

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-43352

(P2005-43352A)

(43) 公開日 平成17年2月17日(2005.2.17)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/557	GO 1 N 33/557	2 G O 5 4
GO 1 N 21/47	GO 1 N 21/47	2 G O 5 9
GO 1 N 21/59	GO 1 N 21/59	Z
GO 1 N 21/77	GO 1 N 21/77	Z
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	T
審査請求 未請求 請求項の数 19 O L (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-196925 (P2004-196925)	(71) 出願人	000005821
(22) 出願日	平成16年7月2日 (2004.7.2)		松下電器産業株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2003-271423 (P2003-271423)		大阪府門真市大字門真1006番地
(32) 優先日	平成15年7月7日 (2003.7.7)	(74) 代理人	100077931
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 前田 弘
		(74) 代理人	100094134
			弁理士 小山 廣毅
		(74) 代理人	100110939
			弁理士 竹内 宏
		(74) 代理人	100110940
			弁理士 嶋田 高久
		(74) 代理人	100113262
			弁理士 竹内 祐二
		(74) 代理人	100115059
			弁理士 今江 克実
		最終頁に続く	

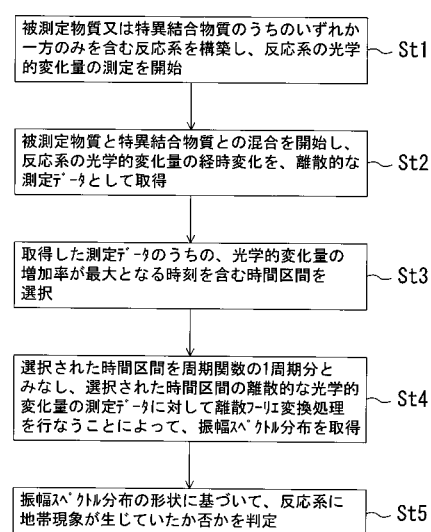
(54) 【発明の名称】 免疫反応測定方法および免疫反応測定装置

(57) 【要約】

【課題】簡便で、測定精度の高い免疫学的測定方法およびそれに用いる免疫学的測定装置を提供する。

【解決手段】ステップS t 1で、被測定物質または特異結合物質を含む反応系を構築し光学的变化量の測定を開始し、ステップS t 2で、特異結合物質と被測定物質とを混合し、反応系の光学的变化量の経時変化を測定する。ステップS t 3で、取得した測定データのうち光学的变化量の増加率が最大となる時刻を含む時間区間を選択する。ステップS t 4で、選択された時間区間を周期関数の1周期とみなし、光学的变化量の測定データに対して離散フーリエ変換処理を行うことによって、振幅スペクトル分布を得る。ステップS t 5で、振幅スペクトル分布を基準形状と比較することにより、反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定する。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料溶液中に含まれる被測定物質の濃度を測定する免疫反応測定方法であって、
上記試料溶液と、上記被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質とを混合し、
所定のサンプリング周期で、上記被測定物質と上記特異結合物質との反応における光学的变化量の経時変化を離散的な測定データとして取得するステップ (a) と、
上記測定データのうち光学的变化量の増加率が最大となる時刻を含む時間区間を選択するステップ (b) と、
上記時間区間を周期関数の 1 周期とみなし、上記時間区間内にある上記測定データに対して離散フーリエ変換処理を行うことによって、振幅スペクトル分布を得るステップ (c) 10
) と、
上記振幅スペクトル分布の形状に基づいて、上記ステップ (a) における上記反応に地帯現象が生じていたか否かを判定するステップ (d) とを含み、
上記被測定物質と上記特異結合物質との組み合わせは、抗原と抗体との組み合わせである、免疫反応測定方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の免疫反応測定方法において、
上記光学的变化量は、散乱光強度の変化量または透過光量の変化量である、免疫反応測定方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の免疫反応測定方法において、
上記時間区間は、地帯現象が生じない場合の反応で測定した光学的变化量の測定データに基づいて予め決定されている、免疫反応測定方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の免疫反応測定方法において、
上記時間区間は、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応が実質的に飽和した後、光学的变化量が実質的に一定となっている時点までである、免疫反応測定方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の免疫反応測定方法において、
上記ステップ (d) では、上記振幅スペクトル分布の形状と、地帯現象が生じない場合の反応で測定した振幅スペクトル分布の形状とに基づいて、上記ステップ (a) における上記反応に地帯現象が生じていたか否かを判定する、免疫反応測定方法。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の免疫反応測定方法において、
上記ステップ (d) では、上記時間区間の逆数に相当する周波数における振幅値の、上記振幅スペクトルの直流成分に対する比率をもとに、上記ステップ (a) における上記反応に地帯現象が生じていたか否かを判定する、免疫反応測定方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の免疫反応測定方法において、
上記ステップ (d) では、上記比率が、地帯現象が生じない場合の反応と地帯現象が生じる場合の反応との双方の分布結果より求められた基準値を上回った場合に、上記ステップ (a) における上記反応に地帯現象が生じていないと判定し、上記基準値を下回った場合に、上記ステップ (a) における上記反応に地帯現象が生じていると判定する、免疫反応測定方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の免疫反応測定方法において、
上記ステップ (a) の前に、上記試料溶液および上記特異結合物質のいずれか一方のみが含まれる反応系を構築し、上記所定のサンプリング周期で、上記反応系における光学的变化量の経時変化を、離散的な測定データとして取得するステップ (e) をさらに備え、 50

上記ステップ (a) では、上記反応系に、上記試料溶液および上記特異結合物質のうち上記反応系に含まれていない方を添加することにより上記試料溶液と上記特異結合物質とを混合し、

上記時間区間は、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合する前から、上記反応系での反応が実質的に飽和した後、光学的变化量が実質的に一定となっている時点までである、免疫反応測定方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の免疫反応測定方法において、

上記ステップ (d) では、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応系での反応が実質的に飽和する時点までの時間区間の逆数に相当する周波数における振幅値と、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応系での反応が実質的に飽和した後光学的变化量が実質的に一定となっている時点までの時間区間の逆数に相当する周波数の振幅値との差が正の数の場合に、上記ステップ (a) において上記反応系に地帯現象が生じていないと判定し、上記差が負の数の場合に、上記ステップ (a) において上記反応系に地帯現象が生じていると判定する、免疫反応測定方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の免疫反応測定方法において、

上記ステップ (c) における上記振幅スペクトル分布の直流成分の振幅値をもとに、上記被測定物質の濃度を定量する、免疫反応測定方法。

【請求項 11】

被測定物質を含む試料溶液と、上記被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質とを混合したときの反応の光学的变化量を測定する測定手段と、

上記測定手段に接続され、上記測定手段によって得られる測定データのうち光学的变化量の増加率が最大となる時刻を含む時間区間を選択し、上記時間区間を周期関数の 1 周期とみなし、上記時間区間内の測定データに対して離散フーリエ変換処理を行うことによって、振幅スペクトル分布を得る測定データ処理手段と、

上記測定データ処理手段に接続され、上記振幅スペクトル分布の形状に基づいて、上記反応に地帯現象が生じていたか否かを判定する判定手段と、
を備える免疫反応測定装置。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の免疫反応測定装置において、

上記時間区間は、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応が実質的に飽和した後、光学的变化量が実質的に一定となっている時点までである、免疫反応測定装置。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の免疫反応測定装置において、

上記判定手段は、上記反応に地帯現象が生じていない場合の振幅スペクトル分布の形状を基準形状として予め記憶しており、上記基準形状と、上記測定データ処理手段によって得られる上記振幅スペクトル分布の形状とを比較することによって判定を行う、免疫反応測定装置。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の免疫反応測定装置において、

上記判定手段は、上記時間区間の逆数に相当する周波数における振幅値の、上記振幅スペクトル分布の直流成分に対する比率をもとに判定を行う、免疫反応測定装置。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の免疫反応測定方法において、

上記判定手段は、上記比率が、地帯現象が生じない場合の反応と地帯現象が生じる場合の反応との双方の分布結果より求められた基準値を上回った場合に、上記測定手段における上記反応に地帯現象が生じていないと判定し、基準値を下回った場合に、上記測定手段における上記反応に地帯現象が生じていると判定する、免疫反応測定装置。

【請求項 16】

請求項 11 に記載の免疫反応測定装置において、

上記時間区間は、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合する前から、上記反応が実質的に飽和した後、光学的变化量が実質的に一定となっている時点までである、免疫反応測定装置。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の免疫反応測定装置において、

上記判定手段は、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応が実質的に飽和する時点までの時間区間の逆数に相当する周波数における振幅値と、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応が実質的に飽和した後光学的变化量が実質的に一定となっている時点までの時間区間の逆数に相当する周波数における振幅値との差が正の数の場合に、上記反応に地帯現象が生じていないと判定し、上記差が負の数の場合に、上記反応に地帯現象が生じていると判定する、免疫反応測定装置。

10

【請求項 18】

請求項 11 に記載の免疫反応測定装置において、

上記測定データ処理手段に接続され、上記振幅スペクトル分布の形状に基づいて、上記被測定物質の濃度を定量する定量手段をさらに有する、免疫反応測定装置。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の免疫反応測定装置において、

上記定量手段は、上記振幅スペクトル分布の直流成分の振幅値をもとに、上記被測定物質の濃度を定量する、免疫反応測定装置。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中の被測定物質の含有量を測定することができる免疫反応測定方法およびそれに用いる免疫反応測定装置に関する。

【背景技術】

【0002】

臨床検査分野では、様々な疾患の診断及び病状の経過を調べるために、ヒトの体液中に存在する各疾患に特徴的な蛋白質の含有量を測定することが広く行なわれている。これらの蛋白質の含有量測定には、主として、標的とする蛋白質を抗原として特異的に認識する抗体を用いた反応（抗原抗体反応）を利用した免疫反応測定方法が広く用いられている。現在では、免疫反応測定方法にも様々な原理を利用したものが開発されている。

30

【0003】

それらの中でも、試料中の被測定物質の含有量を測定するために、抗原抗体反応によって生じる抗原抗体複合体の凝集体（以下、凝集複合体と称する）を検出する、免疫比濁法（以下、比濁法と略す）、免疫比濁法（以下、比濁法と略す）、スライド凝集法などの測定方法はよく知られたものである。抗原抗体反応では、凝集複合体の生成により反応系に濁りを生じる。凝集複合体の生成により反応系に生じる濁りの程度は、抗原の量及び抗体の量に依存する。このことに基づいて、比濁法および比濁法は、上述の反応系に生じる濁りの程度を光学的に測定し、その測定値から抗原の量または抗体の量を算出する方法である。具体的には、比濁法は、反応系で散乱された光量の変化に基づいて、比濁法は、反応系での散乱により減少した透過光量の変化に基づいて、凝集複合体を測定する方法である。これらの測定方法は、反応系中に抗原および抗体が一様に分散された状態で測定を行うものであるため、「均一系の免疫反応測定方法」と総称される。

40

【0004】

一般に、均一系の免疫反応測定方法では、地帯現象と呼ばれる現象が起こることが知られている。地帯現象とは、抗原と抗体とが最大の凝集複合体を形成する当量域よりも、いずれかが過剰に存在する場合に、凝集複合体が生じ難くなる現象のことである。特に抗原過剰の場合が問題となることが多い。これについて、以下に図 20 (a), (b) を参照

50

しながら説明する。図20(a), (b)は、均一系の免疫反応測定方法の反応系における抗原および抗体の反応の様子を模式的に示す図である。

【0005】

図20(a)に示すように、通常、均一系の免疫反応測定方法では、抗体と抗原とが交互に結合した巨大な分子鎖である凝集複合体が生じる。地帯現象とは、抗原と抗体とが最大量の凝集複合体を形成する当量域よりも、図20(b)に示すように、抗原が抗体に対して過剰に存在する場合に、凝集複合体が生じ難くなる現象のことである。多価抗体と2価以上の抗原との間の結合反応は、Heidelbergerらの格子説が有名であり、下記の特許文献1にその詳細が記載されている。

【0006】

地帯現象が起こらない抗体および抗原の濃度領域では、図20(a)に示すように、抗体と抗原とが交互に結合した巨大な分子鎖である凝集複合体が生じる。このとき抗体濃度を一定とすると、この凝集複合体の量および大きさは、抗原濃度に依存して増加する。このため、この凝集複合体の量や大きさを光学的な変化量として測定することによって、抗原濃度を定量的に測定することができる。また、凝集複合体は、抗体及び抗原の濃度によっては、溶液中の濁りや凝集物として肉眼でも十分に確認が可能なものとなるため、目視などにより定性的な判定を行うこともできる。

【0007】

しかし、実際の均一系の免疫反応測定方法においては、抗体を用いて抗原濃度を測定することが多い。また、抗原濃度が低い場合よりも高い場合に、測定値が重要な意味を持つことが多い。ところが、抗原が抗体に比べて過剰に存在する場合、図20(b)に示すように、抗体の結合部位が抗原により飽和された抗体の量が増加し、凝集複合体が生じ難くなる。従って、抗原抗体反応の結果を、抗原が低濃度の場合と抗原が過剰の場合との間で区別することが困難になる。このため、抗原濃度に依存した正しい定量および判定が行えないおそれがある、あるいは、抗原濃度に依存した正しい定量および判定を行うためには、測定濃度範囲が制限されるといった不具合が生じる。このように、抗原が過剰に存在することによって生じる地帯現象は、均一系の免疫反応測定方法での不具合の一因となることが多い。

【0008】

上記不具合の解決のために、被測定物質である抗原(あるいは抗体)に特異的に結合する結合物質である抗体(あるいは抗原)を、含有量が $1/n$ ($n > 1$ である任意の数)となる複数の異なる濃度で用意し、各濃度の結合物質と被測定物質とをそれぞれ反応させ、生じた凝集複合体を測定する方法が開示されている(特許文献1を参照)。この方法によれば、抗原が過剰に存在する濃度範囲(以下、地帯領域と称する)で抗原抗体反応が行われたか否かを判定することが可能となる。

【0009】

また、2種類の異なる波長の光を用いた測定による測定結果より、吸光度比などの判定指標を計算により求め、この判定指標に基づいて、地帯領域で抗原抗体反応が行われたか否かを判定する方法が開示されている(特許文献2、3および4を参照)。

【0010】

また、測定される光学信号の経時変化の微分により得られる反応速度を利用し、これが最大となるピーク速度値および反応開始からのピーク速度到達までの経過時間を基にして、地帯領域で抗原抗体反応が行われたか否かを判定する方法が開示されている(特許文献5を参照)。

【特許文献1】特開昭60-79269号公報。

【特許文献2】特開昭63-19560号公報。

【特許文献3】特開昭63-149564号公報。

【特許文献4】特開平4-204378号公報。

【特許文献5】米国特許第4,157,871号公報。

【非特許文献1】Fundamental Immunology, William E 50

10

20

30

40

． Paul 編、(1989)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

しかしながら、上記特許文献1に開示されている方法では、1つの試料に対して、複数の反応容器を用意して、複数回の測定する必要があるため、測定手順が煩雑となる。

【0012】

また、上記特許文献2、3および4に開示されている方法では、複数の光源を用意するか、あるいは、白色光より各波長光を分離する手段と、複数回の測定手段、または、検出器側での波長分離手段を設ける必要があるため、測定装置構成が複雑となり、また、測定手順が煩雑となる。

10

【0013】

また、上記特許文献5に開示されている方法では、ピーク速度値が低い場合には、泡、埃などの夾雑物による影響、ならびに検出器への電磁波等の影響による雑音の発生の影響を受け易く、誤った判定結果を出すおそれが高くなる。

【0014】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、簡便で、測定精度の高い免疫学的測定方法およびそれに用いる免疫学的測定装置を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の免疫反応測定方法は、試料溶液中に含まれる被測定物質の濃度を測定する免疫反応測定方法であって、上記試料溶液と、上記被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質とを混合し、所定のサンプリング周期で、上記被測定物質と上記特異結合物質との反応における光学的变化量の経時変化を離散的な測定データとして取得するステップ(a)と、上記測定データのうち光学的变化量の増加率が最大となる時刻を含む時間区間を選択するステップ(b)と、上記時間区間を周期関数の1周期とみなし、上記時間区間内にある上記測定データに対して離散フーリエ変換処理を行うことによって、振幅スペクトル分布を得るステップ(c)と、上記振幅スペクトル分布の形状に基づいて、上記ステップ(a)における上記反応に地帯現象が生じていたか否かを判定するステップ(d)とを含み、上記被測定物質と上記特異結合物質との組み合わせは、抗原と抗体との組み合わせである。

20

30

【0016】

本発明の免疫学的測定方法によれば、被測定物質の含有量(濃度)を得ることができる。特に、本発明によれば、反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定しながら、反応系の光学的变化量を測定することができるので、光学的变化量に基づいて得られる被測定物質の含有量(濃度)の数値の信頼性が非常に高い。また、反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定しながら、反応系の光学的变化量を測定することができるので、測定手順が非常に簡単である。さらに、本発明では、フーリエ変換を用いるため、測定データの変化に対して、雑音は高周波数信号と考えることができ、測定データの変化による信号と、雑音による信号とを分離することができる。このため、雑音の影響を受け難い。

40

【0017】

上記光学的变化量は、散乱光強度の変化量または透過光量の変化量であってもよい。

【0018】

上記時間区間は、地帯現象が生じない場合の反応で測定した光学的变化量の測定データに基づいて予め決定されていてもよい。

【0019】

上記時間区間は、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応が実質的に飽和した後、光学的变化量が実質的に一定となっている時点までであってもよい。

【0020】

50

上記ステップ(d)では、上記振幅スペクトル分布の形状と、地帯現象が生じない場合の反応で測定した振幅スペクトル分布の形状とに基づいて、上記ステップ(a)における上記反応に地帯現象が生じていたか否かを判定することが好ましい。

【0021】

上記ステップ(e)では、上記振幅スペクトル分布の形状と、上記試料溶液中に含まれる被測定物質の濃度が地帯現象を生じない濃度である場合の振幅スペクトル分布の形状とに基づいて、上記ステップ(b)において反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定してもよい。

【0022】

上記ステップ(d)では、上記時間区間の逆数に相当する周波数における振幅値の、上記振幅スペクトルの直流成分(周波数が0のときの振幅値)に対する比率をもとに、上記ステップ(a)における上記反応に地帯現象が生じていたか否かを判定することが好ましい。 10

【0023】

上記ステップ(d)では、上記比率が、地帯現象が生じない場合の反応と地帯現象が生じる場合の反応との双方の分布結果より求められた基準値を上回った場合に、上記ステップ(a)における上記反応に地帯現象が生じていないと判定し、上記基準値を下回った場合に、上記ステップ(a)における上記反応に地帯現象が生じていると判定することが好ましい。

【0024】

上記ステップ(a)の前に、上記試料溶液および上記特異結合物質のいずれか一方のみが含まれる反応系を構築し、上記所定のサンプリング周期で、上記反応系における光学的变化量の経時変化を、離散的な測定データとして取得するステップ(e)をさらに備え、上記ステップ(a)では、上記反応系に、上記試料溶液および上記特異結合物質のうち上記反応系に含まれていない方を添加することにより上記試料溶液と上記特異結合物質とを混合し、上記時間区間は、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合する前から、上記反応系での反応が実質的に飽和した後、光学的变化量が実質的に一定となっている時点までであってもよい。 20

【0025】

上記ステップ(d)では、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応系での反応が実質的に飽和する時点までの時間区間の逆数に相当する周波数における振幅値と、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応系での反応が実質的に飽和した後光学的变化量が実質的に一定となっている時点までの時間区間の逆数に相当する周波数の振幅値との差が正の数の場合に、上記ステップ(a)において上記反応系に地帯現象が生じていないと判定し、上記差が負の数の場合に、上記ステップ(a)において上記反応系に地帯現象が生じていると判定することが好ましい。 30

【0026】

上記ステップ(c)における上記振幅スペクトル分布の直流成分の振幅値をもとに、上記被測定物質の濃度を定量してもよい。

【0027】

本発明の免疫学的測定装置は、被測定物質を含む試料溶液と、上記被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質とを混合したときの反応の光学的变化量を測定する測定手段と、上記測定手段に接続され、上記測定手段によって得られる測定データのうち光学的变化量の増加率が最大となる時刻を含む時間区間を選択し、上記時間区間を周期関数の1周期とみなし、上記時間区間内の測定データに対して離散フーリエ変換処理を行うことによって、振幅スペクトル分布を得る測定データ処理手段と、上記測定データ処理手段に接続され、上記振幅スペクトル分布の形状に基づいて、上記反応に地帯現象が生じていたか否かを判定する判定手段とを備える。 40

【0028】

本発明の免疫学的測定装置によれば、反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定しな 50

がら、反応系の光学的变化量を測定することができる。このため、光学的变化量に基づいて得られる被測定物質の含有量（濃度）の数値の信頼性が非常に高い。また、反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定しながら、反応系の光学的变化量を測定することができるので、測定手順が非常に簡単である。さらに、本発明では、フーリエ変換を用いるため、測定データの変化に対して、雑音は高周波数信号と考えることができ、測定データの変化による信号と、雑音による信号とを分離することができる。このため、雑音の影響を受け難い。つまり、本発明によれば、簡便で、信頼性の高い免疫反応測定を行うことができる。

【0029】

上記時間区間は、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応が実質的に飽和した後、光学的变化量が実質的に一定となっている時点までであってもよい。

【0030】

上記判定手段は、上記反応に地帯現象が生じていない場合の振幅スペクトル分布の形状を基準形状として予め記憶しており、上記基準形状と、上記測定データ処理手段によって得られる上記振幅スペクトル分布の形状とを比較することによって判定を行う構成であってもよい。

【0031】

上記判定手段は、上記時間区間の逆数に相当する周波数における振幅値の、上記振幅スペクトル分布の直流成分に対する比率をもとに判定を行う構成であってもよい。

【0032】

上記判定手段は、上記比率が、地帯現象が生じない場合の反応と地帯現象が生じる場合の反応との双方の分布結果より求められた基準値を上回った場合に、上記測定手段における上記反応に地帯現象が生じていないと判定し、基準値を下回った場合に、上記測定手段における上記反応に地帯現象が生じていると判定する構成であってもよい。

上記時間区間は、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合する前から、上記反応が実質的に飽和した後、光学的变化量が実質的に一定となっている時点までであってもよく、この場合、上記判定手段は、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応が実質的に飽和する時点までの時間区間の逆数に相当する周波数における振幅値と、上記特異結合物質と上記試料溶液とを混合した時点から、上記反応が実質的に飽和した後光学的变化量が実質的に一定となっている時点までの時間区間の逆数に相当する周波数における振幅値との差が正の数の場合に、上記反応に地帯現象が生じていないと判定し、上記差が負の数の場合に、上記反応に地帯現象が生じていると判定する構成であることが好ましい。

【0033】

また、上記免疫反応測定装置は、上記測定データ処理手段に接続され、上記振幅スペクトル分布の形状に基づいて、上記被測定物質の濃度を定量する定量手段をさらに有しているもよい。

【0034】

上記被測定物質の濃度を定量する定量手段は、上記振幅スペクトル分布の直流成分の振幅値をもとに、上記被測定物質の濃度を定量してもよい。

【発明の効果】

【0035】

本発明によれば、簡便で、測定精度の高い免疫学的測定方法およびそれに用いる免疫学的測定装置を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

試料中の被測定物質の含有量を測定する免疫反応測定方法では、被測定物質と、被測定物質と特異的に結合する特異結合物質とを反応させ、この反応の過程における光学特性の変化量を測定し、その測定結果から被測定物質の量を算出する。

【0037】

(第1の免疫学的測定方法)

以下に、図1および図2を参照しながら本発明の第1の免疫学的測定方法について説明する。図1は、本実施形態の第1の免疫反応測定方法の各ステップを表すフローチャート図である。図2(a)は、離散的な光学的変化量の測定データを示すグラフ図であり、図2(b)は、振幅スペクトル分布を示すグラフ図である。図2(b)では、離散フーリエ変換した時間区間(1周期)の逆数が、基本周波数として f で表されている。なお、被測定物質と特異結合物質との組み合わせは、抗原と抗体との組み合わせである。

【0038】

本発明の第1の免疫反応測定方法では、まず、図1に示すステップ S_{t1} (特許請求の範囲におけるステップ(e)に相当)で、被測定物質または特異結合物質のいずれか一方のみを含む反応系を構築し、反応系の光学的変化量の測定を開始する。ここで、反応系として、被測定物質と特異結合物質とのいずれかを含んでいればよいとしたのは、被測定物質に特異結合物質を添加していてもよいし、特異結合物質に被測定物質を添加していてもよいからである。

【0039】

次に、ステップ S_{t2} (特許請求の範囲におけるステップ(a)に相当)で、被測定物質と特異結合物質との混合を開始し、反応系の光学的変化量の経時変化を、離散的な測定データとして取得する。なお、この「光学的変化量」とは、具体的には散乱光強度または透過光量の変化量のことをいい、光学的変化量の測定は、一定のサンプリング周期で行う。ここで、反応系が被測定物質を含む場合には、反応系に特異結合物質を添加し、反応系が特異結合物質を含む場合には、反応系に被測定物質を添加していく。

【0040】

以上のステップ S_{t1} およびステップ S_{t2} によって、例えば、図2(a)に示す光学的変化量の測定データを得る。なお、図2(a)の光学的変化量の測定データは、各測定時間毎の離散的な測定結果を線で結んだものである。

【0041】

本実施形態の免疫学的測定方法では、被測定物質が抗原である場合、特異結合物質は抗体であり、被測定物質が抗体である場合、特異結合物質は抗原である。ステップ S_{t1} において、被測定物質または特異結合物質のうちいずれか一方のみしか反応系に含まれていない時点では、被測定物質と特異結合物質との抗原抗体反応による凝集複合体が反応系中に生じない。それに対し、ステップ S_{t2} において、被測定物質と特異結合物質とが混合されると、被測定物質と特異結合物質との抗原抗体反応による凝集複合体が反応系中に生じ始める。

【0042】

ステップ S_{t2} で反応系中に凝集複合体が生じると、反応系に濁りが生じ、散乱光強度および透過光量などの光学的変化量に変化が生じる。従って、この光学的変化量を測定することによって、反応系の濁りの程度を見積もることができる。なお、この見積もりの基準として、反応系に被測定物質または特異結合物質のいずれか一方のみが含まれているときの光学的変化量、つまり散乱光強度または透過光量の変化量を測定することが好ましい。

【0043】

次に、図1に示すステップ S_{t3} (特許請求の範囲におけるステップ(b)に相当)で、取得した測定データのうち、光学的変化量の増加率(すなわち、反応速度)が最大となる時刻を含む時間区間を選択する。つまり、図2(a)においては、時間区間 $d_2 + d_3$ を選択する。

【0044】

次に、図1に示すステップ S_{t4} (特許請求の範囲におけるステップ(c)に相当)で、選択された時間区間 $d_2 + d_3$ を周期関数の1周期とみなし、選択された時間区間 $d_2 + d_3$ 内の離散的な光学的変化量の測定データに対して離散フーリエ変換処理を行うことに

よって、例えば、図 2 (b) に示す振幅スペクトル分布を得る。

【 0 0 4 5 】

次に、図 1 に示すステップ S t 5 (特許請求の範囲におけるステップ (d) に相当) で、振幅スペクトル分布の形状に基づいて、上記ステップ S t 2 において反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定する。具体的には、このとき、反応系に地帯現象が生じていない場合の振幅スペクトル分布の形状を「基準形状」として予め取得しておき、ステップ S t 4 で得られた振幅スペクトル分布を基準形状と比較することによって判定を行う。この判定方法については、後述の実施例 4 において詳細に説明する。なお、本ステップにおいては、振幅スペクトル分布の形状を目視において判定してもよいし、コンピュータを用いて判定してもよい。また、後述の実施例 2 で説明するように、ステップ S t 4 で得られた振幅スペクトル分布の直流成分の振幅値をもとに、上記被測定物質の濃度を定量してもよい。

10

【 0 0 4 6 】

以上のステップを実施することによって、被測定物質の含有量 (濃度) を得ることができる。特に、本実施形態の免疫学的測定方法によれば、反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定しながら、反応系の光学的変化量を測定することができるので、光学的変化量に基づいて得られる被測定物質の含有量 (濃度) の数値の信頼性が非常に高い。

【 0 0 4 7 】

また、本実施形態の免疫学的測定方法によれば、反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定しながら、反応系の光学的変化量を測定することができるので、1つの試料溶液に対して、複数回の測定を必要とせず、複数個の反応容器を用意する必要もないので、測定手順が非常に簡単である。

20

【 0 0 4 8 】

さらに、本実施形態の免疫学的測定方法では、フーリエ変換を用いるため、測定データの変化に対して、雑音は高周波数信号と考えることができ、測定データの変化による信号と、雑音による信号とを分離することができる。このため、雑音の影響を受け難い。したがって、本実施形態によれば、簡便で、信頼性の高い免疫反応測定方法が提供される。

【 0 0 4 9 】

なお、本実施形態の免疫学的測定方法では、光学的変化量は、散乱光強度の変化量または透過光量の変化量であることが好ましい。抗原と抗体の複合体生成に依存した透過光量の変化を測定する免疫比濁法、および、散乱光量の変化を測定する免疫比濁法は地帯現象の影響を受け易いため、本実施形態の測定方法を用いた場合の効果が特に大きいのである。

30

【 0 0 5 0 】

また、ステップ S t 3 において選択される時間区間 d_2 、 d_3 は、地帯現象が生じていない場合の光学的変化量の測定データに基づいて決定された時間区間であることが好ましい。つまり、 d_2 、 d_3 として、測定の対象となる反応系の反応時間を測定するのではなく、地帯現象が生じない場合の反応時間をあらかじめ測定しておいて用いることが好ましい。地帯現象が生じていない場合の測定データは、地帯現象が生じている場合の測定データに比べて、反応系の光学的変化量の増加率 (反応速度) のピーク時刻、抗原抗体反応の飽和時刻などの情報が明確であり、抗原抗体反応が飽和した後の安定性が高く、時間区間を選択する上での基準位置の選定が容易だからである。

40

【 0 0 5 1 】

特に、地帯現象でない場合の光学的変化量の測定データに基づいて選択された測定データの時間区間 $d_2 + d_3$ は、特異結合物質と試料溶液との混合時 (すなわち、反応開始時) から、反応が実質的に飽和した後、反応系の光学的変化量が実質的に一定となっている時刻までであることが好ましい。このことによって、地帯現象の生じていない場合の測定データと、地帯現象の生じている場合の測定データとの違いを反映した離散フーリエ変換スペクトルを得ることができ、ステップ S t 2 において反応系に地帯現象が生じていたか否かを、より明確に判定することができる。なお、本明細書および特許請求の範囲において

50

、「光学的变化量が実質的に一定」とは、具体的には図2(a)に示す時間区間 d_3 における光学的变化量のことをいい、測定される光学的变化量が一定の場合だけでなく、時間区間 d_2 における光学的变化量の変化と明かに区別できる程度に光学的变化量に変化している場合も含む。また、本明細書および特許請求の範囲において、「反応が実質的に飽和する時」とは、具体的には図2(a)に示す時間区間 d_2 と時間区間 d_3 との境界の時刻をいい、図2(a)のグラフにおける光学的变化量の傾きの変化が最も大きい箇所をいう。

【0052】

また、ステップSt5では、ステップSt4で得られる離散フーリエ変換された振幅スペクトル分布において、周波数に対する振幅値の直流分の大きさの変化をもとに、抗原抗体反応が地帯領域であったか否かを判定することが好ましい。上記振幅スペクトル分布における振幅値は、免疫反応の反応曲線の立ち上がりの違いを顕著に反映しているため、ステップSt2において反応系に地帯現象が生じた場合と、地帯現象が生じていない場合との判定が容易となる。

10

【0053】

また、ステップSt4で得られた振幅スペクトル分布の直流成分の振幅値をもとに、上記被測定物質の濃度を定量することが好ましい。このようにすると、測定データに与えるノイズの影響を低減することができ、また、離散フーリエ変換したデータを有効に活用することができる。

【0054】

(第2の免疫学的測定方法)

20

次に、上述の第1の免疫学的測定方法のように、時間区間として、反応開始時から反応飽和後光学的变化量が実質的に一定になるまで(図2(a)に示す時間区間 $d_2 + d_3$)ではなく、特異結合物質と試料溶液を混合する前(すなわち、反応開始前)から、反応が実質的に飽和した後、光学的变化量が実質的に一定となっている時刻までを選択する場合について説明する。

【0055】

この場合には、図1に示すステップSt1, St2では、第1の免疫学的測定方法と同様の測定を行い、ステップSt3で、時間区間 $d_1 + d_2 + d_3$ を選択し、ステップSt4で、時間区間 $d_1 + d_2 + d_3$ を一周分とみなして離散フーリエ変換処理を行うことにより振幅スペクトル分布を取得する。そして、ステップSt5で、ステップSt4で得られる離散フーリエ変換された振幅スペクトル分布において、反応が開始された時点から反応が飽和に達する時点までの時間区間(図2(a)に示す時間区間 d_2)の逆数に相当する周波数($1/d_2$)の振幅値から、反応の開始から反応が実質的に飽和するまでの時間区間(d_2)と、反応が実質的に飽和した後、光学的变化量が実質的に一定に達するまでの時間区間(d_3)との和($d_2 + d_3$)の逆数に相当する周波数($1/(d_2 + d_3)$)の振幅値を引いた値をもとに、行われた抗原抗体反応が地帯領域であったか否かを判定することができる。このとき、 $\{(1/d_2 \text{の振幅値}) - (1/(d_2 + d_3) \text{の振幅値})\}$ の差が正の数の場合に、上記反応系に地帯現象が生じていないと判定し、上記差が負の数の場合に、上記反応系に地帯現象が生じていると判定する。このようにすると、反応系に地帯現象が生じた場合と、地帯現象が生じていない場合との判定が容易となる。

30

40

【0056】

この場合には、反応開始前から、反応が飽和するまでの時間区間を選択する場合には、反応開始前の時間区間 d_1 、反応速度の増加中の時間区間 d_2 、および反応の飽和後の時間区間 d_3 のそれぞれが、実質的に3等分されるように時間区間を選択すると、上記差の値が明確なものとなる。

【0057】

(免疫学的測定装置)

次に、上述した免疫学的測定方法に用いられる免疫学的測定装置について、図3を参照しながら説明する。図3に示すように、本実施形態の免疫学的測定装置10は、測定手段11と、測定手段11に電氣的に接続された測定データ処理手段12と、測定データ処理

50

手段 1 2 に電氣的に接続された判定手段兼定量手段 1 3 とから構成されている。なお、本明細書中で「接続」とは、特に指定のない限り「電氣的接続」を意味するものとする。

【0058】

測定手段 1 1 は、測定セル 1 4 を収容し、測定セル 1 4 内に構築される反応系の光学的变化量を測定するものであり、例えば、光学的变化量として散乱光強度または透過光量の変化量を測定できる装置などが挙げられる。なお、本実施形態では、測定手段 1 1 を、測定セル 1 4 が測定時に導入される構成としているが、これに限定されない。例えば、測定手段 1 1 の内部に測定セルが設置されている構成であってもよい。

【0059】

測定データ処理手段 1 2 は、測定手段 1 1 によって得られる測定データのうち、光学的变化量の増加率（すなわち、反応速度）が最大となる時刻を含む時間区間を選択（例えば、図 2（a）における時間区間 $d_2 + d_3$ または時間区間 $d_1 + d_2 + d_3$ ）を選択し、選択された時間区間 D を周期関数の 1 周期とみなし、選択された時間区間 $d_2 + d_3$ または時間区間 $d_1 + d_2 + d_3$ 内の離散的な光学的变化量の測定データに対して離散フーリエ変換処理を行う。このことによって、例えば、図 2（b）に示す振幅スペクトル分布を得る。

【0060】

判定 / 定量手段 1 3 は、測定データ処理手段 1 2 によって得られた振幅スペクトル分布の形状に基づいて、測定セル 1 4 内の反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定し、また、地帯現象が生じていないと判定された場合に、被測定物質の濃度を定量する。なお、判定 / 定量手段 1 3 は、反応系に地帯現象が生じていない場合の振幅スペクトル分布の形状を「基準形状」として電子データの状態で予め記憶しており、測定データ処理手段 1 2 によって得られた振幅スペクトル分布を基準形状と比較することによって判定を行う。また、判定 / 定量手段 1 3 は、被測定物質の濃度を定量するために、特定の周波数成分の振幅値と被測定物質の濃度を対応付けた数式（検量線）を電子データの状態で予め記憶しており、測定データ処理手段 1 2 によって得られた特定の周波数成分の振幅値を数式（検量線）に代入することにより被測定物質の濃度を求める。

【0061】

測定セル 1 4 は、透明の材質から構成されており、内部に液体を貯留することができる。測定を行う際には、反応系を注入した後に測定手段 1 1 に導入し、一定のサンプリング周期で光学的变化量の測定を継続しながら、特異結合物質と試料溶液を混合する。

【0062】

次に、本実施形態における免疫学的測定装置 1 0 の動作について説明する。

【0063】

まず、測定セル 1 4 内に、被測定物質または特異結合物質のうちいずれか一方を導入して反応系を構築した後、測定セル 1 4 を測定手段 1 1 に収容する。

【0064】

次に、測定手段 1 1 において、反応系の光学的变化量の測定を開始する。このとき、反応系の光学的变化量の測定は、一定のサンプリング周期で行なわれる。

【0065】

続いて、上記サンプリング周期で反応系の光学的变化量の測定を継続しながら、被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質と試料溶液を混合する。そして、反応系の光学的变化量の経時変化を、離散的な光学的变化量の測定データ（例えば、図 2（a）に示す光学的变化量の測定データ）として取得する。

【0066】

なお、測定手段 1 1 では、被測定物質または特異結合物質のいずれか一方のみが含まれている反応系を基準にしながら、反応系の光学的变化量（例えば、散乱光強度または透過光量の変化量）を測定する構成であることが好ましい。

【0067】

次に、測定データ処理手段 1 2 は、測定手段 1 1 で取得された測定データのうちの、光学的变化量の増加率（すなわち、反応速度）が最大となる時刻を含む時間区間を選択する

10

20

30

40

50

。つまり、図 2 (a) においては、時間区間 $d_2 + d_3$ または時間区間 $d_1 + d_2 + d_3$ を選択する。

【 0 0 6 8 】

次に、測定データ処理手段 1 2 は、選択された時間区間 $d_2 + d_3$ または時間区間 $d_1 + d_2 + d_3$ を周期関数の 1 周期とみなし、選択された時間区間 $d_2 + d_3$ または時間区間 $d_1 + d_2 + d_3$ 内の離散的な光学的変化量の測定データに対して離散フーリエ変換処理を行うことによって、例えば、図 2 (b) に示す振幅スペクトル分布を得る。

【 0 0 6 9 】

次に、判定 / 定量手段 1 3 は、測定データ処理手段 1 2 によって得られた振幅スペクトル分布の形状に基づいて、測定セル 1 4 内の反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定し、また、被測定物質の濃度を定量する。 10

【 0 0 7 0 】

本実施形態の免疫学的測定装置 1 0 によれば、反応系に地帯現象が生じていたか否かを判定しながら、反応系の光学的変化量を測定することができる。このため、光学的変化量に基づいて得られる被測定物質の含有量（濃度）の数値の信頼性が非常に高い。従って、本実施形態によれば、簡便で、信頼性の高い免疫反応測定を行うことができる。

【 0 0 7 1 】

なお、測定手段 1 1 の具体例としては、吸光光度計が挙げられる。また、測定データ処理手段 1 2 としては、A / D 変換素子を用いて、測定データを測定手段 1 1 から A / D 変換によって取得する構成とすることが好ましい。 20

【 0 0 7 2 】

本実施形態の免疫反応測定装置 1 0 では、測定データ処理手段 1 2 および判定 / 定量手段 1 3 を個別に設ける構成としているが、これに限定されない。例えば、測定データ処理手段 1 2 および判定 / 定量手段 1 3 を、ソフトウェアと 1 台のコンピュータとを用いて構成してもよい。また、DSP (Digital Signal Processor) などの回路素子を使用して構成してもよい。

【 0 0 7 3 】

測定データ処理手段 1 2 としてコンピュータを用いる場合、測定データ処理手段 1 2 における時間区間の選択基準および範囲は、ソフトウェアによって作業者が任意に指定可能である構成としてもよい。 30

【 0 0 7 4 】

また、測定データ処理手段 1 2 がコンピュータであり、特定の試料溶液を用いて測定を行う場合、測定データ処理手段 1 2 によって選択される時間区間を、ROM、RAM などのメモリ上に記憶可能な構成であることが好ましい。このとき記憶させる時間区間は、地帯現象が生じていない場合の光学的変化量の測定データに基づいたものであることが好ましい。

【 0 0 7 5 】

判定 / 定量手段 1 3 としてコンピュータを用いる場合、地帯現象の判定に用いる基準形状は、ソフトウェアによって作業者が任意に設定可能である構成としてもよい。

【 0 0 7 6 】

また、判定 / 定量手段 1 3 がコンピュータであり、特定の試料溶液を用いて測定を行う場合、基準形状は ROM、RAM などのメモリ上に記憶可能な構成であることが好ましい。さらに、基準形状は、各周波数ごとの振幅値を有する振幅スペクトル分布とすることが好ましい。 40

【 0 0 7 7 】

以上説明したように、本実施形態の免疫学的測定方法および免疫学的測定装置によれば、1 つの試料溶液に対して、複数回の測定を必要とせず、複数個の反応容器を用意する必要もなく、また、多波長測定を必要とせず、測定手順および装置構成が非常に簡単である。

【 0 0 7 8 】

特に、本実施形態の免疫学的測定方法および免疫学的測定装置では、1波長の光による測定で、地帯現象が生じるか否かの判定が可能であるので、装置構成が簡単になり、また、測定工程が煩雑にならない。また、フーリエ変換を用いているため、測定データの変化に対して、雑音は高周波数信号と考えることができ、測定データの変化による信号と、雑音による信号とを分離することができる。このため、雑音の影響を受け難い。

【実施例1】

【0079】

以下、実施例を用いて本発明を説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。まず、上記実施形態で説明した免疫学的測定装置10の具体的構成例について述べる。なお、本実施例では、上述の第1、第2の免疫学的測定方法のうち後者の方法（時間区間 $d_1 + d_2 + d_3$ を選択する方法）を用いて説明する。 10

【0080】

本実施例では測定手段11を次のように構成した。光源として270Hzで変調した波長680nmの出力15mW半導体レーザーポインタ（キコー技研製、型番MLXS-D-12-680-35）を、検出器として可視赤外精密測光用シリコンフォトダイオード（浜松フォトンクス製、型番S2387-66R）を用いた。測定セルとして、厚さ0.1cmの光学ガラス板を張り合わせた正四角柱形の容量約200 μ lの測定セルを用いた。光源、検出器、測定セルの各配置は、光源より0.5cmのところに、その一面が光源からの出射光の光軸と垂直になるように測定セルを配置し、検出器は、光源と90°の角度を成す方向に、測定セルより5.5cm離れた場所に配置し、検出器に迷光が入射しないように、検出器とセルとの間には遮光筒を設けた。検出器により検知された光量に依存した電流信号は、電流電圧変換回路（ 10^6 V/A）およびオペアンプによる増幅回路を経て100倍の電圧信号に増幅された後、ロックインアンプ（エヌエフ回路設計ブロック製、型番5610B）を通して位相敏感検波され、GPIB制御により一定間隔でコンピュータに取り込まれる。本実施例の場合サンプリング周期は0.5秒とした。 20

【0081】

測定データ処理手段12を次のように構成した。本実施例においては、選択される時間区間の設定を、反応開始前から、反応が飽和し一定期間経過後までの範囲とし、反応開始前、反応増加中、及び飽和後のデータ長が実質的に等分されるように設定することとした。後述の実施例2に示す抗原抗体反応に対しては、反応開始10秒前から反応開始後約22秒までの時間区間の64点のサンプリングデータを取得した。これを周期32秒、周波数0.03125Hzの周期信号とみなし、Microsoft Excel（Microsoft社製）上で離散的フーリエ変換処理し、振幅スペクトル分布を求める構成とした。 30

【0082】

判定/定量手段13における判定手段には、被測定物質と特異結合物質とを混合し、反応の開始時から反応が飽和に達する時点までの時間区間（図2（a）における d_2 ）の逆数（ $1/d_2$ ）に相当する周波数における振幅値と、反応の開始から反応が飽和するまでの時間区間（図2（a）における d_2 ）と、反応が実質的に飽和した後、光学的变化量が実質的に一定に達するまで（図2（a）における d_3 ）との和（ $d_2 + d_3$ ）の逆数に相当する周波数（ $1/(d_2 + d_3)$ ）における振幅値を対比する方法をとった。具体的には、上記の d_2 である約10秒の逆数に相当する周波数である0.0938Hzにおける振幅値と、上記の $d_2 + d_3$ である約15秒の逆数に相当する周波数である0.0625Hzにおける振幅値との差である{（0.0938Hzの振幅値）-（0.0625Hzの振幅値）}の値を計算により求め、この値が正の場合は、地帯現象が生じていないと判定し、この値が負の場合は地帯現象が生じていると判定する構成とした。 40

【0083】

また、定量手段は、振幅スペクトル分布の直流成分の振幅値を用いて定量する方法をとる。具体的には、直流成分の振幅値と被測定物質の濃度を対応付けた数式（検量線）に、被測定物質の測定によって得られた直流成分の振幅値を代入することによって被測定物質 50

の濃度を求める構成とした。

【実施例 2】

【0084】

本実施例では、第 1 の実施例で述べた判定が有効であることを示す。ここでは、予め濃度のわかっている被測定物質を用いて抗原・抗体反応を行い、どの濃度から地帯現象が起こるのかを解析した上で、地帯現象が起こっている場合と起こっていない場合との振幅スペクトルを比較している。ここでは、ヒトアルブミンを被測定物質とした免疫反応測定方法の例を示す。なお、以下に示す緩衝液などの調製には、Milli-Q SP TOC (Millipore 社製) でろ過した純水を使用した。また、以下で特に記載の無い塩、緩衝剤などの試薬としては、いずれも和光純薬工業製のものを使用し、ポリエチレングリコール 6000 は 1 級試薬を、それ以外のものは特級試薬を使用した。

【0085】

ウサギ抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体 (以下、単に抗体と示す) 溶液は、ヒトアルブミンを免疫したウサギより採取した抗血清から、プロテイン A カラムクロマトグラフィーを用いて精製した後、透析することにより得た。カラムに充填したプロテイン A 固定化ゲルとしては、アマシャムファルマシア製のものを使用した。精製に用いた平衡化緩衝液には、1.5 M グリシン、3.0 M NaCl、pH 8.9 の組成のものを使用し、溶出緩衝液には、クエン酸水溶液 (0.1 M クエン酸、pH 4.0) を使用した。溶出した抗体分画は、分画分子量 1 万の透析チューブに入れ、約 100 倍容量の 0.05 M 3- (N-モルホリノ) プロパンスルホン酸 (Dojin 製、以下モプスと略す)、0.15 M NaCl、0.04 重量% NaN₃、pH 7.4 の組成の緩衝液で数回透析した後、緩衝液成分を置換した。続いて、抗体濃度を 280 nm の吸光度測定により推定し、透析で用いたものと同じ緩衝液で調整して抗体濃度を 3.0 mg/ml とした。

【0086】

抗原に用いたヒトアルブミン (和光純薬工業製) 溶液 (すなわち試料溶液) は、抗体を透析したのと同じ緩衝液を用いて、濃度が 0、5、10、20、30、50、100、200、および 300 mg/dl になるように溶解して調製した。

【0087】

測定に用いた緩衝液は、0.05 M モプス、4 重量% ポリエチレングリコール 6000、pH 7.4 の組成とした。

【0088】

各緩衝液について、各濃度のヒトアルブミン溶液の測定は次のようにして行なった。反応系の組成は、緩衝液を 160 μ l、ヒトアルブミン溶液を 9 μ l、抗体溶液を 23 μ l とした。反応系における抗体およびヒトアルブミンの最終濃度は、抗体が約 0.11 mg/ml、ヒトアルブミンが、測定に使用したヒトアルブミン溶液の濃度に 0.046 を乗じたものになる。

【0089】

まず、上述のように構成した免疫反応測定装置の測定セル内に緩衝液とヒトアルブミン溶液とを上記容量で加えて攪拌混合し、反応系を構築した。続いて、抗体溶液を上記容量で反応系に加えて攪拌混合し、抗原抗体反応を生じさせた。散乱光の測定は、抗体溶液を加える 10 秒前から開始し、0.5 秒間隔で 200 秒間継続した。測定値は電圧値として得られた。測定セルの汚れが測定に与える影響は、各反応の測定前に測定セル中に純水を入れて測定し、測定値を補正することにより除いた。測定は室温 (約 20) で行った。

【0090】

図 4 は、免疫反応が十分に飽和した 150 秒から 200 秒の間の測定値の平均値をプロットした結果である。図 4 より、100 mg/dl 以上のヒトアルブミン溶液の測定が地帯現象の影響を受けていることがわかる。

【0091】

図 5 は、各ヒトアルブミン溶液の測定で得られた散乱光強度の経時変化を示したものである。地帯現象を検出するための離散フーリエ変換はこの測定値に対して行った。

10

20

30

40

50

【0092】

図6～図13は、5mg/dlから300mg/dlの濃度のヒトアルブミン溶液の測定により得られた測定データを離散フーリエ変換した後、振幅スペクトル分布を求めた結果を示したものである。この結果によると、地帯現象が起こっていない5～50mg/dlのヒトアルブミン溶液の場合、いずれも{(0.0938Hzの振幅値)-(0.0625Hzの振幅値)}の値が正であることが確認できる。また、地帯現象が起こっている100～300mg/dlのヒトアルブミン溶液の結果の場合、いずれも{(0.0938Hzの振幅値)-(0.0625Hzの振幅値)}の値は負であることが確認できる。実際の計算値はそれぞれ、5mg/dlのヒトアルブミン溶液の結果の場合は1.65となり、10mg/dlのヒトアルブミン溶液の結果の場合は3.37となり、20mg/dlのヒトアルブミン溶液の結果の場合は5.54となり、30mg/dlのヒトアルブミン溶液の結果の場合は5.80となり、50mg/dlのヒトアルブミン溶液の結果の場合は8.69となり、100mg/dlのヒトアルブミン溶液の結果の場合は-0.962となり、200mg/dlのヒトアルブミン溶液の結果の場合は-1.93となり、300mg/dlのヒトアルブミン溶液の結果の場合は-2.44となった。

10

【0093】

図14は、図5において実質的に同一の経時変化を示した5mg/dlのヒトアルブミン溶液の場合の振幅スペクトル分布と、300mg/dlのヒトアルブミン溶液の場合の振幅スペクトル分布とを、対比して示したものである。この図からわかるように、地帯現象が起こらない5mg/dlのヒトアルブミン溶液の場合と、地帯現象が起こる300mg/dlのヒトアルブミン溶液の場合とで、0.0938Hzの振幅値と0.0625Hzの振幅値とが逆転している。つまり、{(0.0938Hzの振幅値)-(0.0625Hzの振幅値)}の値の正負が、地帯現象が生じているか否かを反映している。

20

【0094】

続いて、濃度を定量した結果について述べる。検量線には、上記で得られた5, 10, 20mg/dlのヒトアルブミン溶液の結果を用いて作成したものを用いた。求めた検量線は、直流成分の振幅値をyとし、ヒトアルブミン溶液濃度をxとすると、 $y = 6.12x + 29.1$ であった。この検量線が有効であることを実証するために、15mg/dlのヒトアルブミン溶液の直流成分の振幅値を測定した結果を上記検量線に代入してヒトアルブミン溶液濃度を求め、実際の濃度と一致するかどうかを確認した。

30

【0095】

振幅値は合計3回測定した。この3回の測定では、直流成分の振幅値はそれぞれ123、124、122となり、上記検量線より求めたヒトアルブミン溶液濃度はそれぞれ、15.3、15.5、15.2mg/dlと計算でき、実際の濃度に対して良い推定ができた。これより、直流成分の振幅値を用いる方法が被測定物質の濃度を定量するための手段として有効であることが確認できた。

【0096】

以上の結果より、本発明の免疫学的測定方法および免疫学的測定装置が、地帯現象の検知において効果があることが確認できた。また、本発明は、単一波長、単一測定で地帯現象の検知が可能であるため、複数回の測定を必要とせず、また、複数個の反応容器を用意する必要もなく、また、多波長測定を必要とせず、測定工程および装置構成が容易であることが確認できた。また、本発明により、被測定物質の濃度が測定可能であることが確認できた。

40

【実施例3】

【0097】

本実施例では、本発明の免疫学的測定方法が雑音の影響を受けにくいことを示す。図15は、実施例2において得た5mg/dlおよび300mg/dlのヒトアルブミン溶液における散乱光強度の経時変化を示したものである。実施例2では、図15に示す時間区間の測定データに対して離散フーリエ変換を行い、振幅スペクトル分布を得た。一方、図16は、図15に示す時間区間の測定データに対して、変動幅が散乱光強度値で0.2に

50

相当するランダムノイズを付加したものを示す。本実施例では、図 1 5 および図 1 6 に示したデータを用いて、従来法の微分（差分）による方法と、本発明の免疫学的測定方法とを対比する。

【0098】

図 1 7 は、図 1 5 に示したランダムノイズを付加しなかった場合の測定データに対して、0.5 秒データをずらして差分をとった結果である。この結果によれば、地帯現象が起こらない 5 mg / d l のヒトアルブミン溶液の結果と、地帯現象が起こる 3 0 0 mg / d l のヒトアルブミン溶液の結果では、ピーク位置、すなわち反応速度のピーク位置が変化している。従って、図 1 7 に基づいて、地帯現象が生じているか否かの判定が可能ながわかる。

10

【0099】

図 1 8 は、図 1 6 に示したランダムノイズを付加した場合の測定データに対して、0.5 秒データをずらして差分をとった結果である。この結果によれば、ランダムノイズの影響により、ピーク位置、すなわち反応速度のピーク位置を決定することが容易ではない。また、地帯現象が起こらない 5 mg / d l のヒトアルブミン溶液の結果と、地帯現象が起こる 3 0 0 mg / d l のヒトアルブミン溶液の結果の差が明確でない。このため、図 1 8 に基づいて、地帯現象が生じているか否かの判定は容易ではないことがわかる。以上のよう、微分（差分）をもとにした方法は、雑音の影響を受け易いことがわかる。

【0100】

次に、本発明の地帯現象の検知方法について、図 1 5 に示したランダムノイズを付加しなかった場合の測定データに対して、離散フーリエ変換を行ない、振幅スペクトル分布を求めた結果を図 1 4 に、図 1 6 に示したランダムノイズを付加した場合の測定データに対して、離散フーリエ変換を行ない、振幅スペクトル分布を求めた結果を図 1 9 に示す。両図より明らかなように、 $\{ (0.0938 \text{ Hz の振幅値}) - (0.0625 \text{ Hz の振幅値}) \}$ の値は雑音の影響を受けず、いずれの場合も、5 mg / d l のヒトアルブミン溶液の場合は正となり、3 0 0 mg / d l のヒトアルブミン溶液の場合は負となり、地帯現象であるか否かの判定が可能であることがわかる。

20

【0101】

以上の結果より、本発明の免疫学的測定方法によれば、地帯現象が生じているか否かの判定結果が、雑音の影響を受けにくく、安定して得られることが確認できた。

30

【実施例 4】

【0102】

以下に、上記実施形態で説明した第 1, 第 2 の免疫学的測定方法のうち前者の方法（時間区間 $d_1 + d_2$ を選択する方法）を用いた場合の免疫学的測定方法について説明する。

【0103】

測定手段 1 1 の構成は実施例 1 と同様にした。測定データ処理手段 1 2 は次のように構成した。本実施例においては、選択される時間区間の設定を、被測定物質と特異結合物質とを混合して反応が開始したときから、反応が実質的に飽和した後一定期間経過後までの範囲とした。前述の実施例 2 に示したのと同様の抗原抗体反応に対して、反応開始時から反応開始後約 3 2 秒までの時間区間の 6 4 点のサンプリングデータを取得した。これを周期 3 2 秒、周波数 0.03125 Hz の周期信号とみなし、Microsoft Excel 上で離散的フーリエ変換処理し、振幅スペクトル分布を求める構成とした。

40

【0104】

判定 / 定量手段 1 3 における判定手段には、上記で求めた振幅スペクトル分布を基に、少なくとも、被測定物質と特異結合物質とを混合して反応が開始されたときから、反応が実質的に飽和した後一定期間経過後までの時間区間（図 2 (a) における $d_2 + d_3$ ）の逆数に相当する周波数における振幅値について、直流成分の振幅値に対する比率を求め、その大きさを基に判定する方法をとった。

【0105】

具体的には、上記 $d_2 + d_3$ の時間区間である約 15 秒の逆数に相当する周波数である 0

50

・ 0.625 Hz における振幅値の、直流成分に対する比率を計算により求める。このようにすると、被測定物質が地帯現象を生じない濃度である場合と、被測定物質が地帯現象を生じる濃度である場合では、求めた値が異なる分布を示し差が明確となる。例えば、実施例 2 に示した抗原抗体反応の条件に対しては、0.625 Hz の振幅値の直流成分の振幅値に対する比率は、それぞれ、5 mg / dl のヒトアルブミン溶液の結果の場合は 0.135 となり、10 mg / dl のヒトアルブミン溶液の結果の場合は 0.124 となり、20 mg / dl のヒトアルブミン溶液の結果の場合は 0.125 となり、30 mg / dl のヒトアルブミン溶液の結果の場合は 0.123 となり、50 mg / dl のヒトアルブミン溶液の結果の場合は 0.133 となり、100 mg / dl のヒトアルブミン溶液の結果の場合は 0.113 となり、200 mg / dl のヒトアルブミン溶液の結果の場合は 0.110 となり、300 mg / dl のヒトアルブミン溶液の結果の場合は 0.095 となり、被測定物質の濃度が地帯現象を生じない濃度である場合には、0.120 を上回る値で分布し、被測定物質の濃度が地帯現象を生じる濃度である場合には、0.625 Hz の振幅値の直流成分の振幅値に対する比率は、0.120 を下回る値で分布する。

10

20

30

40

50

【0106】

したがって、実施例 2 に示した抗原抗体反応の条件に対しては、基準値を 0.120 とし、濃度の不明な試料溶液で算出した振幅値の直流成分の振幅値に対する比率と基準値との差 { (0.625 Hz の振幅値の直流成分の振幅値に対する比率) - (基準値) } を求め、この値が正の場合は、地帯領域でないと判断し、この値が負の場合は地帯領域であると判断する構成することにより、被測定物質の濃度が地帯現象を生じない濃度であるか否かの判定ができる。

【0107】

以上の結果より、本発明の第 4 の実施例で述べた免疫学的測定方法および免疫学的測定装置が、地帯現象の検知において効果があることが確認できた。また、本発明は、単一波長、単一測定で地帯現象の検知が可能であるため、複数回の測定を必要とせず、また、複数個の反応容器を用意する必要もなく、また、多波長測定を必要とせず、測定工程および装置構成が容易であることが確認できた。

【図面の簡単な説明】

【0108】

【図 1】図 1 は、本発明の実施形態における免疫反応測定方法の各ステップを表すフローチャートである。

【図 2】図 2 (a) は、本発明の実施形態における離散的な光学的変化量の測定データを示すグラフであり、図 2 (b) は、本発明の実施形態における振幅スペクトル分布を示すグラフである。

【図 3】図 3 は、本発明の実施形態による免疫学的測定装置の構成を表す概略図である。

【図 4】図 4 は、本発明の実施例における免疫比濁法によるヒトアルブミン溶液の測定について、免疫反応が十分に飽和した 150 秒から 200 秒の間の測定値の平均値をプロットした結果を示すグラフである。

【図 5】図 5 は、本発明の実施例におけるヒトアルブミン溶液の測定で得られた散乱光強度の経時変化を示したものである。

【図 6】図 6 は、本発明の実施例における 5 mg / dl のヒトアルブミン溶液の測定で得られた散乱光強度の経時変化について、離散フーリエ変換を施して得られた振幅スペクトル分布である。

【図 7】図 7 は、本発明の実施例における 10 mg / dl のヒトアルブミン溶液の測定で得られた散乱光強度の経時変化について、離散フーリエ変換を施して得られた振幅スペクトル分布である。

【図 8】図 8 は、本発明の実施例における 20 mg / dl のヒトアルブミン溶液の測定で得られた散乱光強度の経時変化について、離散フーリエ変換を施して得られた振幅スペクトル分布である。

【図 9】図 9 は、本発明の実施例における 30 mg / dl のヒトアルブミン溶液の測定で

得られた散乱光強度の経時変化について、離散フーリエ変換を施して得られた振幅スペクトル分布である。

【図 10】図 10 は、本発明の実施例における 50 mg / dl のヒトアルブミン溶液の測定で得られた散乱光強度の経時変化について、離散フーリエ変換を施して得られた振幅スペクトル分布である。

【図 11】図 11 は、本発明の実施例における 100 mg / dl のヒトアルブミン溶液の測定で得られた散乱光強度の経時変化について、離散フーリエ変換を施して得られた振幅スペクトル分布である。

【図 12】図 12 は、本発明の実施例における 200 mg / dl のヒトアルブミン溶液の測定で得られた散乱光強度の経時変化について、離散フーリエ変換を施して得られた振幅スペクトル分布である。 10

【図 13】図 13 は、本発明の実施例における 300 mg / dl のヒトアルブミン溶液の測定で得られた散乱光強度の経時変化について、離散フーリエ変換を施して得られた振幅スペクトル分布である。

【図 14】図 14 は、本発明の実施例における 5 mg / dl および 300 mg / dl のヒトアルブミン溶液の測定で得られた散乱光強度の経時変化について、離散フーリエ変換を施して得られた振幅スペクトル分布である。

【図 15】図 15 は、5 mg / dl および 300 mg / dl のヒトアルブミン溶液の測定における散乱光強度の経時変化を示したものである。

【図 16】図 16 は、図 15 に示す時間区間の測定データに対してランダムノイズを付加したものを示す。 20

【図 17】図 17 は、図 15 に示した測定データに対して、0.5 秒データをずらして差分をとった結果である。

【図 18】図 18 は、図 16 に示した測定データに対して、0.5 秒データをずらして差分をとった結果である。

【図 19】図 19 は、図 16 に示したランダムノイズを付加した場合の測定データに対して、離散フーリエ変換を行ない、振幅スペクトル分布を求めた結果を示す。

【図 20】図 20 (a) および図 20 (b) は、均一系の免疫反応測定方法の反応系における抗原および抗体の反応の様子を模式的に示す図である。

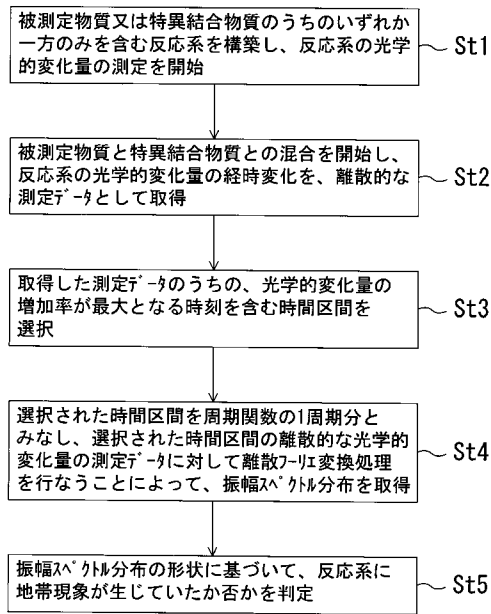
【符号の説明】

30

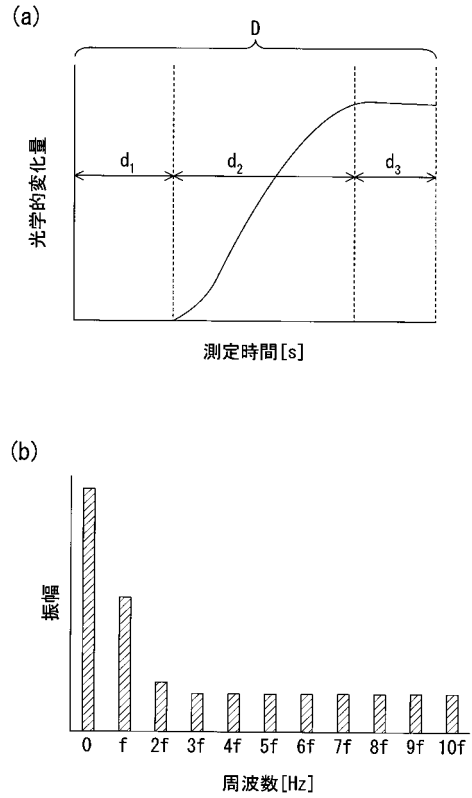
【0109】

- 10 免疫学的測定装置
- 11 測定手段
- 12 測定データ処理手段
- 13 判定 / 定量手段
- 14 測定セル

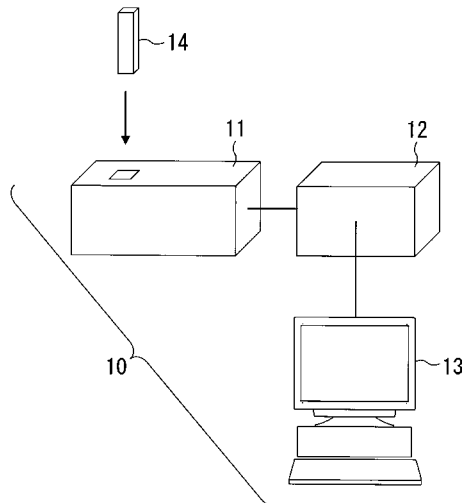
【図 1】



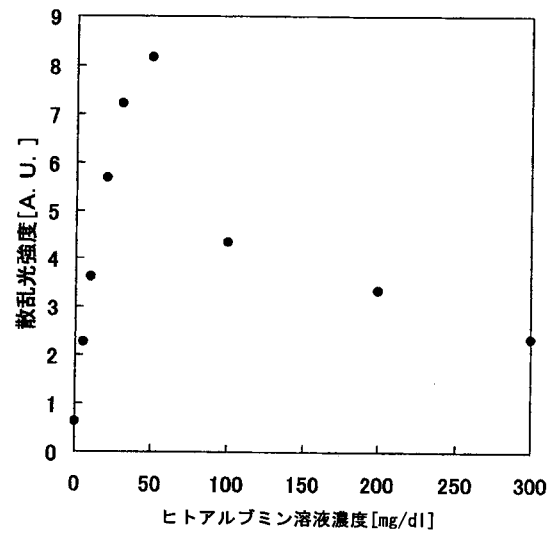
【図 2】



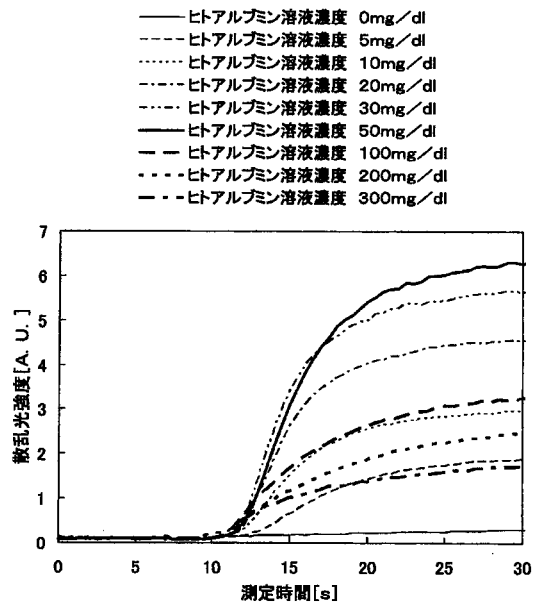
【図 3】



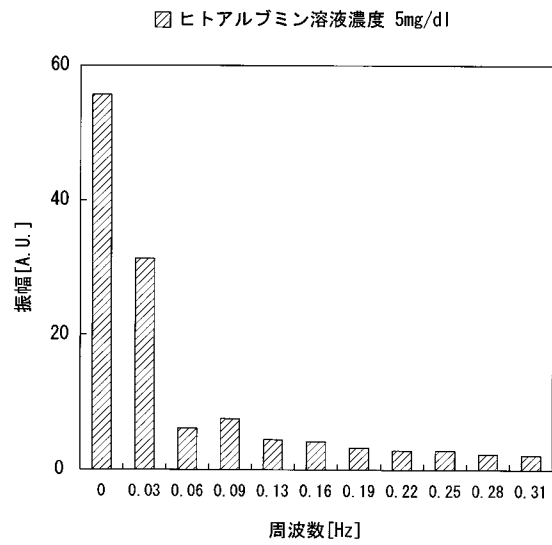
【図 4】



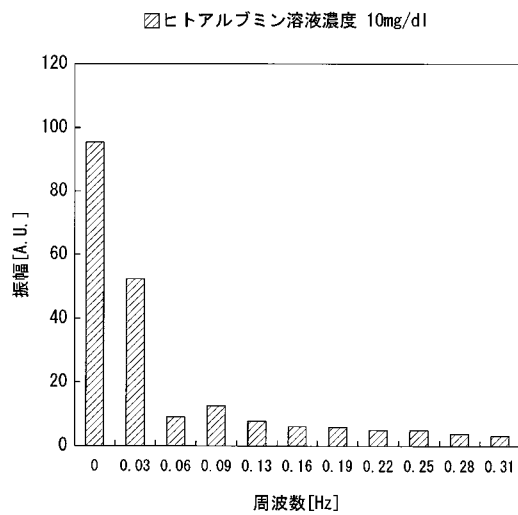
【図 5】



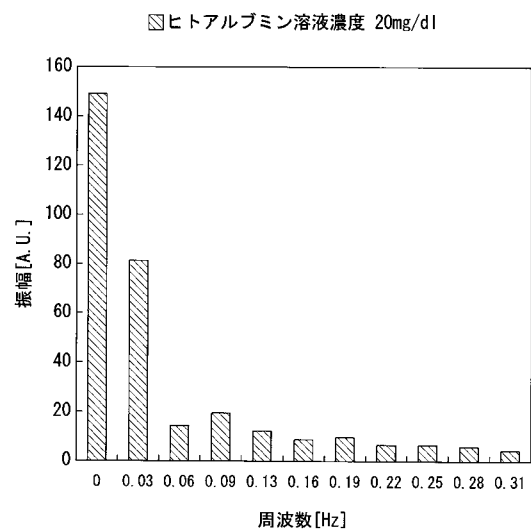
【図 6】



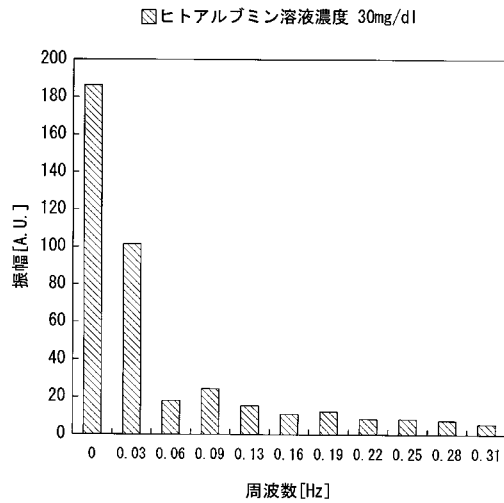
【図 7】



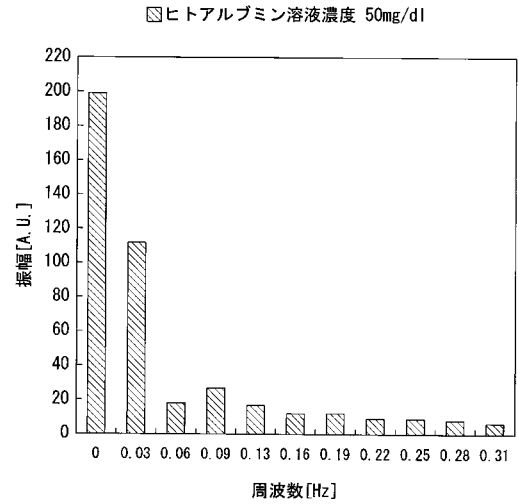
【図 8】



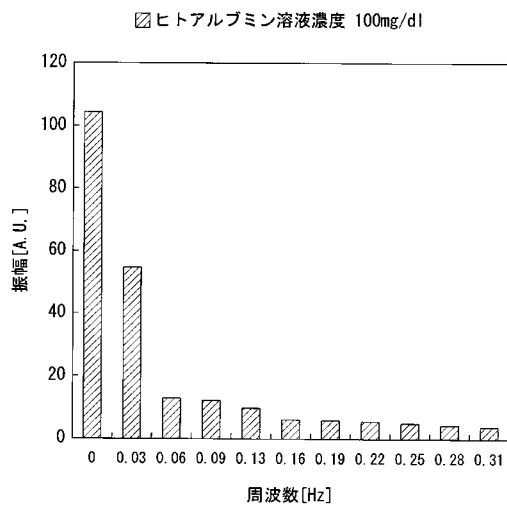
【図 9】



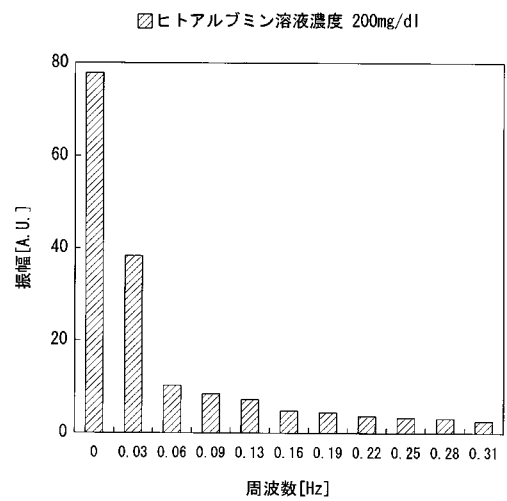
【図 10】



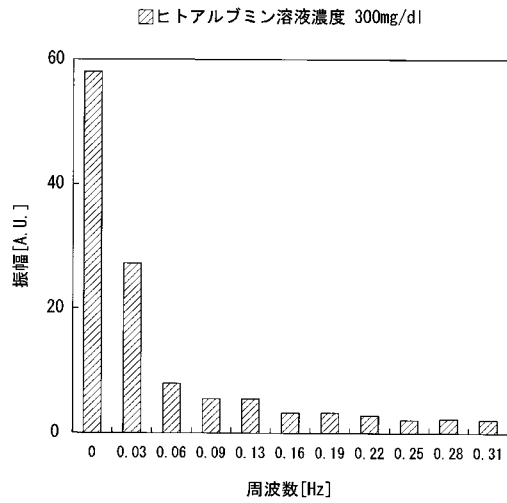
【図 11】



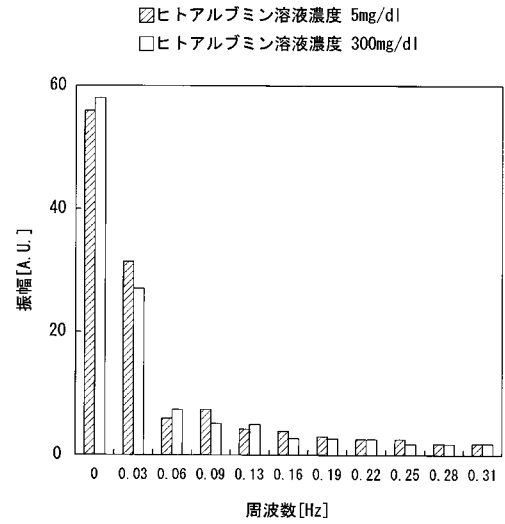
【図 12】



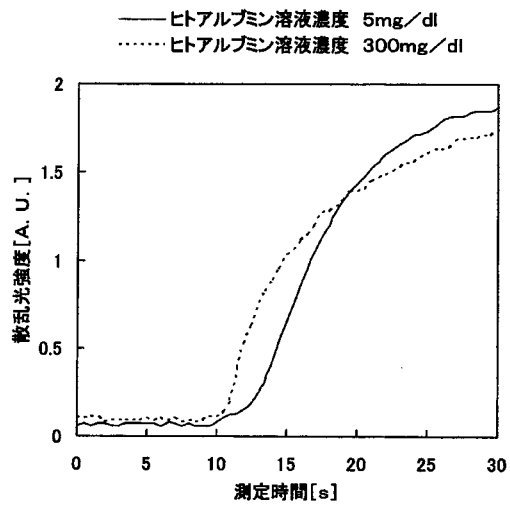
【図 13】



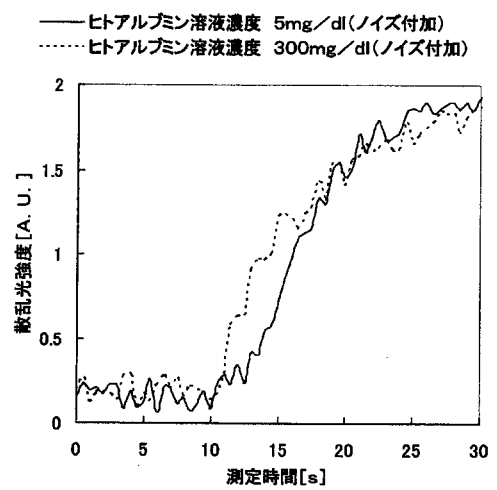
【図 14】



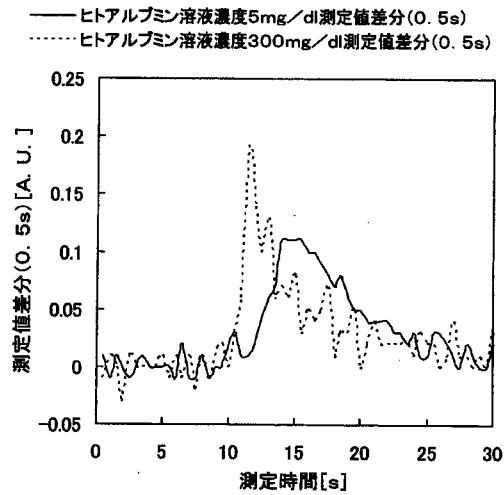
【図 15】



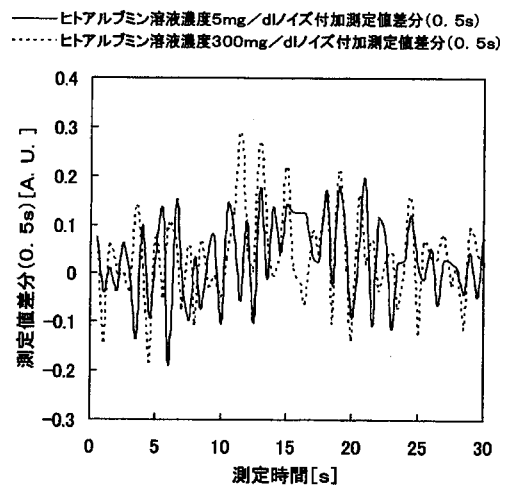
【図 16】



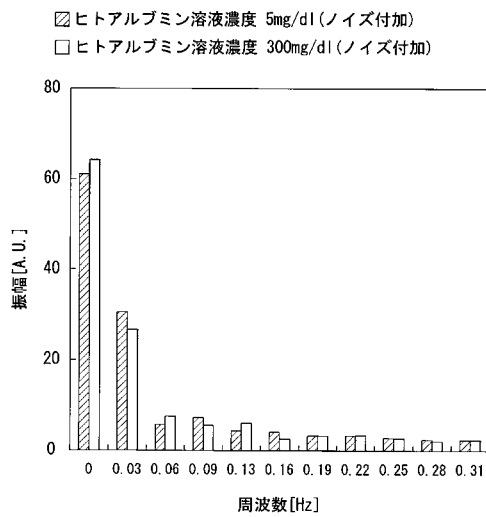
【図 17】



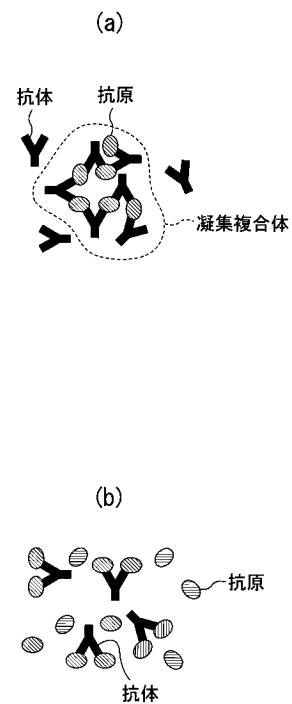
【図 18】



【図 19】



【図 20】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/536	G 0 1 N 33/536	Z

(74)代理人 100115691

弁理士 藤田 篤史

(74)代理人 100117581

弁理士 二宮 克也

(74)代理人 100117710

弁理士 原田 智雄

(74)代理人 100121728

弁理士 井関 勝守

(72)発明者 亀井 明仁

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

(72)発明者 河村 達朗

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

F ターム(参考) 2G054 AA06 AB04 CA23 EA04 EA05 EB03 EB10 FA22 FA32 FA33
FA50 GA03 GA05 JA01 JA20
2G059 AA01 BB04 BB12 CC16 DD05 DD13 EE01 EE02 FF04 MM01
NN07 PP04

专利名称(译)	免疫应答测量方法和免疫反应测量装置		
公开(公告)号	JP2005043352A	公开(公告)日	2005-02-17
申请号	JP2004196925	申请日	2004-07-02
申请(专利权)人(译)	松下电器产业有限公司		
[标]发明人	亀井明仁 河村達朗		
发明人	亀井 明仁 河村 達朗		
IPC分类号	G01N33/557 G01N21/47 G01N21/59 G01N21/77 G01N33/53 G01N33/536		
FI分类号	G01N33/557 G01N21/47.Z G01N21/59.Z G01N21/77.Z G01N33/53.T G01N33/536.Z		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/CA23 2G054/EA04 2G054/EA05 2G054/EB03 2G054/EB10 2G054/FA22 2G054/FA32 2G054/FA33 2G054/FA50 2G054/GA03 2G054/GA05 2G054/JA01 2G054/JA20 2G059/AA01 2G059/BB04 2G059/BB12 2G059/CC16 2G059/DD05 2G059/DD13 2G059/EE01 2G059/EE02 2G059/FF04 2G059/MM01 2G059/NN07 2G059/PP04		
代理人(译)	前田弘 竹内浩 高久島 竹内雄二 藤田淳		
优先权	2003271423 2003-07-07 JP		
其他公开文献	JP2005043352A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种简单且测量精度高的免疫学测量方法和用于其的免疫学测量装置。溶液：在步骤St1中，构建含有被测定物或特定结合物的反应体系，开始光学变化量的测定，在步骤St2中，混合特定结合物和被测物。是根据时间来衡量的。在步骤St3，选择包括所获取的测量数据中光学变化量的增加率最大的时间的时间段。在步骤St4中，将所选择的时间间隔视为周期函数的一个周期，并且对光学变化量的测量数据执行离散傅里叶变换处理，以获得幅度谱分布。在步骤St5，通过将振幅谱分布与参考形状进行比较，确定反应系统中是否已发生区域现象。点域

1

