnitStep}(x) - \text{UnitStep}(x - cac)),$$


---

10

{式中、UnitStepは、次の形態：

【数2】

$$\text{UnitStep}(x) = \begin{cases} 1 & x \geq 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases}, \text{and}$$


---

20

を有する}、パラメータの決定が、パラメータ a、b、c、d、e、f、g、及び h の中の 1 つ又は複数のものを反復的に決定することにより行われ、ここで当該パラメータは、ステップ型不連続部パラメータを含む；

- 処理装置により、第 2 回帰プロセスを前記データポイントに適用し、当該データポイント基づく下記第 2 非線形関数のステップ型不連続部パラメータを決定することにより、前記データセットにフィットする曲線の第 2 近似を算出する段階、ここで、前記第 2 非線形関数は、次の形態を有し、

【数3】

30

$$a + b \cdot x + h \cdot (\text{UnitStep}(x) - \text{UnitStep}(x - cac))$$


---

{式中、UnitStepは、次の形態を有し：  
【数4】

40

$$\text{UnitStep}(x) = \begin{cases} 1 & x \geq 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases}$$


---

[式中、xは、サイクル数である]、

cacは、前記不連続部が発生したサイクルであり、a、b、及びhは、前記バ

50

ラメータであり、且つ、 $h$ は、前記ステップ型不連続部パラメータである} ;

- 処理装置により、第1近似及び第2近似の各々について、以下の式：

【数5】

$$aic = n \cdot \ln\left(\frac{\|\hat{y} - y\|^2}{n}\right) + 2 \cdot m + \frac{2 \cdot m \cdot (m+1)}{n-m-1}$$

10

{式中、

【数6】

$$\frac{\hat{y} - y}{\sqrt{H_h^{-1} \cdot stdError}}$$

は、予測残差であり、 $n$ は蛍光取得サイクルの数であり、かつ $m$ はモデルの自由度である}

20

により特定されるアカイケ情報係数( $aic$ )値を計算することにより、前記第1及び第2近似のそれぞれのものの情報係数を決定する段階、

- 処理装置により、前記情報係数に基づいて、最小の情報係数を有する前記近似の中の1つものを選択する段階、

- 処理装置により、前記選択された近似の前記ステップ型不連続部パラメータの信頼区間( $ci$ )を決定する段階であって、以下の式：

【数7】

$$ci = 1.96 \cdot \sqrt{H_h^{-1} \cdot stdError},$$

30

{式中、1.96は、95%の信頼を表し、 $H_h^{-1}$ は、 $h$ 係数のヘッセ行列の逆行列を表し、かつstdErrorは、選択されたモデルの標準誤差を表し、ここでヘッセ行列は、以下の式：

【数8】

$$H = J^T \cdot J,$$

40

(式中、 $J$ は、ヤコビ行列であり、 $J^T$ は、ヤコビ転置行列である)  
である}

により、信頼区間の幅を決定し、信頼区間の幅が、ゼロを含む場合には、補正が行われず；

- 処理装置により、前記信頼区間が値ゼロを含まない場合に、ゼロに設定された対応する前記ステップ型不連続部パラメータを有する前記選択された近似によって前記データセットの一部を置換する段階、ここで当該データセットの一部は、第1サイクルからアニー

50

リング温度変化の前に発生するサイクルに対応するデータポイントであるか、第1サイクルからアニーリング温度変化の発生したサイクルに対応するデータポイントであるか、または第1サイクルから始まってアニーリング温度の変化が発生したサイクルの後のサイクルに対応するデータポイントであり、

前記一部が置換されたステップ型不連続部を自動的に除去されたデータセット又は補正が行われていないデータセットを、表示手段により表示するか、又はストレージ装置に返送する段階

を含んで成る方法。

**【請求項2】**

置換された前記データセットの一部は、第1サイクルからアニーリング温度変化の発生したサイクルに対応するデータポイントを含むものまでの前記データセットの部分を含む請求項1記載の方法。 10

**【請求項3】**

前記選択段階の後に、

- 前記選択された近似のフィットの適合度値を算出し、且つ、前記フィットの適合度値が閾値を上回る場合にのみ、継続する段階、

を更に含む請求項1記載の方法。

**【請求項4】**

成長曲線を表すデータセット内のステップ型不連続部を自動的に除去するようにプロセッサを制御するコードを含む記録媒体であって、 20

ストレージ装置に記録されたデータセットを、処理装置に送る段階、

当該処理装置に、以下の：

- 成長プロセスを表すデータセットを受信する段階、ここで、前記データセットは、複数のデータポイントを含み、それぞれのデータポイントは、座標値のペアを具備し、前記データーセットが、不連続部が生じるサイクルに対応するデータポイントを含むことがあり、ここで当該不連続部が生じるサイクルがアニーリング温度の変化が生じるサイクルであり、

- Levenberg - Marquardt (LM) 回帰プロセスを前記データポイントに適用して、当該データポイントに基づく下記第1非線形関数のパラメータを決定することにより、前記データセットにフィットする曲線の第1近似を算出する段階、ここで、前記第1非線形関数が、以下のダブルシグモイド関数であり： 30

**【数9】**

$$a + b \cdot x + \frac{c}{(1 + \exp(-d \cdot (x - e))) \cdot (1 + \exp(-f \cdot (x - g)))} + h \cdot (\text{UnitStep}(x) - \text{UnitStep}(x - cac))$$

{式中、UnitStepは、次の形態：

**【数10】**

$$\text{UnitStep}(x) = \begin{cases} 1 & x \geq 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases}$$

ここで、前記パラメータが、パラメータa、b、c、d、e、f、g、及びhの中の1

40

50

つ又は複数のものを反復的に決定することにより行われ、ここで当該パラメータは、ステップ型不連続部パラメータを含む；

- 第2回帰プロセスを前記データポイントに適用して、当該データポイントに基づく下記第2非線形関数のパラメータを決定することにより、前記データセットにフィットする曲線の第2近似を算出する段階、ここで、前記第2非線形関数は、次の形態：

【数11】

$$a + b \cdot x + h \cdot (\text{UnitStep}(x) - \text{UnitStep}(x - cac))$$

10

{式中、UnitStepは、次の形態：

【数12】

$$\text{UnitStep}(x) = \begin{cases} 1 & x \geq 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases}$$

20

[式中、xは、サイクル数である]を有し、

cacは、前記不連続部が発生したサイクルであり、a、b、及びhは、前記パラメータであり、且つ、hは、前記ステップ型不連続部パラメータである}を有し、の前記パラメータは、ステップ型不連続部パラメータを含む：

30

- 前記第1及び第2近似の各々について、以下の式：

【数13】

$$aic = n \cdot \ln \left( \frac{\|\hat{y} - y\|^2}{n} \right) + 2 \cdot m + \frac{2 \cdot m \cdot (m+1)}{n-m-1}$$

40

により特定されるアカイケ情報係数(aic)値を計算することにより、第1及び第2近似のそれぞれのものの情報係数を決定する段階、

- 前記情報係数に基づいて、最小の情報係数を有する前記近似の中の1つものを選択する段階、

- 前記選択された近似の前記ステップ型不連続部パラメータの信頼区間(ci)を決定する段階であって、以下の式

【数14】

$$ci = 1.96 \cdot \sqrt{H_h^{-1} \cdot stdError},$$

{式中、1.96は、95%の信頼を表し、 $H_h^{-1}$ は、h係数のヘッセ行列の逆行列を表し、かつstdErrorは、選択されたモデルの標準誤差を表し、ここでヘッセ行列は、以下の式：

10

【数15】

$$H = J^T \cdot J,$$

(式中、Jは、ヤコビ行列であり、 $J^T$ は、ヤコビ転置行列である)  
である}

により、信頼区間の幅を決定し、信頼区間の幅が、ゼロを含む場合には、補正が行われず；

20

- 前記信頼区間が値ゼロを含まない場合に、ゼロに設定された対応する前記ステップ型不連続部パラメータを有する前記選択された近似によって前記データセットの一部を置換する段階、

ここで当該データセットの一部は、第1サイクルからアニーリング温度変化の前に発生するサイクルに対応するデータポイントであるか、第1サイクルからアニーリング温度変化の発生したサイクルに対応するデータポイントであるか、または第1サイクルから始まってアニーリング温度の変化が発生したサイクルの後のサイクルに対応するデータポイントであり、

前記一部が置換されたステップ型不連続部を自動的に除去されたデータセット又は補正が行われていないデータセットを、表示手段により表示するか、又はストレージ装置に返送する段階を実行させるための命令をコードする記録媒体。

30

【請求項5】

- キネティックPCR增幅曲線を表すPCRデータセットを生成するキネティックPCR分析モジュールであって、前記データセットは、複数のデータポイントを含み、それぞれのデータポイントは、座標値のペアを具備し、前記データセットが、不連続部が生じるサイクルに対応するデータポイントを含むことがあり、ここで当該不連続部が生じるサイクルがアニーリング温度の変化が生じるサイクルである、キネティックPCR分析モジュールと、

- インテリジェンスモジュールと、

を有し、

40

前記キネティックPCR分析モジュールから前記インテリジェンスモジュールにデータセットを送り、当該インテリジェンスモジュールが、

- Levenberg - Marquardt (LM) 回帰プロセスを前記データポイントに適用して、下記データポイントに基づく前記第1非線形関数のパラメータを決定することにより、前記データセットにフィットする曲線の第1近似を算出する段階、ここで、前記第1非線形関数は、以下のダブルシグモイド関数：

以下のダブルシグモイド関数であり：

【数16】

$$a + b \cdot x + \frac{c}{(1 + \exp(-d \cdot (x - e)))(1 + \exp(-f \cdot (x - g))))} + h \cdot (\text{UnitStep}(x) - \text{UnitStep}(x - cac))$$

{式中、UnitStepは、次の形態：

【数17】

10

$$\text{UnitStep}(x) = \begin{cases} 1 & x \geq 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases}$$

を有する}であり、前記パラメータが、パラメータ a、b、c、d、e、f、g、及び h の中の 1 つ又は複数のものを反復的に決定することにより行われ、ここで、前記パラメータは、ステップ型不連続部パラメータを含み；

20

- 第 2 回帰プロセスを前記データポイントに適用して、当該データポイントに基づく下記第 2 非線形関数のパラメータを決定することにより、前記データセットにフィットする曲線の第 2 近似を算出する段階、ここで、前記第 2 非線形関数は、次の形態：

【数18】

$$a + b \cdot x + h \cdot (\text{UnitStep}(x) - \text{UnitStep}(x - cac))$$

30

{式中、UnitStepは、次の形態：

【数19】

$$\text{UnitStep}(x) = \begin{cases} 1 & x \geq 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases}$$

40

[式中、x は、サイクル数である] を有し、

cac は、前記不連続部が発生したサイクルであり、a、b、及び h は、前記パラメータであり、且つ、h は、前記ステップ型不連続部パラメータである}を有し、前記パラメータは、ステップ型不連続部パラメータを含み；

50

- 前記第 1 及び第 2 近似の各々について、以下の式：  
【数 2 0】

$$aic = n \cdot \ln\left(\frac{\|\hat{y} - y\|^2}{n}\right) + 2 \cdot m + \frac{2 \cdot m \cdot (m+1)}{n-m-1}$$

10

{式中、  
【数 2 1】

$$\underline{\dot{y}-y}$$

は、予測残差であり、n は蛍光取得サイクルの数であり、かつm はモデルの自由度である }

により特定されるアカイケ情報係数 ( a i c ) 値を計算することにより、前記第 1 及び第 2 近似のそれぞれのものの情報係数を決定する段階、

- 処理装置により、前記情報係数に基づいて、最小の情報係数を有する前記近似の中の 1 つものを選択する段階、

- 処理装置により、前記選択された近似の前記ステップ型不連続部パラメータの信頼区間 ( ci ) を決定する段階であって、以下の式式：

【数 2 2】

20

$$ci = 1.96 \cdot \sqrt{H_h^{-1} \cdot stdError},$$

30

{式中、1 . 9 6 は、95 % の信頼を表し、 $H^{-1}$  は、h 係数のヘッセ行列の逆行列を表し、かつstdError は、選択されたモデルの標準誤差を表し、ここでヘッセ行列は、以下の式：

【数 2 3】

$$H = J^T \cdot J,$$

40

(式中、J は、ヤコビ行列であり、 $J^T$  は、ヤコビ転置行列である)  
である}

により、信頼区間の幅を決定し、信頼区間の幅が、ゼロを含む場合には、補正が行われず；

- 前記信頼区間が値ゼロを含まない場合に、ゼロに設定された対応する前記ステップ型不連続部パラメータを有する前記選択された近似によって前記データセットの一部を置換する段階、

ここで当該データセットの一部は、第 1 サイクルからアニーリング温度変化の前に発生す

50

るサイクルに対応するデータポイントであるか、第1サイクルからアニーリング温度変化の発生したサイクルに対応するデータポイントであるか、または第1サイクルから始まってアニーリング温度の変化が発生したサイクルの後のサイクルに対応するデータポイントであり、

を含み、前記データセット内のステップ型不連続部を自動的に除去するべく適合されている、キネティックポリメラーゼ連鎖反応（P C R）システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、ポリメラーゼ連鎖反応システムに関し、更に詳しくは、ポリメラーゼ連鎖反応データ内のステップ型不連続部を除去するシステム及び方法に関する。 10

【背景技術】

【0002】

ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction : P C R）は、既定の核酸配列を酵素によって合成又は増幅する生体内（in vivo）法である。その反応は、通常、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、これらが両側の鎖にハイブリダイズし、増幅対象の鑄型又は標的DNA配列に隣接する。プライマーは、熱安定性DNAポリメラーゼの触媒作用によって伸長する。鑄型変性、プライマーアニーリング、及びポリメラーゼによるアニーリングされたプライマーの伸長を伴う反復的な一連のサイクルの結果として、特定のDNA断片が指数的に蓄積される。通常、このプロセスにおいては、増幅プロセスの検出及び定量化を円滑に実行するべく、蛍光プローブ又はマーカーが使用される。 20

【0003】

図1には、代表的なリアルタイムP C R曲線が示されており、代表的なP C Rプロセスにおける蛍光強度値がサイクル数に対してプロットされている。この場合、P C Rプロセスのそれぞれのサイクルにおいて、P C R産物の形成がモニタリングされる。増幅は、通常、増幅反応の際の蛍光信号を計測するコンポーネント及び装置を含むサーモサイクラ内において計測される。このようなサーモサイクラの一例が、Roche Diagnostics Light Cycler (Cat. No. 20110468)である。増幅産物は、例えば、標的核酸にバインドされた際にのみ蛍光信号を放出する蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブにより、或いは、特定のケースにおいては、二本鎖DNAに結合する蛍光染料により、検出される。 30

【0004】

リアルタイムP C Rにおいて使用される蛍光染料は、温度感受性を有する。サーマルサイクリングプロファイルは、アニーリング温度を変更する段階を包含可能である。アニーリング温度の変化は、蛍光読取値の大きさの不連続部として出現する。図2は、サイクル6の後にアニーリング温度の変化が見られる具体例を示す。

【0005】

図2のプロファイルを使用して実施された実験に対応する蛍光データの読取値が図3に示されている。HE Xチャネルにおいて、サイクル5とサイクル6の間に不連続部が存在することがはっきりと分かる。図3は、 $10^4$  IU / m lの濃度を有するB 19パルボウイルスサンプルから採取した。温度に対する感受性が低いF A M染料の場合には、ジャンプ不連続部の大きさが、HE X染料よりも小さくなっている。 40

【0006】

但し、標的の濃度が増加した場合には、不連続部を蛍光データ内に反映させることができない可能性がある。例えば、 $2.9 \times 10^{11}$  IU / m lの濃度を有するB 19パルボウイルスサンプルを検討すれば、サイクル5の後にアニーリング温度の変化が存在したにも拘わらず、不連続部は、図4 aでは見られない。

【0007】

いくつかの現在のP C Rシステムは、アニーリング温度の変化に起因したステップ型不 50

連続部の除去のための方法を実装している。このようなシステムは、通常、予想されるアニーリング温度の変化及び最大蛍光の変化に対応するサイクル数用の検定固有の入力パラメータを必要としている。このような方法は、いくつかの制限を具備する。第1に、これらは、高滴定濃度サンプルを取り扱うことができない。これは、図4 bで見ることができ、この場合には、 $2 \cdot 9 \times 10^{11}$  IU / ml の濃度の B19 パルボサンプルが、このようなシステムによって不正確に取り扱われている。第2に、このような方法が取り扱うことができる原因是、不連続部の地点における小さな最大（例えば、5つの）絶対蛍光単位の変化のみである。不連続部における蛍光変化の大きさは、大きく変化することが複数の検定において観察されている。最大変化を通知するための検定固有の入力のセットアップは、最適化が困難である。第3に、このような方法は、ベースラインドリフトが大きい蛍光データを取り扱うことができないであろう。このようなケースにおいては、提供される補正が不十分なものとなろう。第4に、アニーリング温度の変化に対応するサイクル数から1つ以下のサイクルの距離にスパイクが存在する場合には、提供される補正により、報告される結果濃度の変化、即ち、誤った結果が生成されることが判明している。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

従って、前述の及びその他の問題を克服する、シグモイドタイプ又は成長曲線と、特に、PCR曲線を処理するシステム及び方法を提供することが望ましい。具体的には、これらのシステム及び方法は、確実且つ安定した方式における温度ステップ補正を実装することを要する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

本発明は、PCRプロセスにおいて発生可能な温度シフトについてPCRデータを補正するシステム及び方法を提供する。

#### 【0010】

本発明の態様は、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応データの蛍光のジャンプ不連続（jump discontinuity：第1種不連続部）を除去する。不連続部の存在は、不正確な結果計算を生成可能であり、且つ、従って、除去することが推奨される。標的の初期複写数に応じて、高濃度レベルにおいては、蛍光の不連続部が存在しない可能性がある。8パラメータ非線形モデルの信頼域を使用し、データを正確に推定する。本方法は、すべての濃度レベルにおける不連続部の除去のための従来の方法における問題点を克服する。

#### 【0011】

ある態様においては、データセットをモデル化する非線形関数に非線形回帰プロセスを適用して非線形関数のステップ型不連続部パラメータを含むパラメータを決定することにより、受信したPCRデータセットにフィットする曲線に対する第1近似を決定する。非線形関数の一例は、ダブルシグモイド式である。又、第2の非線形関数に回帰プロセスを適用して第2の関数のステップ型不連続部パラメータを含むパラメータを決定することにより、PCRデータセットにフィットする曲線に対する第2の近似をも決定する。次いで、第1及び第2近似のそれぞれのものについて決定した情報係数に基づいて、第1又は第2近似の中の1つのものを選択する。ステップ型不連続部パラメータについて算出した信頼区間が値ゼロを含む（例えば、信頼区間が、値0を含む範囲（例えば、-1~1）にわたって広がっている）場合には、ステップ補正を実行しない。信頼区間が値ゼロを含まない場合には、ステップ補正を実行する。ステップ補正を実行する場合には、ステップ型変化の前のデータ曲線の部分を、選択された近似の適切な部分と置換することにより、シフト補正済みのデータセットを生成する。特定の態様においては、近似が適合度（goodness of fit）の基準を満足しない場合には、ステップ補正を実行しない。シフト補正済みのデータセットを返し、表示可能であり、さもなければ、更なる処理のために使用可能である。

10

20

30

40

50

## 【0012】

ある態様によれば、成長プロセスを表すデータ内のステップ型不連続部を自動的に除去する方法が提供される。本方法は、通常、成長プロセスを表すデータセットを受信する段階であって、データセットは、複数のデータポイントを含み、それぞれのデータポイントは、座標値のペアを具備する、段階と、非線形回帰プロセスを第1非線形関数に適用して第1関数のパラメータを決定することにより、データセットにフィットする曲線の第1近似を算出する段階であって、パラメータは、ステップ型不連続部パラメータを含む、段階と、を含む。又、本方法は、通常、第2回帰プロセスを第2非線形関数に適用して第2関数のパラメータを決定する段階により、データセットにフィットする曲線の第2近似を算出する段階であって、第2関数のパラメータは、ステップ型不連続部パラメータを含む、段階と、第1及び第2近似のそれぞれのものについて情報係数を決定する段階と、情報係数に基づいて近似の中の1つのものを選択する段階と、をも含む。又、本方法は、通常、選択された近似のステップ型不連続部パラメータの信頼区間を決定する段階と、信頼区間が値ゼロを含まない(例えば、信頼区間が、値0を含まない範囲にわたって広がっている)場合に、ゼロに設定された対応するステップ型不連続部パラメータを有する選択された近似によってデータセットの一部を置換する段階と、をも含む。

10

## 【0013】

別の態様によれば、プロセッサを制御し、成長曲線を表すデータセット内のステップ型不連続部を自動的に除去するコードを含むコンピュータ可読媒体が提供される。コードは、通常、成長プロセスを表すデータセットを受信する段階であって、データセットは、複数のデータポイントを含み、それぞれのデータポイントは、座標値のペアを具備する、段階と、非線形回帰プロセスを第1関数に適用して第1関数のパラメータを決定することにより、データセットにフィットする曲線の第1近似を算出する段階であって、パラメータは、ステップ型不連続部パラメータを含む、段階と、を実行するためのコードを含む。又、コードは、通常、第2回帰プロセスを第2非線形関数に適用して第2関数のパラメータを決定することにより、データセットにフィットする曲線の第2近似を算出する段階であって、第2関数のパラメータは、ステップ型不連続部パラメータを含む、段階と、第1及び第2近似のそれぞれのものについて情報係数を決定する段階と、情報係数に基づいて近似の中の1つものを選択する段階と、を実行するコードをも含む。又、コードは、通常、選択された近似のステップ型不連続部パラメータの信頼区間を決定する段階と、信頼区間が値ゼロを含まない場合に、ゼロに設定された対応するステップ型不連続部パラメーターを有する選択された近似によってデータセットの一部を置換する段階と、を実行する命令をも含む。

20

## 【0014】

更に別の態様によれば、それぞれのものが座標値のペアを具備する複数のデータポイントを含む、キネティックPCR增幅曲線を表すPCRデータセットを生成するキネティックPCR分析モジュールと、インテリジェンスモジュールと、を通常含むキネティックボリメラーゼ連鎖反応(PCR)システムが提供される。インテリジェンスモジュールは、通常、非線形回帰プロセスを第1非線形関数に適用してステップ型不連続部パラメータを含む第1関数のパラメータを決定することによってデータセットにフィットする曲線の第1近似を算出し、且つ、第2回帰プロセスを第2非線形関数に適用してステップ型不連続部パラメータを含む第2関数のパラメータを決定することによってデータセットにフィットする曲線の第2近似を算出することにより、PCRデータセットを処理してデータセット内のステップ型不連続部を自動的に除去するべく適合されている。又、インテリジェンスモジュールは、通常、第1及び第2近似のそれぞれのものについて情報係数を決定し、情報係数に基づいて近似の中の1つのものを選択し、選択された近似についてステップ型不連続部パラメータの信頼区間を決定し、且つ、信頼区間が値ゼロを含んでいない場合に、ゼロに設定された対応するステップ型不連続部パラメータを有する選択された近似によってデータセットの一部を置換するべく、適合されている。

30

## 【0015】

40

50

図面及び請求項を含む本明細書の残りの部分を参照することにより、本発明のその他の特徴及び利点について理解することができよう。以下、添付の図面との関係において、本発明の更なる特徴及び利点と本発明の様々な態様の構造及び動作について詳述する。添付図面においては、類似の参照符号により、同一又は機能的に類似した要素を示している。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】PCRプロセスの環境における增幅曲線の一例を示す。

【図2】サイクル6の後にアニーリング温度の変化が見られる具体例を示す。

【図3】 $10^4 \text{ IU}/\text{ml}$ の濃度を有するB19バルボウイルスサンプルから採取されたFEM及びHEXチャネルにおけるPCR増幅曲線を示す。 10

【図4A】標的の濃度が増大した場合に、不連続部が蛍光データ内に反映されない可能性があることを示すPCR増幅曲線を示す。

【図4B】標的の濃度が増大した場合に、不連続部が蛍光データ内に反映されない可能性があることを示すPCR増幅曲線を示す。

【図5】PCR増幅曲線内の温度シフトを補正するプロセスの一態様を示す。

【図6A】本発明の一態様によるスパイク識別及び置換プロセスの詳細なプロセスフローを示す。

【図6B】本発明の一態様によるスパイク識別及び置換プロセスの詳細なプロセスフローを示す。

【図6C】本発明の一態様によるスパイク識別及び置換プロセスの詳細なプロセスフローを示す。 20

【図6D】本発明の一態様によるスパイク識別及び置換プロセスの詳細なプロセスフローを示す。

【図6E】本発明の一態様によるスパイク識別及び置換プロセスの詳細なプロセスフローを示す。

【図7】パラメータa～gを含むダブルシグモイド式の分解を示す。パラメータa～gは、ダブルシグモイド曲線の形状及び位置を定義する。

【図8】曲線及び変曲点のx値である(e)の位置に対するパラメータ(d)の影響を示す。図8の曲線は、いずれも、パラメータdを除いて、同一のパラメータ値を具備する。 30

【図9】異なるパラメータセットにおける3つの曲線形状の一例を示す。

【図10A】ある観点によるダブルシグモイド式のパラメータ(e)及び(g)の値を決定するプロセスを示す。

【図10B】ある観点によるダブルシグモイド式のパラメータ(e)及び(g)の値を決定するプロセスを示す。

【図11A】パラメータの初期セットにおけるLevenberg-Marquardt回帰プロセスのプロセスフローを示す。

【図11B】パラメータの初期セットにおけるLevenberg-Marquardt回帰プロセスのプロセスフローを示す。

【図11C】パラメータの初期セットにおけるLevenberg-Marquardt回帰プロセスのプロセスフローを示す。 40

【図11D】パラメータの初期セットにおけるLevenberg-Marquardt回帰プロセスのプロセスフローを示す。

【図12】CAP/CTM HIVモニタ検定からのIQS(HEXチャネル)蛍光データを示す。未加工の蛍光データは、点線で示されており、補正済みのデータは、実線で示されている。

【図13】B19バルボウイルス標的チャネル(FAMチャネル)検定の(実際の標的の増幅を伴わない)蛍光データを示す。未加工の蛍光データは、点線で示されており、補正済みのデータは、実線で示されている。

【図14】HBV High Pure(FAMチャネル)の標的の蛍光データを示す。未加工の蛍光データは、点線で示されており、補正済みのデータは、実線で示されている。 50

。この検定は、ジャンプ不連続部を具備しておらず、従って、不連続部の補正は不要である。

【図15】高濃度 ( $2.9 \times 10^{11}$  IU / ml) のB19パルボウイルスサンプル (FAMチャネル) 検定の蛍光データを示す。未加工の蛍光データは、点線で示されており、補正済みのデータは、実線で示されている。

【図16】本発明の方法及びシステムを実装するべく使用可能なソフトウェア及びハードウェアリソースの間の関係を示す概略ブロックダイアグラムの一例である。

【図17】サーモサイクラ装置とコンピュータシステムの間の関係を示す概略ブロックダイアグラムの一例である。

#### 【発明を実施するための形態】

10

#### 【0017】

本発明は、増幅プロセスにおいて発生可能な温度シフトについてPCR増幅曲線及びその他の成長曲線を補正するシステム及び方法を提供する。

#### 【0018】

温度シフトの一例は、検定の際の特定のサイクル内におけるアニーリング温度の制御された変化である。通常、この温度シフトは、ベースライン領域によって表されるプロセスの一部に発生する。この温度変化は、シフトが発生したサイクル数に、蛍光信号における後続のシフトを生成する。本明細書においては、温度シフトが発生したサイクルをCAC (Cycle of Annealing change: アニーリングが変化したサイクル) と呼ぶこととする。

20

#### 【0019】

ある態様においては、データセットをモデル化する非線形関数に非線形回帰プロセスを適用して非線形関数のステップ型不連続部パラメータを含むパラメータを決定することにより、PCRデータセットにフィットする曲線に対する第1近似を決定する。非線形関数の一例は、後程詳述するダブルシグモイド式である。又、回帰プロセスを第2非線形関数に適用して第2関数のステップ型不連続部パラメータを含むパラメータを決定することにより、PCRデータセットにフィットする曲線に対する第2近似をも決定する。次いで、第1及び第2近似のそれぞれものについて決定した情報係数に基づいて、第1又は第2近似の中の1つのものを選択する。ステップ型不連続部パラメータについて算出した信頼区間が値ゼロを含む(例えば、信頼区間が、値0を含む範囲にわたって広がっている)場合には、ステップ補正を実行しない。信頼区間が値ゼロを含まない場合には、ステップ補正を実行する。ステップ補正を実行する場合には、ステップ型変化の前のデータ曲線の部分を、選択された近似の適切な部分によって置換することにより、シフト補正済みのデータセットを生成する。特定の態様においては、近似が適合度の基準を満足しない場合には、ステップ補正を実行しない。シフト補正済みのデータセットを返し、表示可能であり、さもなければ、更なる処理のために使用可能である。例えば、シフト補正済みのデータセットを使用し、PCR検定のCt値を決定可能である。

30

#### 【0020】

PCRプロセスの環境における増幅曲線10の一例が図1に示されている。図示のように、曲線10は、ラグフェーズ領域15と、指数フェーズ領域25と、を含む。ラグフェーズ領域15は、一般に、ベースライン又はベースライン領域と呼ばれている。このような曲線10は、ラグフェーズ領域と指数フェーズ領域をリンクする関心の対象である遷移領域20を含む。領域20は、一般に、エルボー又はエルボー領域と呼ばれている。エルボー領域は、通常、基礎をなすプロセスの成長又は増幅レートにおけるベースライン領域の末尾及び遷移部を定義する。領域20内の特定の遷移点の識別は、基礎をなすプロセスの振る舞いを分析するのに有用であろう。代表的なPCR曲線においては、エルボー値又はサイクル閾値(Ct)と呼ばれる遷移点の識別は、PCRプロセスの効率特性を理解するのに有用である。

40

#### 【0021】

類似のシグモイド又は成長曲線を提供可能であるその他のプロセスは、バクテリアプロ

50

セス、酵素プロセス、及びバインディングプロセスを含む。例えば、バクテリア成長曲線においては、関心の対象である遷移点は、ラグフェーズ内の時間と呼ばれている。本発明によって分析可能であるデータ曲線を生成するその他の特定のプロセスは、SDA (Strand Displacement Amplification) プロセス、NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) プロセス、及びTMA (Transcription Mediated Amplification) プロセスを含む。SDA 及びNASBA プロセス及びデータ曲線の例については、それぞれ、Wang, Sha-Sha他による「Homogeneous Real-Time Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms by Strand Displacement Amplification on the BD ProbeTec ET System」(Clin Chem 2003; 49(10): 1599) 及びWeusten, Jos J.A.M.他による「Principles of Quantitation of Viral Loads Using Nucleic Acid Sequence-Based Amplification in Combination With Homogeneous Detection Using Molecular Beacons」(Nucleic Acids Research, 2002; 30(6): 26) に見出すことができる。従って、本明細書の残りの部分は、PCR曲線に対するその適用性の観点において本発明の態様及び観点について説明しているが、本発明は、その他のプロセスに関係したデータ曲線に適用することも可能であることを理解されたい。10  
20

#### 【0022】

図1に示されているように、代表的なPCR成長曲線のデータは、PCRサイクル数がx軸を定義し、且つ、蓄積されたポリヌクレオチド成長のインジケータがy軸を定義する2次元座標系において表現可能である。通常、図1に示されているように、蓄積された成長のインジケータは、蛍光強度値であり、この理由は、蛍光マーカーの使用が、おそらくは、最も広範に使用されている標識方式であるということによる。但し、使用される特定の標識及び/又は検出方式に応じて、その他のインジケータを使用することも可能であることを理解されたい。発生量又は蓄積された信号成長のその他の有用なインジケータの例は、ルミネッセンス強度、ケミルミネッセンス強度、バイオルミネッセンス強度、熒光強度、電荷移動、電圧、電流、電力、エネルギー、温度、粘度、光散乱、放射線強度、反射率、透過率、及び吸収率を含む。又、サイクルの定義も、時間、プロセスサイクル、単位動作サイクル、及び再生サイクルを包含可能である。30

#### 【0023】

本発明によれば、キネティックPCR增幅曲線の温度シフトについて補正するプロセス100のある観点は、図5を参照して説明可能である。段階110において、曲線を表す実験データセットを受信するか、さもなければ、取得する。又、温度シフトが発生したサイクルも識別する。通常、このサイクルの値は、先駆的に判明しており、例えば、データを供給する装置又は機器によって記録される。プロットされたPCRデータセットの例が図1、図3、及び図4に示されており、この場合に、y軸及びx軸は、それぞれ、PCR曲線における蛍光強度及びサイクル数を表している。特定の態様においては、データセットは、連続的であると共に軸に沿って均一に離隔したデータを含むことを要する。40

#### 【0024】

サーモサイクラなどのPCRデータ取得装置内に存在するインテリジェンスマジュール(例えば、命令を実行するプロセッサ)内にプロセス100を実装するケースにおいては、データセットは、データの収集に伴って、リアルタイムでインテリジェンスマジュールに供給可能であり、或いは、メモリユニット又はバッファ内に保存し、実験が完了した後にインテリジェンスマジュールに供給することも可能である。同様に、データセットは、(例えば、LAN、VPN、インターネット、インターネットなどの)ネットワーク接続又は取得装置に対する(例えば、USB又はその他の直接的な有線又は無線接続などの)50

直接接続を介して、デスクトップコンピュータやその他のコンピュータシステムなどの別個のシステムに供給することも可能であり、或いは、C D、D V D、フロッピー（登録商標）ディスク、携帯型U S B ドライブ、又はこれらに類似したものなどの携帯型媒体上において供給することも可能である。特定の態様においては、データセットは、座標値のペア（又は、2次元ベクトル）を具備するデータポイントを含む。P C R データの場合には、座標値のペアは、通常、サイクル数と蛍光強度値を表す。段階110においてデータセットを受信又は取得した後に、データセットを更に分析し、例えば、検定の際の温度シフトについて補正可能である。

## 【0025】

段階120において、例えば、サイクル1から最終サイクルまでのデータセットに基づいて、第1近似を演算する。この段階においては、ある態様においては、L e v e n b e r g - M a r q u a r d t ( L M ) 回帰プロセス又はその他の回帰プロセスによって決定されたパラメータを有するダブルシグモイド関数を使用し、データセットを表す曲線の近似を見出している。又、後程詳述するように、段階120においては、データセットに基づいて、第1近似とは異なる第2近似をも演算する。

## 【0026】

ある態様によれば、その内部に内蔵されたステップ関数を有する非線形モデルの信頼域を使用している。ある態様によれば、「P C R E l b o w D e t e r m i n a t i o n U s i n g C u r v a t u r e A n a l y s i s o f a D o u b l e S i g m o i d」という名称の米国特許出願第11/533,291号及び「P C R E l b o w D e t e r m i n a t i o n U s i n g Q u a d r a t i c T e s t f o r C u r v a t u r e A n a l y s i s o f a D o u b l e S i g m o i d」という名称の米国特許出願第11/861,188号に提示されたダブルシグモイドモデルに基づいて構築することにより、次の式1に規定された関数を第1非線形モデルとして使用している。

## 【0027】

## 【数1】

$$a + b \cdot x + \frac{c}{(1 + \exp(-d \cdot (x - e)))(1 + \exp(-f \cdot (x - g)))} + h \cdot (\text{UnitStep}(x) - \text{UnitStep}(x - cac))$$

## 式1 非線形モデル

## 【0028】

式1において、{ a、b、c、d、e、f、g、h } は、モデル係数であり、cac は、アニーリング温度が変化したサイクル数である。cac 値は、既知であり、且つ、システムによって供給される。係数「h」は、ジャンプ不連続部の大きさを表す。（例えば、後程詳述するL e v e n b e r g - M a r q u a r d t 法などの）非線形回帰法を使用し、非線形モデルに対応する係数を導出する。非線形回帰は、通常、アプリケーションに固有である適切な大域的収束のために、初期係数の組を必要とする。回帰プロセス及びパラメータ決定の詳細については、更に詳しく後述する。

## 【0029】

ある態様においては、式2に定義されたU n i t S t e p 関数を使用する。

## 【0030】

【数2】

$$\text{UnitStep}(x) = \begin{cases} 1 & x \geq 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases}$$

式2 UnitStep関数

【0031】

ある態様によれば、第2モデルを式3のように規定している。

【0032】

【数3】

$$a + b \cdot x + h \cdot (\text{UnitStep}(x) - \text{UnitStep}(x - cac))$$

式3 追加の非線形モデル

【0033】

ある観点においては、第2非線形モデルを使用し、標的を有していない反応井戸から生成された蛍光データを正確に表現している。（例えば、最小二乗Q R Dフィットやその他の回帰法などの）非線形回帰法を使用し、第2非線形モデルに対応する係数を導出する。

【0034】

厳格な数学的観点においては、且つ、前述の態様の式において観察可能であるように、本発明の方法において実装される第2関数は、非線形関数ではなく、線形関数と表記可能であろう。但し、本発明の方法においては、この第2関数を非線形関数として取り扱っているため、本特許出願の文脈においては、これを非線形関数と表記する。

【0035】

ある態様によれば、段階130において、式1に規定されたモデルと式3に規定されたモデルの間において選択を実行する。式1に規定されたモデルと式3に規定されたモデルの間の選択は、特定の観点においては、非パラメトリック情報理論に基づいた方法を使用して実行される。ある態様においては、式4に定義された改良型Akaike Information Coefficient (aic)を非線形回帰モデル（式1及び2）のそれぞのものについて算出している。この態様においては、最小の係数を有する回帰モデルがベストフィットであると仮定している。ある観点においては、バイアス値を式3によって規定されたモデルから減算している。このバイアスにより、成長を伴わないサンプルを正確に検出可能である。バイアス値は、0（バイアスなし）～約50の範囲をとることができる。特定の観点においては、約10のバイアスを減算している。

【0036】

【数4】

$$aic = n \cdot \ln \left( \frac{\|\hat{\mathbf{y}} - \mathbf{y}\|^2}{n} \right) + 2 \cdot m + \frac{2 \cdot m \cdot (m+1)}{n-m-1}$$

式4 改良型Akaike情報係数

10

20

30

40

50

【0037】

式4において、

【0038】

【数5】

 $(\bar{y} - y)$ 

【0039】

10

は、予測残差であり、nは、蛍光取得サイクルの数であり、且つ、mは、モデルの自由度である（例えば、式1の場合には、8であり、式3の場合には、3である）。

【0040】

ある態様によれば、段階140において、（例えば、 $R^2$ などの）適合度統計値を算出し、モデル式が実際に蛍光データにマッチングしていることを検証する。この統計値が、予め定義された範囲を外れている場合には、モデルは、収束しておらず、従って、蛍光の不連続部補正を実行しない。例えば、ある観点においては、 $R^2 < 0.8$ である場合に、収束は実現されない。

【0041】

$R^2$ 値は、未加工の曲線（蛍光データ）及び推定モデルとの関係において演算される。  
ある観点においては、 $R^2$ 値を演算するための式は、次のように付与される。

20

【0042】

【数6】

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=0}^{n-1} (f(x_i) - y_i)^2}{\sum_{i=0}^{n-1} (y_i - \bar{y})^2},$$

30

【0043】

ここで、yは、未加工のデータ曲線を表し、f(x)は、モデル化された曲線を表し、  
【数7】

 $\bar{y}$ 

は、未加工のデータ曲線の平均値を表し、且つ、nは、未加工のデータ曲線の（サイクル数を単位とする）長さを表す。

40

【0044】

ある態様によれば、段階150において、いずれが選択されたのかに応じて、式1又は式3から、h係数の信頼区間を所与の（例えば、90%～99.9%の間の95%などの）信頼レベルにおいて算出する。この信頼区間が値ゼロを含む場合には、モデルは、過剰決定パラメータとしての係数hを具備する。このようなケースにおいては、データ内の不連続部は識別されず、従って、蛍光の不連続部補正是不要である。h係数の信頼区間演算は、選択されたモデル及びモデルの標準誤差に依存している。特定の態様においては、信頼区間の幅を次のように決定している。

【0045】

## 【数8】

$$ci = 1.96 \cdot \sqrt{H_h^{-1} \cdot stdError},$$

## 【0046】

ここで、1.96は、95%の信頼を表し、 $H^{-1}$ は、 $h$ 係数のヘッセ行列の逆行列を表し、且つ、stdErrorは、選択されたモデルの標準誤差を表す。ヘッセ行列は、  
次のように演算される。

## 【0047】

## 【数9】

$$H = J^T \cdot J,$$

## 【0048】

ここで、 $J$ は、ヤコビ行列であり、 $J^T$ は、ヤコビ転置行列である。ヤコビは、すべての蛍光サイクルにおけるそれぞれのモデル係数の一次偏微分係数の評価である。標準誤差は、次のように演算される。

## 【0049】

## 【数10】

$$stdError = \frac{\sum_{i=0}^{n-1} (f(x_i) - y_i)^2}{n-2},$$

## 【0050】

ここで、 $y$ は、未加工の曲線を表し、 $f(x)$ は、モデル化された曲線を表し、且つ、 $n$ は、曲線の長さを表す。信頼区間の下限及び上限は、 $h \pm ci$ として演算され、ここで、 $h$ の値は、推定モデルによって付与される。

## 【0051】

段階140及び段階150（段階165を含む）は、相互交換可能であり、且つ、いずれも任意選択であることを理解されたい。

## 【0052】

ある態様によれば、段階170において、ステップ又はシフト補正済みのデータセットを生成する。ある観点においては、係数 $h$ をゼロに等しくなるように設定することによって選択されたモデルから得られた値により、未加工の蛍光強度データ値を置換している。ある観点においては、アニーリング温度の変化の前に発生するサイクルについて置換を実行し、これにより、ジャンプ不連続部を効果的に除去すると共に滑らかな遷移を保証している。ある観点においては、例えば、サイクル1～サイクル $cac+1$ のように、第1サイクルから始まってアニーリング温度の変化が発生したサイクルの後のサイクルを含むものまで、置換を実行している。

## 【0053】

段階175において、例えば、表示又は更なる処理のために、変更されたシフト補正済

10

20

30

40

50

みのデータセットを返す。例えば、補正済みの曲線を処理して C t 値を決定可能であり、且つ、結果（シフト補正済みのデータ及び / 又は C t 値）を、例えば、分析を実行したシステムに、或いは、分析を要求した別個のシステムに返すことができる。図 5 の分析を実行したシステムに結合されたモニタ画面又はプリンタなどの表示装置によってグラフィカルな表示を生成可能であり、或いは、表示装置上においてレンダリングするべく別個のシステムにデータを供給することも可能である。C t 値は、補正済みのデータセットを使用して様々な方法に従って決定可能である。例えば、ある観点においては、米国特許出願第 11 / 316,315 号及び第 11 / 349,550 号の開示内容を使用し、C t 値を決定可能である。

## 【0054】

10

ある態様においては、式 1 には、係数の 3 つの組を導出するための 3 つの異なる開始条件を提供し、且つ、式 3 には、係数の単一の組を導出するための開始条件の単一の組を提供している。この態様においては、前述のように、係数の 4 つの導出された組を使用して式 4 を処理し、最小の a i c 値を有するモデルを決定する。プロセスをモデル化するべく使用される非線形形式のそれぞれのものごとに、異なる開始条件を使用可能であることを理解されたい。特定の態様においては、開始条件は、経験的に決定される。

## 【0055】

図 6 の段階 502 ~ 段階 524 は、データセットの曲線を近似すると共にフィット関数のパラメータを決定するプロセスフローを示す。ある態様においては、Levenberg - Marquardt (LM) 法を使用し、曲線のポイント上におけるデータセットの安定した曲線近似を算出する。LM 法は、非線形回帰プロセスであり、これは、非線形関数とデータセットの間の距離を最小化する反復的な技法である。このプロセスは、とうげ点プロセスとガウス - ニュートンプロセスの組み合わせのように動作し、現在の近似が良好にフィットしない場合には、とうげ点プロセスのように動作するが（相対的に低速であるが、相対的に信頼性の高い収束）、現在の近似が正確になるのに伴って、ガウス - ニュートンプロセスのように動作することになる（相対的に高速であるが、相対的に信頼性の乏しい収束）。

20

## 【0056】

一般に、LM 回帰法は、様々な入力を必要とすると共に出力を供給するアルゴリズムを含む。ある観点においては、入力は、処理対象のデータセットと、データをフィッティングするのに使用される関数と、関数のパラメータ又は変数の初期推定値と、を含む。出力は、関数とデータセットの間の距離を極小化する関数のパラメータの組を含む。

30

## 【0057】

ある態様によれば、フィット関数は、次の形態のダブルシグモイドである。

## 【0058】

## 【数 11】

$$f(x) = a + bx + \frac{c}{(1 + \exp^{-d(x-e)})(1 + \exp^{-f(x-g)})}. \quad (5)$$

40

## 【0059】

この式のフィット関数としての選択は、一般的な PCR 曲線又はその他の成長曲線がとり得る様々な曲線形状にフィットするその柔軟性及びその能力に基づくものである。当業者は、前述のフィット関数の変形又はその他のフィット関数を必要に応じて使用可能であることを理解するであろう。例えば、ある態様においては、式 1 が使用される。

## 【0060】

ダブルシグモイド式 (5) は、a、b、c、d、e、f、及び g という 7 つのパラメー

50

タを具備し、式 1 は、a、b、c、d、e、f、g、及びhという8つのパラメータを具備する。この式は、定数、スロープ、及びダブルシグモイドの合計に分解可能である。ダブルシグモイド自体は、2つのシグモイドの乗算である。図7は、ダブルシグモイド式(5)の分解を示す。パラメータd、e、f、及びgは、2つのシグモイドの形状を決定する。最終的な曲線に対するこれらの影響を示すべく、次の単一のシグモイドを検討してみよう。

【0061】

【数12】

$$\frac{1}{1 + \exp^{-d(x-e)}}, \quad (6)$$

【0062】

ここで、パラメータdは、曲線の「鋭さ」を決定し、且つ、パラメータeは、変曲点のx値を決定する。図8は、曲線に対するパラメータdの、そして、変曲点のx値の位置に対するパラメータeの影響を示す。次の表1は、ダブルシグモイド曲線に対するパラメータの影響を示している。

【0063】

【表1】

10

表1：ダブルシグモイドパラメータの説明

パラメータ	曲線に対する影響
a	x = 0におけるyの値
b	ベースライン及びプラトーのスロープ
c	曲線のAFI
d	第1シグモイドの「鋭さ」(図9を参照)
e	第1シグモイドの変曲点の位置(図10を参照)
f	第2シグモイドの「鋭さ」
g	第2シグモイドの変曲点の位置

20

【0064】

ある観点においては、曲線が非現実的な形状をとることを防止するべく、ダブルシグモイド式の「鋭さ」パラメータd及びfを制限する必要がある。従って、ある観点においては、d < -1又はd > 1.1、或いは、f < -1又はf > 1.1におけるすべての反復を不成功と見なしている。その他の態様においては、パラメータd及びfに対する異なる制限を使用可能である。

【0065】

Levenberg - Marquardtアルゴリズムは、反復的なアルゴリズムであるため、通常、フィットのための関数パラメータの初期推定値が必要である。初期推定値が良好であるほど、近似が良好になり、且つ、アルゴリズムが局所的な最小値に向かって収束する確率が低下する。ダブルシグモイド関数の複雑性及びPCR曲線又はその他の成長曲線の様々な形状に起因し、アルゴリズムがしばしば局所的な最小値に向かって収束することを防止するには、すべてのパラメータ用の1つの初期推定値では、十分ではない可能性がある。従って、ある観点においては、初期パラメータの複数(例えば、3つ以上)の組を入力し、且つ、最良の結果を保持している。ある観点においては、パラメータの大部分を、使用されるパラメータの複数の組にわたって一定に保持しており、パラメータc、d、及fのみが複数のパラメータセットのそれぞれのものについて異なるものであって

30

40

50

よい。図9は、異なるパラメータセットにおける3つの曲線形状の例を示す。これらのパラメータの3つの組の選択肢は、P C Rデータを表す曲線の3つの可能な異なる形状を示す。パラメータの3つを上回る数の組を処理し、且つ、最良の結果を保持可能であることを理解されたい。

#### 【0066】

図6に示されているように、段階510において、LM法の初期入力パラメータを識別する。これらのパラメータは、オペレータによって入力可能であり、或いは、算出することも可能である。ある観点によれば、後述するように、段階502、504、及び506に従ってパラメータを決定又は設定している。

#### 【0067】

初期パラメータ(a)の算出：パラメータ(a)は、ベースラインの高さであり、この値は、初期パラメータのすべての組について同一である。ある観点においては、段階504において、データセットから、例えば、蛍光値などの3番目に小さいy軸値をパラメータ(a)に割り当てている。これにより、安定した計算が実現する。当然のことながら、その他の態様においては、必要に応じて、最低のy軸値や2番目に小さい値などの任意の他の蛍光値をパラメータ(a)に割当可能である。

10

#### 【0068】

初期パラメータ(b)の計算：パラメータ(b)は、ベースライン及びプラトーのスロープである。この値は、初期パラメータのすべての組について同一である。ある観点においては、段階502において、0.01という固定値を(b)に割り当てており、これは、理想的には、スロープが存在するべきではないという理由による。その他の態様においては、例えば、0～約0.5の範囲の値などの異なる値をパラメータ(b)に割り当て可能である。ある観点においては、値(b)は、CAC+1からベースラインの末尾までのベースラインのスロープを表す。

20

#### 【0069】

初期パラメータ(c)の計算：パラメータ(c)は、プラトーの高さからベースラインの高さを減算したものを意味しており、これは、AFI(Absolute Fluorescence Increase)と表記される。ある観点においては、パラメータの第1の組については、 $c = AFI + 2$ であり、最後の2つのパラメータについては、 $c = AFI$ である。これが図9に示されており、この場合には、最後の2つのパラメータの組については、 $c = AFI$ であり、パラメータの最初の組については、 $c = AFI + 2$ である。この変化は、パラメータの第1の組によってモデル化された曲線の形状に起因するものであり、これは、プラトーを具備していない。

30

#### 【0070】

パラメータ(d)及び(f)の計算：パラメータ(d)及び(f)は、2つのシグモイドの鋭さを定義している。これらのパラメータにおける曲線に基づいて近似を付与する方法は存在しないことから、ある観点においては、段階502において、3つの代表的な固定値を使用している。その他の固定された又は固定されていない値をパラメータ(d)及び/又は(f)に使用することも可能であることを理解されたい。これらのペアは、遭遇するP C R曲線の最も共通的な形状をモデル化する。次の表2は、図9に示されたパラメータの異なる組における(d)及び(g)の値を示す。

40

#### 【0071】

## 【表2】

表2：パラメータd及びfの値

パラメータセット番号	dの値	fの値
1	0.1	0.7
2	1.0	0.4
3	0.35	0.25

## 【0072】

パラメータ(e)及び(g)の計算：段階506において、パラメータ(e)及び(g)を決定する。パラメータ(e)及び(g)は、2つのシグモイドの変曲点を定義している。ある観点においては、これらは、いずれも、すべての初期パラメータセットにわたって、同一の値をとる。パラメータ(e)及び(g)は、同一又は異なる値を具備可能である。近似を見出すべく、ある観点においては、例えば、蛍光などの強度の平均を上回る第1ポイントのx値を使用している（これは、スパイクではない）。この態様に従って(e)及び(g)の値を決定するプロセスが図10に示されており、且つ、以下、これについて説明する。この態様に従ってパラメータ(e)及び(g)及びその他のパラメータの値を決定するプロセスの更に詳細な説明は、米国特許出願第11/316,315号に見出すことができる。

10

## 【0073】

図10を参照すれば、まず、（例えば、蛍光強度などの）曲線の平均を決定する。次に、平均を上回る第1データポイントを識別する。次いで、a. そのポイントが、曲線の、例えば、最初の5サイクル内などのような開始点の近傍に位置していないかどうか、b. そのポイントが、曲線の、例えば、最後の5つのサイクル内などのような末尾の近傍に位置していないかどうか、並びに、c. そのポイントの周り（例えば、その周りの2ポイントの半径内）の微分係数が、符号の変化を示していないかどうかを決定する。これらが変化を示している場合には、そのポイントは、スパイクである可能性が高く、且つ、従って、拒絶することを要する。

20

## 【0074】

別の態様においては、係数(e)及び(g)の決定において、cacサイクルの後のサイクルの蛍光値のみを検討している。従って、近似を見出すべく、cacから最後のサイクルまでのサイクルの、例えば、蛍光などの強度の平均を上回る（スパイクではない）第1ポイントのx値を使用する。まず、（サイクルcacから最後のサイクルまでの）曲線の平均を決定し、且つ、平均を上回る第1ポイントを決定する。このようなポイントが見出されない場合には、ある観点においては、未加工の曲線の長さの2/3を検討する。

30

## 【0075】

次の表3は、ある観点による図9において使用される初期パラメータ値の例を示す。

## 【0076】

【表3】

初期パラメータセット番号	1	2	3
aの値	3番目に小さい蛍光値	3番目に小さい蛍光値	3番目に小さい蛍光値
bの値	0. 0 1	0. 0 1	0. 0 1
cの値	3番目に大きい蛍光値	3番目に大きい蛍光値	3番目に大きい蛍光値
dの値	- a + 2	- a	- a
eの値	0. 1	1. 0	0. 3 5
fの値	蛍光の平均を上回る第1の 非スパイクポイントのX	蛍光の平均を上回る第1の 非スパイクポイントのX	蛍光の平均を上回る第1の 非スパイクポイントのX
gの値	0. 7	0. 4	0. 2 5

## 【0077】

図6を再度参照すれば、段階510において、すべてのパラメータが設定されたら、入力されたデータセット、閾数、及びパラメータを使用し、LMプロセス520を実行する。従来、Levenberg - Marquardt法は、非線形最小二乗問題を解決するべく使用されている。従来のLM法は、曲線近似とデータセットの間の誤差の二乗の合計として定義された距離尺度を算出している。しかしながら、二乗の合計を極小化する場合には、異常値の距離がスパイクではないデータポイントの距離を上回っていることから、異常値に対して大きな重みが付与されることになり、この結果、しばしば、不適切な曲線、又は望ましくない曲線が得られる。従って、本発明のある観点によれば、絶対誤差の合計を極小化することにより、近似とデータセットの間の距離を演算しており、この理由は

、この場合には、大きな重みが異常値に対して付与されないためである。この様子においては、近似とデータの間の距離は、次式によって付与される。

【0078】

【数13】

$$\text{距離} = \sum |y_{\text{data}} - y_{\text{approximation}}|. \quad (7)$$

10

【0079】

上述のように、ある様子においては、段階522及び524に示されているように、初期パラメータの複数（例えば、3つ）の組のそれらのものを入力して処理した後に、最良の結果を保持しており、この場合に、最良の結果とは、式(7)における最も小さい又は最小の距離を提供するパラメータセットである。ある観点においては、パラメータの大部分をパラメータの複数の組にわたって一定に保持しており、パラメータのそれらの組について異なることができる原因是、c、d、及びfのみである。任意の数の初期パラメータセットを使用可能であることを理解されたい。

【0080】

図11は、本発明によるパラメータの組におけるLMプロセス520のプロセスフローを示す。前述のように、Levenberg-Marquardt法は、とうげ点プロセスのように、又はガウス-ニュートンプロセスのように動作可能である。この動作は、減衰係数に依存している。が大きいほど、Levenberg-Marquardtアルゴリズムは、とうげ点プロセスのように動作する。一方、が小さいほど、Levenberg-Marquardtアルゴリズムは、ガウス-ニュートンプロセスのように動作することになる。ある観点においては、は、0.001から始まっている。は、約0.000001～約1.0などの任意のその他の値から始まることも可能であることを理解されたい。

20

【0081】

前述のように、Levenberg-Marquardt法は、反復的な技法である。ある観点によれば、図11に示されているように、それぞれの反復において、次の段階を次実行している。

30

【0082】

1. 先行する近似のヘッセ行列 ( $H$ ) を算出する。

【0083】

2. 先行する近似の転置ヤコビ行列 ( $J^T$ ) を算出する。

【0084】

3. 先行する近似の距離ベクトル ( $d$ ) を算出する。

【0085】

4. 現在の減衰係数により、次のように、ヘッセ行列の対角項を増大させる。

40

【0086】

【数14】

$$H_{\text{aug}} = H\lambda \quad (8)$$

【0087】

5. 増大した式を次のように解く。

50

【0088】

【数15】

$$H_{\text{aux}} x = J^T d \quad (9)$$

【0089】

6. 増大した式の解  $x$  を関数のパラメータに追加する。

【0090】

7. 新しい近似及び曲線の間の距離を算出する。

10

【0091】

8. このパラメータの新しい組に伴う距離が以前のパラメータの組に伴う距離を下回っている場合には、・その反復は成功であると見なされ、・新しいパラメータの組を保持又は保存し、且つ、・例えば、係数 10だけ、減衰係数  $\alpha$  を低減する。

【0092】

新しいパラメータの組に伴う距離が以前のパラメータの組に伴う距離を上回っている場合には、・その反復は失敗であると見なされ、・新しいパラメータの組を破棄し、且つ、・例えば、係数 10だけ、減衰係数  $\alpha$  を増大させる。

【0093】

ある観点においては、図 11 の LM プロセスは、次の基準の中の 1 つのものが実現される時点まで反復される。

20

【0094】

1. 既定の回数  $N$  だけ既に反復されている。この第 1 基準は、アルゴリズムが無制限に反復されることを防止する。例えば、図 10 に示されたある観点においては、既定の反復値  $N$  は、100 である。アルゴリズムが収束可能である場合には、100 回の反復は、アルゴリズムが収束するのに十分であるはずである。一般に、 $N$  は、10 未満から 100 以上の範囲をとることができる。

【0095】

2. 2 つの成功した反復の間の距離の差が、例えば、0.0001などの閾値を下回っている。差が非常に小さくなった際には、所望の精度が実現されており、解は、それ以上大幅に良好にはなることはないことから、反復を継続するのは無意味である。

30

【0096】

3. 減衰係数  $\alpha$  が既定の値を超過し、例えば、 $10^{20}$ を上回っている。 $\alpha$  が非常に大きくなった際には、アルゴリズムは、現在の解よりも良好に収束することなく、従って、反復を継続するのは無意味である。一般に、規定値は、 $10^{20}$ を大幅に下回る又は上回るものであってよい。

【0097】

別の態様によれば、使用する Levenberg - Marquardt 法は、次の式 10 に規定された式と等価である。初期条件  $z_0$  及び（例えば、既定により、 $10^{-3}$  に設定される）精度レベル  $tol$  を有するベクトル関数

40

【0098】

【数16】

$$f(z) : \mathbb{R}^m \rightarrow \mathbb{R}^n$$

【0099】

が付与された場合に、式 10 は、真である。関数  $J(z)$  は、関数  $f(z)$  のヤコビ行列

50

として定義される。変数 `maxiter` は、反復の最大数である（例えば、既定により、`100` に設定される）。変数 `λ` は、回帰における減衰係数である。

【0100】

【数17】

```

λ = 0.01 tol
iter = 0
z = z₀
while( (||f(z)||² > tol ) and (λ ≤ 10²⁰) and (iter < maxiter) )
    zₙₑₜ = z + ((J(z))ᵀ · J(z) + ((J(z))ᵀ · J(z)) · (λ · I))⁻¹ · f(z)
    if( ( 0.5 · (zₙₑₜ - z)ᵀ · (λ · (zₙₑₜ - z) - (J(z))ᵀ · f(z)) ) > 0 )
        z = zₙₑₜ
        λ = λ / 2
    else
        λ = 2 λ
    end if
    iter = iter + 1
end while

```

式10 Levenberg - Marquardt 非線形回帰

【0101】

式10における逆行列は、QR分解によって取得される。ある観点においては、QR分解は、Anderson, E. (編集) の「LAPACK Users' Guide」(第3版、Philadelphia, PA: Society for Industrial and Applied Mathematics、1999年) のDGELES法に類似している。逆行列を決定不能である場合には、`λ` に2(又は、その他の値) を乗算して回帰を継続する。

【0102】

本発明の方法、システム、及びコンピュータ可読媒体の特定の態様においては、第1及び第2近似のそれぞれのものの情報係数を決定する段階は、第1及び第2近似のそれぞれのもののAIC(Akaike Information Coefficient)値を算出する段階を包含可能である。

【0103】

特定の態様においては、本発明による方法、システム、及びコンピュータ可読媒体は、第2非線形関数について算出されたAIC値からバイアス値を減算する段階を更に包含可能である。

【0104】

本発明の方法、システム、及びコンピュータ可読媒体の特定の態様においては、情報係数に基づいて近似の中の1つものを選択する段階は、最低のAIC値を具備する近似を選択する段階を含む。

10

20

30

40

50

**【0105】**

本発明の方法及びコンピュータ可読媒体の特定の態様においては、データセットは、キネティックポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プロセスの成長曲線を表すことが可能であり、この場合に、座標値のペアは、増幅されたポリヌクレオチドの蓄積及びサイクル数を表すことができる。

**【0106】**

本発明の方法及びコンピュータ可読媒体の特定の態様においては、増幅されたポリヌクレオチドの蓄積は、蛍光強度値、ルミネッセンス強度値、ケミルミネッセンス強度値、熒光強度値、電荷移動値、バイオルミネッセンス強度値、又は吸収率値の中の1つのものによって表すことができる。

10

**【0107】**

本発明の方法及びコンピュータ可読媒体の特定の態様においては、データセットは、キネティックポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プロセス、バクテリアプロセス、酵素プロセス、又はバインディングプロセスの成長曲線を表すことが可能である。

**【0108】**

本発明による特定の態様においては、置換されるデータセットの部分は、第1データポイントから始まってステップ型不連続部が発生するデータポイントを含むものまでのデータセットの部分を包含可能である。

**【0109】**

又、インテリジェンスモジュールは、選択の後に、選択された近似の適合度の値を算出し、且つ、適合度の値が閾値を上回る場合にのみ、継続するべく更に適合可能である。

20

**【0110】**

本発明によるシステムの特定の態様においては、インテリジェンスモジュールは、第2非線形関数について算出されたAIC値からバイアス値を減算するべく更に適合可能である。

**【0111】**

本発明によるシステムの特定の態様においては、情報係数に基づいて近似の中の1つのものを選択する段階は、最低のAIC値を具備する近似を選択する段階を包含可能である。

**【0112】**

30

本発明によるシステムの特定の態様においては、キネティックPCR分析モジュールは、キネティックサーモサイクラ装置内に存在可能であり、この場合に、インテリジェンスモジュールは、分析モジュールに通信可能に結合されたプロセッサを包含可能である。

**【0113】**

本発明によるシステムの特定の態様においては、インテリジェンスモジュールは、ネットワーク接続又は直接接続の中の1つのものによって分析モジュールに結合されたコンピュータシステム内に存在するプロセッサを包含可能である。

**【0114】**

本発明によるシステムの特定の態様においては、置換されるデータセットの部分は、ステップ型不連続部が発生したデータポイントの後のデータポイントを包含可能である。

40

**【0115】**

本発明によるコンピュータ可読媒体の特定の態様においては、置換されるデータセットの部分は、ステップ型不連続部が発生したデータポイントの後のデータポイントを包含可能である。

**【0116】**

本発明による方法の特定の態様においては、置換されるデータセットの部分は、ステップ型不連続部が発生したデータポイントの後のデータポイントを包含可能である。

**【0117】**

特定の態様においては、本発明による方法は、限定を伴うことなしに、キーボード、マウス、及びこれらに類似したものなどのデータセットを入力するための入力装置と、モニ

50

タなどの曲線の領域内の関心の対象である特定のポイントを表すための表示装置と、C P Uなどの方法のそれぞれの段階を実行するのに必要な処理装置と、モードムなどのネットワークインターフェイスと、データセットを保存するためのデータストレージ装置と、プロセッサ上において稼働するコンピュータコードと、これらに類似したものと、を含む従来のパーソナルコンピュータシステムを使用することによって実装可能である。更には、方法は、本発明によるP C R装置内において実装することも可能である。

#### 【0118】

本発明によるシステムの一例が図16～図17に示されている。図16は、本発明の方法及びシステムを実装するべく使用可能なソフトウェア及びハードウェアリソースの間の関係を説明する概略ブロックダイアグラムを示す。図17に示されたシステムは、サーモサイクラ装置内に配置可能なキネティックP C R分析モジュールと、コンピュータシステムの一部であるインテリジェンスモジュールと、を有する。データセット(P C Rデータセット)は、ネットワーク接続又は直接接続を介して、分析モジュールからインテリジェンスモジュールに、或いは、この反対方向に、転送される。データセットは、例えば、図5、図6、図10、及び図11に示されたフローチャートに従って処理可能である。これらのフローチャートは、例えば、図16に示されたフローチャートに従って、コンピュータシステムのハードウェア上に保存されたソフトウェアによって便利に実装可能である。図16を参照すれば、コンピュータシステム(200)は、例えば、P C R反応において得られた蛍光データを受信する受信手段(210)と、本発明の方法に従って前述のデータを処理する計算手段(220)と、計算手段によって得られた結果に従って前述のデータの一部を置換する適用手段(230)と、コンピュータ画面上に結果を表示する表示手段(249)と、を有することができる。図17は、サーモサイクラ装置とコンピュータシステムの間のやり取りを示す。本システムは、サーモサイクラ装置内に配置可能であるキネティックP C R分析モジュールと、コンピュータシステムの一部であるインテリジェンスモジュールと、を有する。データセット(P C Rデータセット)は、分析モジュールからインテリジェンスモジュールに、或いは、この反対方向に、ネットワーク接続又は直接接続を介して転送される。データセットは、プロセッサ上において稼働すると共にインテリジェンスモジュールのストレージ装置内に保存されたコンピュータコードにより、図16に従って処理され、且つ、処理の後に、分析モジュールのストレージ装置に返送可能であり、ここで、変更済みのデータを表示装置上に表示可能である。

#### 【0119】

前述のように、本発明のシステム及び方法は、ポリメラーゼ連鎖反応データ内のステップ型不連続部を除去するために有用である。例えば、蛍光データを使用してポリメラーゼ連鎖反応をモニタリングする際には、本発明のシステム及び方法は、相対的に正確なデータを提供する。このようなデータは、反応をモニタリングするのに有用であるのみならず、P C Rにおいて増幅された標的核酸の定量化又は得られたデータに応じたP C Rの反応条件の適合などの技術的な効果をも提供する。

#### 【0120】

以下の例及び図は、本発明の理解を支援するべく提供されるものであり、本発明の真の範囲は、添付の請求項に記述されているとおりである。本発明の精神を逸脱することなしに、記述された手順における変更を実施可能であることを理解されたい。

#### 【0121】

(例)

(ケース1)

これは、C A P / C T M H I Vモニタ検定からのI Q S(H E Xチャネル)蛍光データである。検定設計は、サイクル15の後にジャンプ不連続部を具備する。図12は、未加工の蛍光データ(点線)と、補正済みのデータ(実線)と、を示す。次の表4は、推定された係数と、対応する信頼区間と、を示す。ケース1のR<sup>2</sup>は、0.99を上回っている。

#### 【0122】

10

20

30

40

50

【表4】

	推定	漸近的SE	C
a	2. 31275	0. 122562	{2. 06485, 2. 56066}
b	0. 0252359	0. 00549652	{0. 0141181, 0. 0363536}
c	96. 3609	0. 27873	{95. 7971, 96. 9247}
d	0. 239047	0. 00396729	{0. 231022, 0. 247072}
e	33. 125	0. 0631932	{32. 9971, 33, 2528}
f	0. 758324	0. 00809917	{0. 741941, 0. 774706}
g	31. 9943	0. 0357128	{31. 922, 32. 0665}
h	0. 908027	0. 0861226	{0. 733827, 1. 08223}

【0123】

(ケース2)

これは、実際の標的の増幅を伴わないB19パルボウイルス標的チャネル(FAMチャネル)である。検定設計は、サイクル5の後にジャンプ不連続部を具備する。図13は、未加工の蛍光データ(点線)と、補正済みのデータ(実線)と、を示す。次の表5は、推定されたモデル係数と、それらの対応する信頼区間と、を示す。ケース2のR<sup>2</sup>は、0.94である。

【0124】

【表5】

	推定	漸近的SE	C
a	8.42742	0.0100461	{8.4073, 8.44754}
b	0.00685508	0.000274316	{0.00630577, 0.00740439}
h	0.442016	0.0171885	{0.407597, 0.476435}

表5：ケース2の例における係数

10

20

30

40

【0125】

(ケース3)

これは、HBV High Pure (FAMチャネル) の標的である。この検定は、ジャンプ不連続部を具備しない。このケースにおける係数hの信頼区間は、ゼロを含むことになる。従って、不連続部の補正は不要である。図14は、未加工のデータ(点線)と、補正済みのデータ(実線)と、を示す。次の表6は、推定されたモデル係数と、それらの対応する信頼区間と、を示す。ケース3のR<sup>2</sup>は、0.99を上回っている。

【0126】

【表 6】

	推定	漸近的 SE	C
a	3. 11898	0. 0996001	{2. 91861, 3. 31935}
b	0. 00896466	0. 00591903	{-0. 00294289, 0. 0208722}
c	23. 0262	0. 209375	{22. 605, 23. 4474}
d	0. 350498	0. 0578984	{0. 234021, 0. 466974}
e	26. 6482	1. 32442	{23. 9838, 29. 3125}
f	0. 609921	0. 0235677	{0. 562509, 0. 657333}
g	29. 3633	0. 302858	{28. 754, 29. 9726}
h	-0. 00380231	0. 0809013	{-0. 166555, 0. 15895}

表 6 : ケース 3 の例における係数

10

20

30

40

【0 1 2 7】

(ケース 4)

これは、高濃度 ( $2 \times 10^{11}$  IU / ml) の B19 パルボイルスサンプル (FAM チャネル) である。検定設計は、サイクル 5 の後にジャンプ不連続部を具備するが、大きな複写数に起因し、不連続部は観察されない。前述の方法は、このケースを上手に取り扱うことができる。図 15 は、未加工のデータ (点線) と、補正済みのデータ (実線) と、を示す。このケースにおける係数  $h$  の信頼区間はゼロを含む。次の表 7 は、推定されたモデル係数と、それらの対応する信頼区間と、を示す。ケース 4 の  $R^2$  は、0.99 を上回る。

50

【0128】

【表7】

	推定	漸近的SE	C I
a	9. 28716	0. 664719	{7. 9533, 10. 621}
b	0. 0995382	0. 0130251	{0. 0734015, 0. 125675}
c	73. 394	1. 01872	{71. 3498, 75. 4382}
d	0. 156817	0. 00342661	{0. 149941, 0. 163693}
e	14. 6075	0. 137083	{14. 3324, 14. 8825}
f	0. 504819	0. 0306282	{0. 443359, 0. 566279}
g	7. 26305	0. 212852	{6. 83593, 7. 69017}
h	-0. 166849	0. 500549	{-1. 17127, 0. 837576}

10

20

30

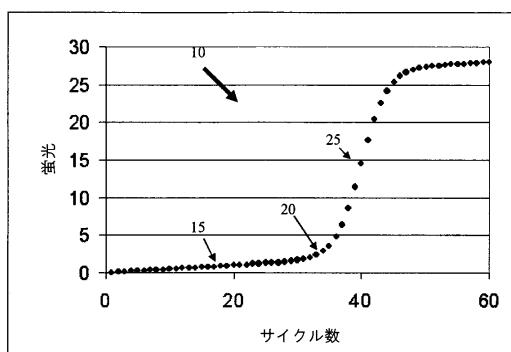
40

【0129】

以上、例示目的で、且つ、特定の態様の觀点で本発明について説明したが、本発明は、開示された態様に限定されないことを理解されたい。

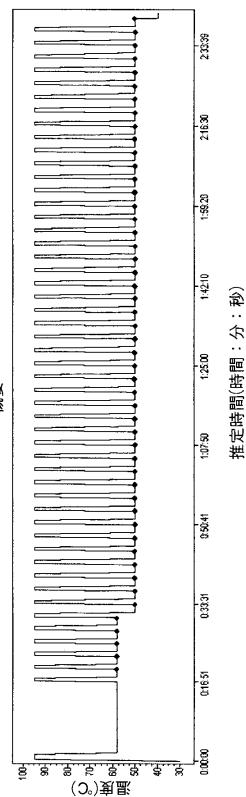
【図1】

図1



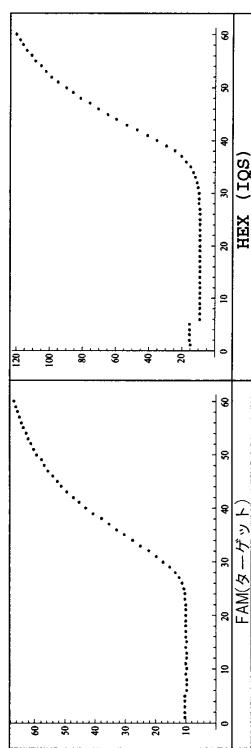
【図2】

図2



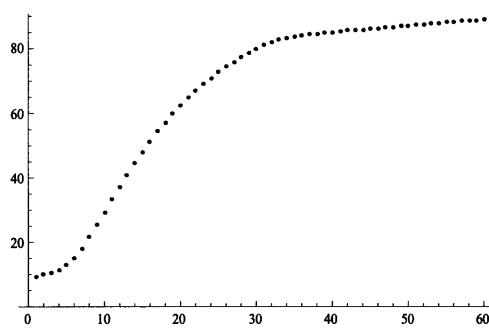
【図3】

図3



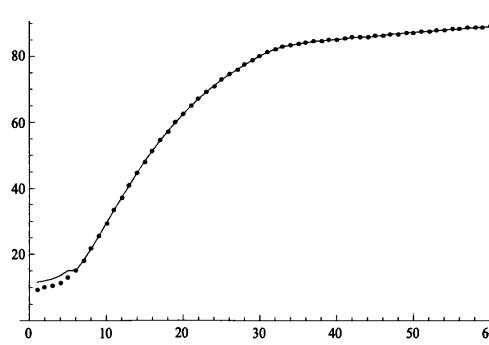
【図4 A】

図4A

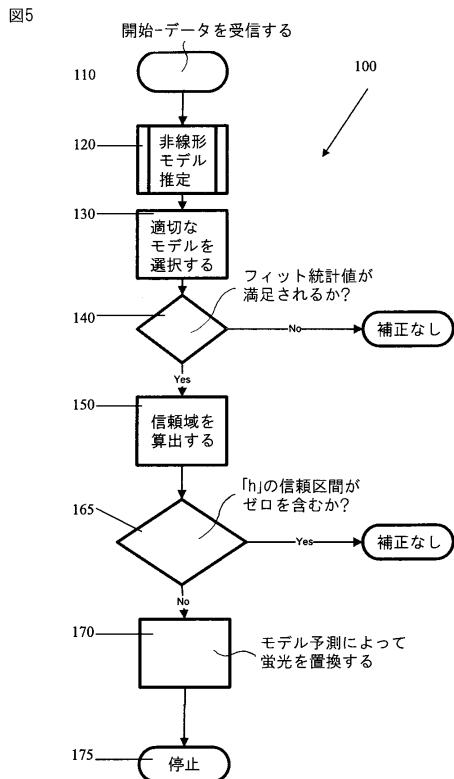


【図4 B】

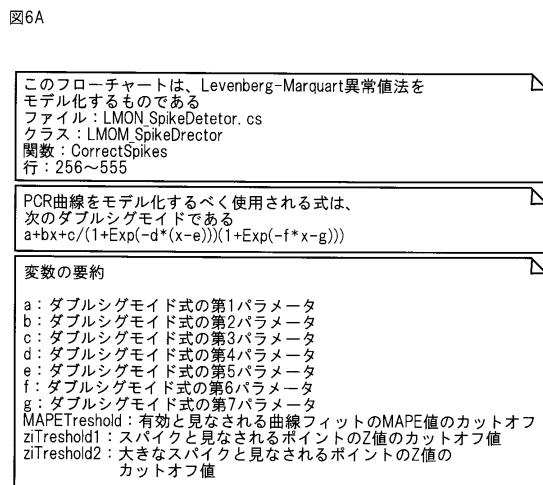
図4B



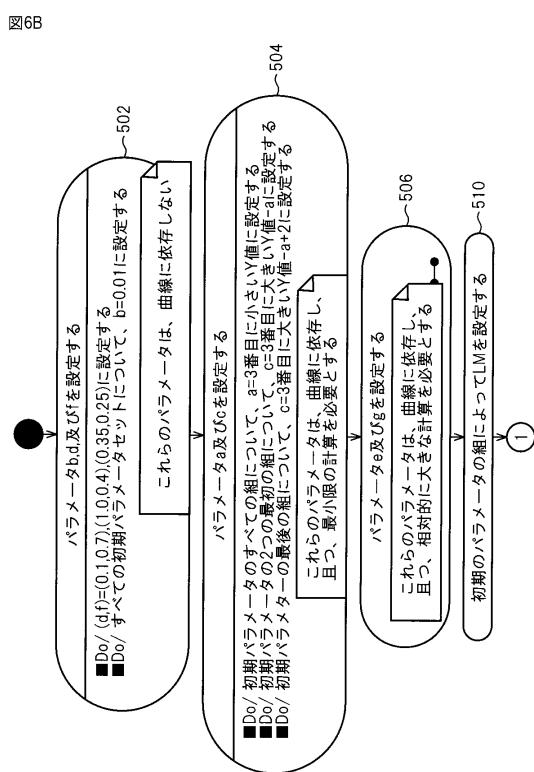
【図5】



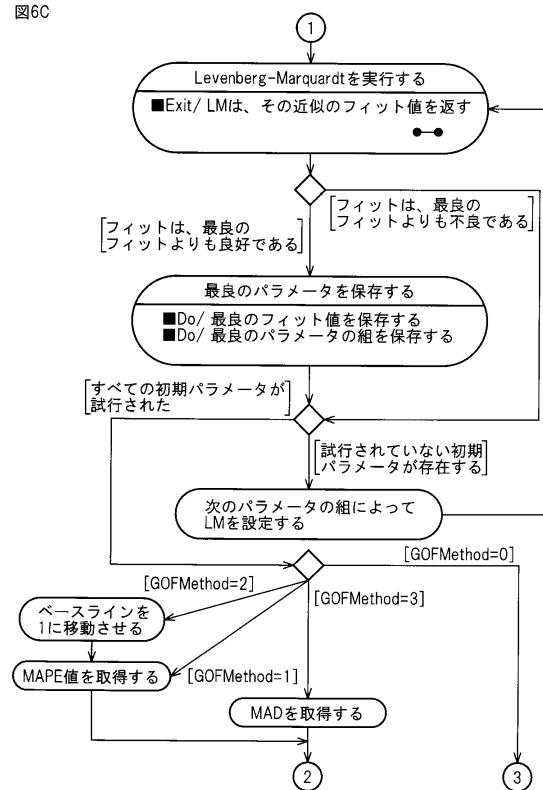
【図6 A】



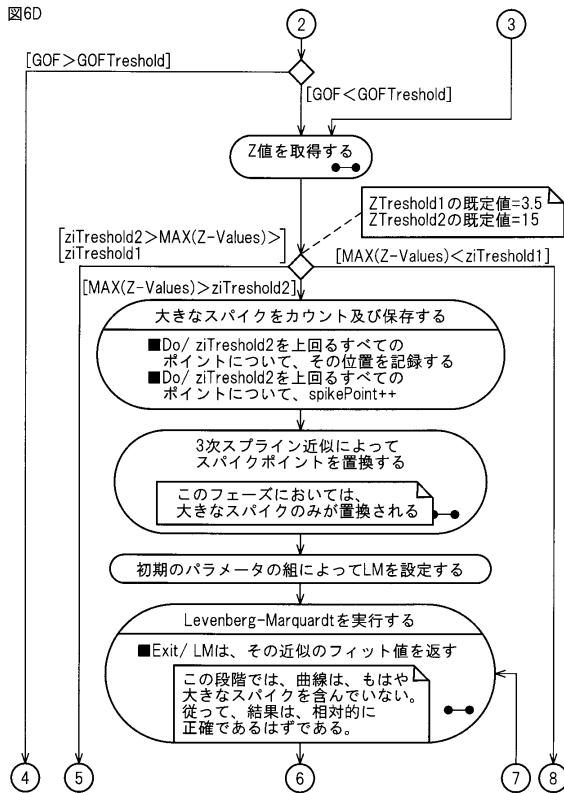
【図6 B】



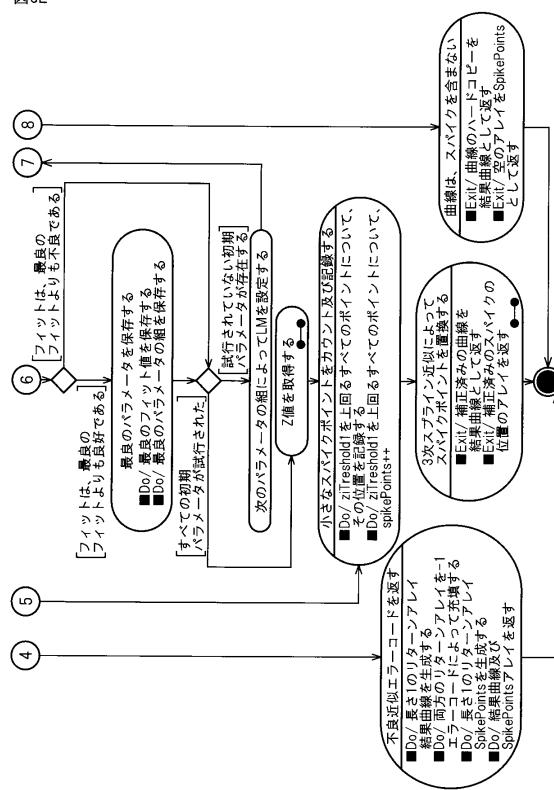
【図6 C】



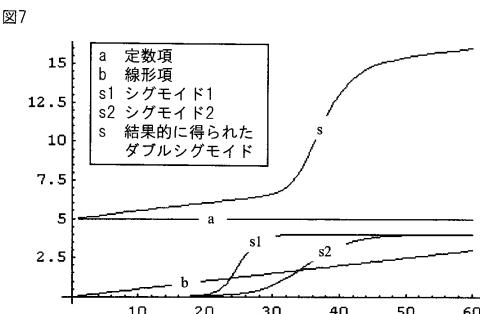
【図 6 D】



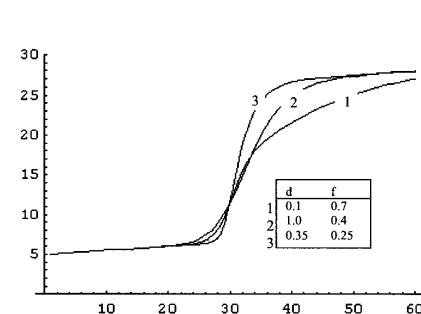
【図 6 E】



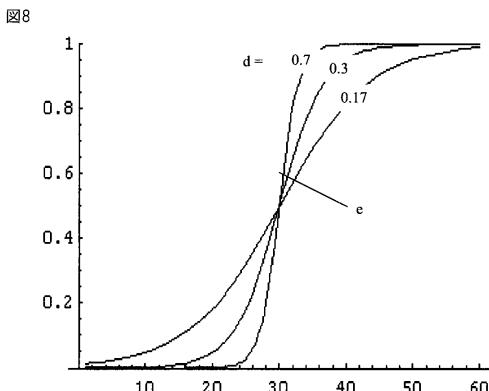
【図 7】



【図 9】



【図 8】



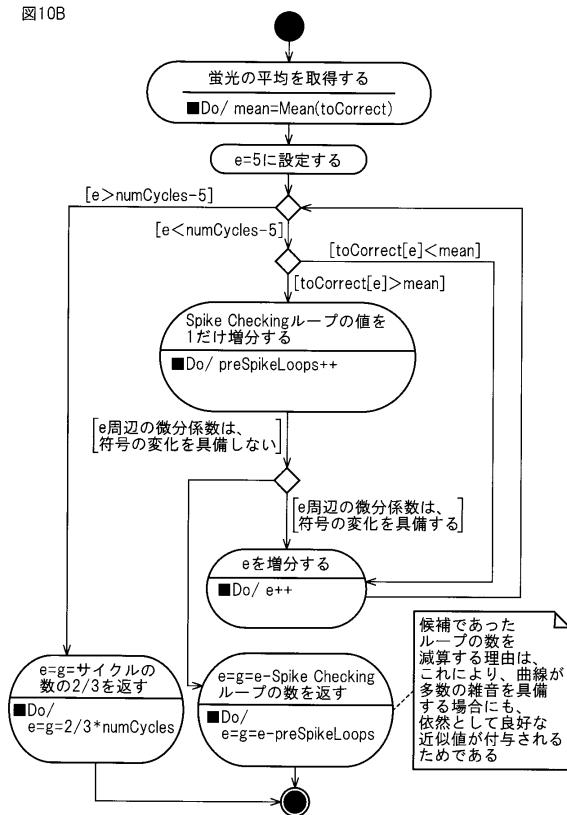
【図 10 A】

このフローチャートは、ダブルシグモイドパラメータe及びgが算出される方法をモデル化するものである  
ファイル: LMOMSpike\_Director.cs  
クラス: LMOM\_SpikeDetector  
関数: CorrectSpikes  
行: 302~340

変数の要約:  
e: パラメータeの現在の値  
g: パラメータgの現在の値  
mean: 曲線のy値の平均値  
numCycles: 曲線のサイクルの数  
toCorrect: 曲線のy値を含むアレイ  
preSpikeLoops: 試験されたe及びgの候補の数を保存する

【図10B】

図10B



【図11A】

図11A

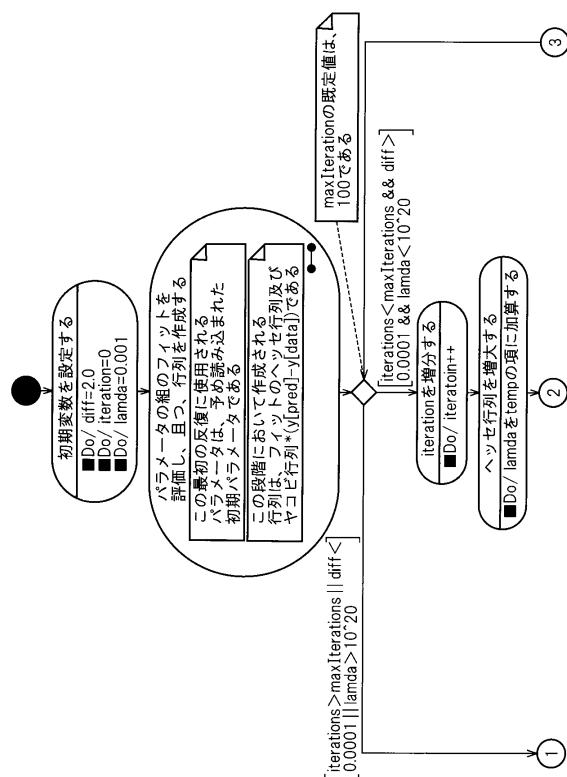
このフローチャートは、Levenberg-Marquardtアルゴリズムをモデル化するものである  
ファイル : LevenMarNR.cs  
クラス : LevenMarNR  
関数 : CalculateParams  
行 : 69~215

## 変数の要約

da : 新しいパラメータセットの増分を含むベクトル  
diff : 2つの連続した反復の絶対誤差の合計の間の差  
iteration : 実行された反復の数  
lambda : Levenberg-Marquardt法の減衰係数  
maxIteration : 反復の最大数  
onedata : Jacobian^T\*Error  
temp : ヘッセ行列の増大操作において増大されたヘッセ行列

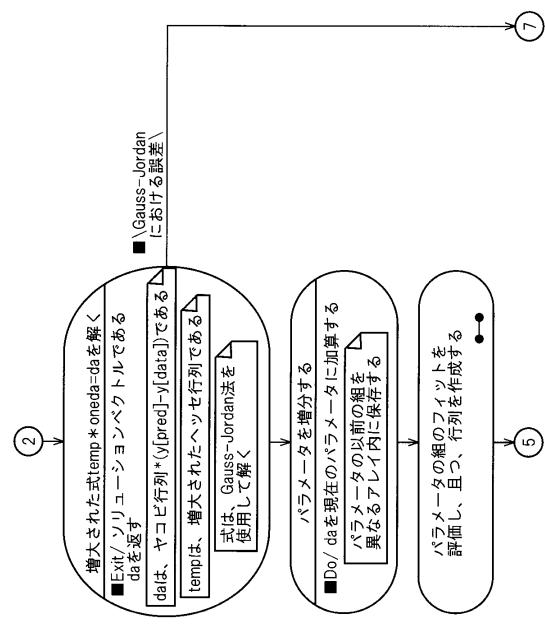
【図11B】

図11B

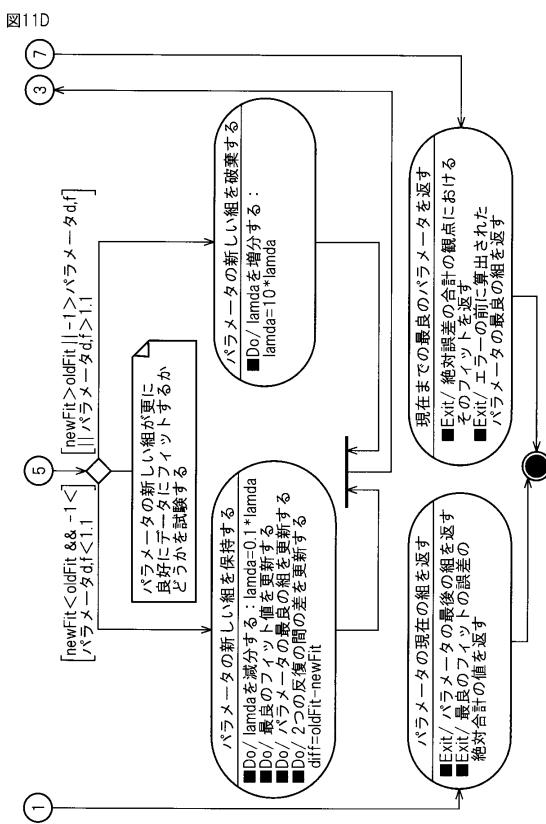


【図11C】

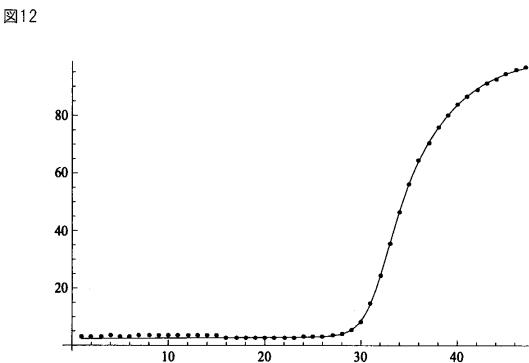
図11C



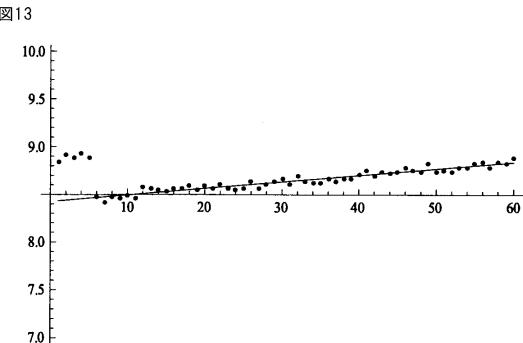
【図11D】



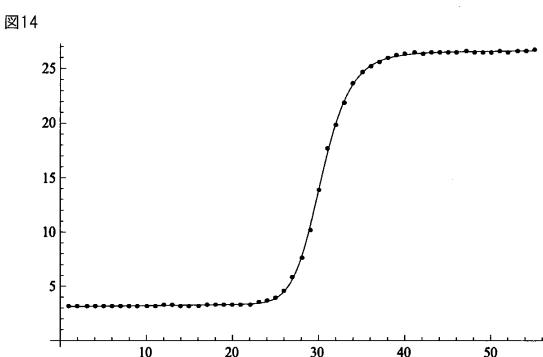
【図12】



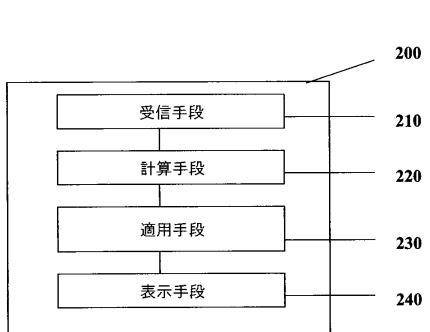
【図13】



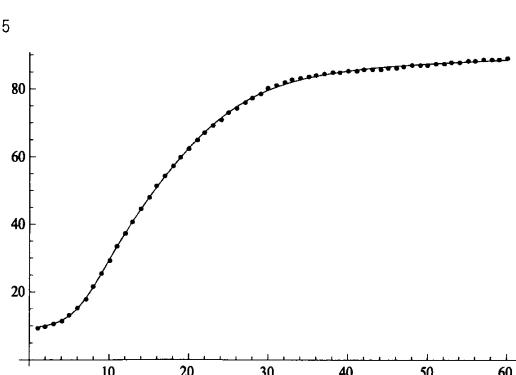
【図14】



【図16】

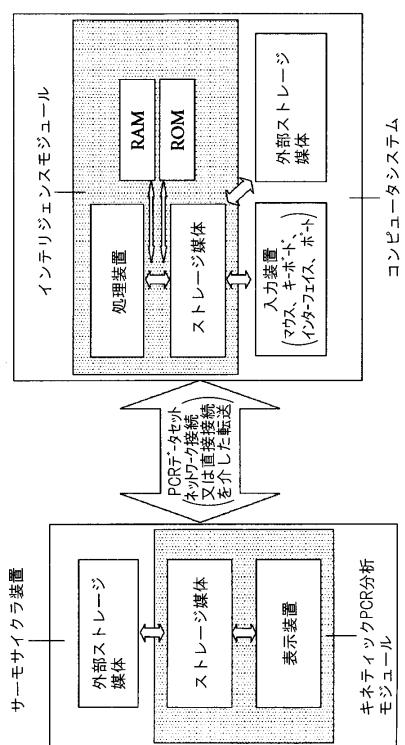


【図15】



【図17】

図17



---

フロントページの続き

(74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一  
(74)代理人 100108903  
弁理士 中村 和広  
(74)代理人 100141977  
弁理士 中島 勝  
(72)発明者 ヨナタン エム.バルダンツア  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94546, カストロ バレー, センター ストリート 22  
240 アパートメント 218  
(72)発明者 ロナルド ティー. クーニック  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94404, フォスター シティ, ハドック ストリート 9  
61  
(72)発明者 アディチャ ピー. サーネ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94566, プレザントン, ローズ アベニュ 847, アパートメント ナンバー 11

審査官 井上 宏一

(56)参考文献 特開2007-267730(JP,A)  
特開2007-226771(JP,A)  
特開平 9- 62646(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 06 F 17 / 17