



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410063761.8

[43] 公开日 2005年2月9日

[11] 公开号 CN 1576843A

[22] 申请日 2004.7.7

[21] 申请号 200410063761.8

[30] 优先权

[32] 2003.7.7 [33] JP [31] 2003-271423

[71] 申请人 松下电器产业株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 龟井明仁 河村达朗

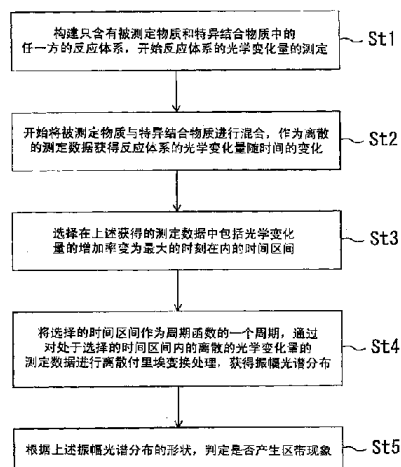
[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 汪惠民

权利要求书 4 页 说明书 21 页 附图 20 页

[54] 发明名称 免疫反应测定方法以及免疫反应测定装置

[57] 摘要

本发明提供一种简便并且测定精度高的免疫学测定方法以及该方法中使用的免疫学测定装置。在步骤 St1 构建含有被测定物质或特异结合物质的反应体系，开始光学的变化量的测定，在步骤 St2 将特异结合物质和被测定物质进行混合，作为离散的测定数据获得光学变化量随时间的变化。在步骤 St3，选择在上述测定数据中包括光学变化量的增加率变为最大的时刻在内的时间区间。在步骤 St4，将选择的时间区间作为周期函数的一个周期，通过对光学变化量的测定数据进行离散傅立叶变换处理，获得振幅光谱分布。在步骤 St5，根据上述振幅光谱分布的形状，判定在上述反应中是否产生区带现象。



- 1、一种免疫反应测定方法，测定样品溶液中含有的被测定物质浓度
5 包括：对上述样品溶液和与上述被测定物质特异结合的特异结合物质进行混合，以所定的采样周期，将在上述被测定物质与上述特异结合物质的反应中的光学变化量随时间的变化以离散的测定数据获得的步骤（a），
对在上述测定数据中包括光学变化量的增加率变为最大的时刻在内的时间区间进行选择的步骤（b），
10 将上述时间区间作为周期函数的一个周期，通过对处于上述时间区间内的上述测定数据进行离散傅立叶变换处理，获得振幅光谱分布的步骤（c），
根据上述振幅光谱分布的形状，判定在上述步骤（a）的上述反应中是否产生区带现象的步骤（d），
15 上述被测定物质和上述特异结合物质的组合是抗原和抗体的组合。
- 2、根据权利要求 1 所述的免疫测定方法，其中上述光学的变化量可以是散射光强度的变化量或透射光量的变化量。
- 3、根据权利要求 1 所述的免疫测定方法，其中上述时间区间，根据不产生区带现象时的反应中测定的光学的变化量的测定数据预先确定。
- 20 4、根据权利要求 1 所述的免疫测定方法，其中上述时间区间是从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应实质上饱和后光学的变化量实质上达到一定的时刻为止的区间。
- 5、根据权利要求 4 所述的免疫测定方法，其中在上述步骤（d）中，根据上述振幅光谱分布的形状和在不产生区带现象时的反应中测定的振幅光谱分布的形状，判定在上述步骤（a）的反应中是否产生区带现象。
25 6、根据权利要求 4 所述的免疫测定方法，其中在上述步骤（d）中，以相当于上述时间区间的倒数的频率处的振幅值的相对于上述振幅光谱的直流成分的比率为基础，判定在上述步骤（a）的反应中是否产生区带现象。
- 30 7、根据权利要求 6 所述的免疫测定方法，其中在上述步骤（d）中，

上述比率超过由不产生区带现象时的反应和产生区带现象时的反应两者的分布结果求出的基准值时，判定上述步骤（a）的上述反应中不产生区带现象，当低于上述基准值时判定上述步骤（a）的上述反应中产生区带现象。

- 5 8、根据权利要求 1 所述的免疫测定方法，其中在上述步骤（a）之前还备有，构建含有上述样品溶液和上述特异结合物质中任一方的反应体系，再以上述所定的采样周期，将上述反应体系中光学变化量随时间的变化以离散的测定数据获得的步骤（e），

10 在上述步骤（a）中，通过向上述反应体系添加上述样品溶液和上述特异结合物质中的不含在上述反应体系中的一方，对上述样品溶液和上述特异结合物质进行混合，

上述时间区间是从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应体系中的反应实质上饱和后光学的变化量实质上达到一定的时刻为止的区间。

- 15 9、根据权利要求 8 所述的免疫测定方法，其中在上述步骤（d）中，当相当于从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应体系的反应实质上饱和时刻的时间区间的倒数的频率处的振幅值，与相当于对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应体系的反应实质上饱和后光学的变化量实质上达到一定的时刻
- 20 为止的时间区间的倒数的频率处的振幅值的差，为正的数时，判定在上述步骤（a）的上述反应体系中不产生区带现象，当上述差值为负的数时，判定在上述步骤（a）的上述反应体系中产生区带现象。

25 10、根据权利要求 1 所述的免疫测定方法，其中以上述步骤（c）中的上述振幅光谱分布的直流成分的振幅值为基础，对上述测定物质的浓度进行定量。

11、一种免疫学反应测定装置，备有：对含有被测定物质的样品溶液和与上述被测定物质特异结合的特异结合物质进行混合时反应的光学变化量进行测定的测定机构，

30 与上述测定机构相连，对通过上述测定机构得到的测定数据中包括光学变化量的增加率变为最大的时刻在内的时间区间进行选择，将上述时间

区间作为周期函数的一个周期，通过对处于上述时间区间内的测定数据进行离散傅立叶变换处理，并由此获得振幅光谱分布的测定数据处理机构，以及

与上述测定数据处理机构连接，根据上述振幅光谱分布的形状，对在
5 上述反应中是否产生区带现象进行判定的判定机构。

12、根据权利要求 11 所述的免疫学反应测定装置，其中上述时间区间是从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应实质上饱和后光学的变化量实质上达到一定的时刻为止的区间。

13、根据权利要求 12 所述的免疫学反应测定装置，其中上述判定机
10 构将在上述反应中不产生区带现象时的振幅光谱分布形状作为基准形状预先存储，通过比较上述基准形状与利用上述测定数据处理机构得到的上述振幅光谱分布的形状进行判定。

14、根据权利要求 12 所述的免疫学反应测定装置，其中上述判定机构以相当于上述时间区间的倒数的频率处的振幅值的相对于上述振幅光谱分布的直流成分的比率作为基础进行判定。
15

15、根据权利要求 14 所述的免疫学反应测定装置，其中当上述比率超过由不产生区带现象时的反应和产生区带现象时的反应两者的分布结果求出的基准值时，上述判定机构判定上述测定机构的上述反应中不产生区带现象，当低于上述基准值时判定为上述测定机构的上述反应中产生区
20 带现象。

16、根据权利要求 11 所述的免疫学反应测定装置，其中上述时间区间是从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合前开始直至上述反应实质上饱和后光学的变化量实质上达到一定的时刻为止的区间，

17、根据权利要求 16 所述的免疫学反应测定装置，其中当相当于从
25 对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应实质上饱和时刻的时间区间的倒数的频率处的振幅值，与相当于对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应实质上饱和后光学的变化量实质上达到一定的时刻为止的时间区间的倒数的频率处的振幅值的差，为正的数时，上述判定机构判定在上述反应中不产生区带现象，当上述差值为负的数时，判定在上述反应中产生区带现象。
30

18、根据权利要求 11 所述的免疫学反应测定装置，其中还备有与上述测定数据处理机构连接，根据上述振幅光谱分布的形状，对上述被测定物质的浓度进行定量的定量机构。

5 19、根据权利要求 18 所述的免疫学反应测定装置，其中上述定量机构以上述振幅光谱分布的直流成分的振幅值作为基础，对上述被测定物质的浓度进行定量。

免疫反应测定方法以及免疫反应测定装置

5

技术领域

本发明涉及可以测定样品中被测定物质的含量的免疫反应测定方法以及其中使用免疫反应测定装置。

10 背景技术

在临床检查领域中，为了研究各种各样疾病的诊断以及病状的经过，广泛进行存在于人体液的各种疾病中特征蛋白质含量的测定。在这些蛋白质含量的测定中，主要广泛利用特异识别靶蛋白抗原的抗体的反应（抗原抗体反应）的免疫反应测定方法。现在，在免疫反应测定方法中开发了利用各种各样原理的测定方法。

其中，有人们都了解的为了测定样品中被测定物质的含量，对利用抗原抗体反应生成的抗原抗体复合物的凝集物（以下称之为凝集复合物）进行检测的免疫散射测浊法（以下略称为散射测浊法）、免疫比浊法（以下略称为比浊法）以及胶乳凝集法等测定方法。在抗原抗体反应中，由于凝集复合物的生成使得反应体系出现浑浊。由于凝集复合物生成在反应体系中出现的浑浊程度与抗原的量和抗体的量有关。散射测浊法和比浊法是根据这一现象对上述反应体系产生的浑浊程度进行光学测定，由其测定值算出抗原的量或抗体的量的方法。具体来说，散射测浊法是根据反应体系中散射光量的变化，而比浊法是根据反应体系中因散射而减少的透过光量的变化测定凝集复合物的方法。这些测定方法由于是在溶液中抗原和抗体都以同样分散的状态下进行的方法，所以统称为「均一体系的免疫反应测定方法」。一般来说，人们知道如果在均一体系的免疫反应测定方法中会发生称之为区带现象的现象。所谓区带现象是当无论是抗原还是抗体存在的量与抗原和抗体形成最大量的凝集复合物的当量区相比还过剩时，凝集复合物难于形成的现象。特别是抗原过剩时往往会出现该问题。就该问题，

以下参照图 20 (a)、(b) 进行说明。图 20 (a)、(b) 给出了均一体系免疫反应测定方法中的反应体系抗原和抗体反应样子的模式图。

就象图 20 (a) 所示, 如果利用通常均一体系的免疫反应测定方法, 会生成抗原与抗体交互结合形成的巨大的分子链的凝集复合物。所谓区带现象就象 20 (b) 所示那样, 与抗原和抗体形成最大量的凝集复合物的当量区相比, 抗原相对于抗体过量存在时, 凝集复合物难于形成的现象。多价抗体和 2 价以上的抗原之间的结合反应最著名的是 Heidelberg 等人的格子学说, 下述非专利文献 1 中有详细记载。

在不发生区带现象的抗体和抗原的浓度范围内, 如图 20 (a) 所示那样, 会生成抗原与抗体交互结合形成的巨大分子链的凝集复合物。此时如果抗体浓度一定, 该凝集复合物的量和大小的增加依赖于抗原浓度。因此, 通过将该凝集复合物的量或大小作为光学的变化量进行测定, 可以定量测定抗原浓度。另外, 凝集复合物由于抗体和抗原的浓度关系, 溶液中的浑浊或凝集物即使用肉眼也可以充分确认, 因此通过目视等也可以进行定性判定。

然而, 在实际的均一体系的免疫反应测定方法中, 往往使用抗体测定抗原浓度。而当抗原浓度比低的情形高时, 测定值往往具有重要的意义。可是当抗原浓度与抗体相比过剩时, 就象图 20 (b) 所示那样, 抗体的结合部位被抗原饱和的抗体量增加, 凝集复合物产生变得困难。因此, 很难区别抗原低浓度情况和抗原过剩情况之间的抗原抗体反应的结果。因此担心不能依赖于抗原浓度进行正确的定量以及判定, 或者说, 要依赖于抗原浓度进行正确的定量以及判定会产生所谓的测定浓度被限制的问题。这样一来, 由于抗原存在过量产生的区带现象往往是均一体系免疫反应测定方法不适用的一個原因。

为了解决上述问题, 准备含量为 $1/n$ ($n > 1$ 的任意数) 的多个不同浓度的与作为被测定物质的抗原 (或抗体) 特异结合物质抗体 (或抗原), 使各个浓度的结合物质和被测定物质分别反应, 测定生成凝集复合物的方法已公开 (参照专利文献 1)。利用该方法可以判定在抗原过量存在的浓度范围 (以下称之为区带区) 是否进行了抗原抗体反应。

另外, 由利用两种不同波长光测定得到的测定结果通过计算求出吸光

度等判定指标,根据该判定指标判定在区带区中是否进行了抗原抗体反应的方法已公开(专利文献2、3和4)。

另外,利用测定的光学信号随时间变化的微分得到反应速度,以反应速度达到峰速度值和由反应开始到峰速度经过的时间为基础,判定在该区带区内是否进行了抗原抗体反应的方法已公开(参照专利文献5)。

[专利文献1]特开昭60-79269号公报。

[专利文献2]特开昭63-19560号公报。

[专利文献3]特开昭63-149564号公报。

[专利文献4]特开平4-204378号公报。

[专利文献5]美国专利第4157871号公报。

[非专利文献1]Fundamental Immunology,William E.Parl编(1989)。

然而,如果利用上述专利文献1公开的方法,对于一个样品需要准备多个反应容器,测定多次,测定手续烦杂。

另外如果利用上述专利文献2、3和4公开的方法,需要准备多个光源、或由白色光分离各个波长光的机构、以及多次测定机构、或在检测器一侧设置波长分离机构,测定装置构成复杂,另外测定手续烦杂。

而如果利用上述专利5文献公开的方法,在峰速度低的时候,容易受到气泡、灰尘等杂物的影响、以及电磁波等对检测器的影响造成的噪音发生的影响,给出错误判定结果的担心增高。

20

发明内容

本发明鉴于上述事情,目的在于提供简便、测定精度高的免疫反应测定方法以及该方法中使用的免疫学测定装置。

本发명의免疫反应测定方法,是测定样品溶液中含有的被测定物质浓度的免疫反应测定方法,包括:对上述样品溶液和与上述被测定物质特异结合的特异结合物质进行混合,在所定的采样周期,在上述被测定物质和与上述特异结合物质反应中光学变化量随时间的变化以离散的测定数据获得的步骤(a);选择在上述测定数据中包括光学变化量增加率变为最大的时刻在内的时间区间的步骤(b);将上述时间区间作为周期函数的一个周期,通过对处于上述时间区间内的上述测定数据进行离散傅立叶变换处

30

理，获得振幅光谱分布的步骤（c）；根据上述振幅光谱分布的形状，判定在上述步骤（a）的上述反应中是否产生区带现象的步骤（d），上述被测定物质和上述特异结合物质的组合是抗原和抗体的组合。

根据本发明的免疫学测定方法，可以获得被测定物质的含量（浓度）。特别是根据本发明，由于一方面可以判定在反应体系中是否产生区带现象的同时，可以测定反应体系的光学变化量，所以根据光学变化量得到的被测定物质的含量（浓度）的数值的可信度非常高。另外由于一方面可以判定在反应体系中是否产生区带现象的同时，可以测定反应体系的光学变化量，因此测定手续非常简便。另外，在本发明中由于利用傅立叶变换，相对于测定数据的变化，可以认为噪音为高频率信号，可以将测定数据变化引起的信号和由噪音引起的信号分离。因此很难受到噪音的影响。

上述光学的变化量可以是散射光强度的变化量或透射光量的变化量。

上述时间区间也可以根据不产生区带现象时的反应中测定的光学的变化量的测定数据预先决定。

上述时间区间也可以是从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应实质上饱和后光学的变化量实质上达到一定的时刻为止。

在上述步骤（d）中，最好是根据上述振幅光谱分布的形状和在不产生区带现象时的反应中测定的振幅光谱分布的形状判定在上述步骤（a）的上述反应中是否产生区带现象。

在上述步骤（e）中，也可以根据上述振幅光谱分布的形状和上述样品溶液中含有的被测定物质的浓度为不产生区带现象的浓度时的振幅光谱分布的形状判定在上述步骤（b）中反应体系是否产生区带现象。

在上述步骤（d）中，最好是根据相当于上述时间区间的倒数的频率处的振幅值相对于上述振幅光谱的直流成分（频率为0时的振幅值）的比率为基础，判定在上述步骤（a）的反应体系中是否产生区带现象。

在上述步骤（d）中，上述比率超过由不产生区带现象时的反应和产生区带现象时的反应两者的分布结果求出的基准值时，最好是判定上述步骤（a）的上述反应中的不产生区带现象，当低于上述基准值时判定上述步骤（a）的上述反应中产生区带现象。

也可以在上述步骤(a)之前,进一步包括构建含有上述样品溶液和上述特异结合物质任一方的反应体系,在上述所定的采样周期,将上述反应体系中光学变化量随时间的变化以离散的测定数据获得的步骤(e),在上述步骤(a),通过向上述反应体系添加上述样品溶液和上述特异结合物质中不含在上述反应体系中的一方,对上述样品溶液和上述特异结合物质进行混合,上述时间区间也可以是从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应体系中的反应实质上饱和后光学的变化量实质上达到一定的时刻为止。

在上述步骤(d)中,当相当于从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应体系中的反应实质上饱和时刻为止的时间区间的倒数的频率处的振幅值,与相当于从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应体系中的反应实质上饱和后光学的变化量实质上达到一定的时刻为止的时间区间的倒数的频率处的振幅值的差,为正的数时,最好判定在上述步骤(a)的上述反应体系中不产生区带现象,当上述差值为负的数时,最好判定在上述步骤(a)的上述反应体系中产生区带现象。

也可以以步骤(c)中的上述振幅光谱分布的直流成分的振幅值为基础,对上述测定物质的浓度进行定量。

本发明的免疫学测定装置,备有对含有被测定物质的样品溶液和与上述被测定物质特异结合的特异结合物质进行混合时反应中的光学变化量进行测定的测定机构;和与上述测定机构相连,对通过上述测定机构得到的测定数据中包括光学变化量的增加率变为最大的时刻在内的时间区间进行选择,将上述时间区间作为周期函数的一个周期,通过对处于上述时间区间内的上述测定数据进行离散傅立叶变换处理,获得振幅光谱分布的测定数据处理机构;以及与上述测定数据处理机构连接,根据上述振幅光谱分布的形状,对在的上述反应中是否产生区带现象进行判定的判定机构。

利用本发明的免疫学测定装置,可以在判定在反应体系中是否产生区带现象的同时,测定反应体系的光学变化量。所以根据光学变化量得到的被测定物质的含量(浓度)的数值的可信度非常高。另外由于在判定在反

应体系中是否产生区带现象的同时，可以测定反应体系的光学变化量，因此测定手续非常简单。另外，在本发明中由于利用傅立叶变换，相对于测定数据的变化，可以认为噪音为高频率信号，可以将测定数据变化引起的信号和由噪音引起的信号分离。因此很难受到噪音的影响。就是说，通过
5 本发明可以进行简便、而且可信度高的免疫反应测定。

上述时间区间也可以是从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应实质上饱和后光学的变化量实质上达到一定的时刻为止。

上述判定机构可以是将在上述反应中不产生区带现象时的振幅光谱分布形状作为基准形状预先存储，通过比较上述基准形状与利用上述测定
10 数据处理机构得到的上述振幅光谱分布的形状进行判定的构成。

上述判定机构可以是以相当于上述时间区间的倒数的频率处的振幅值的相对于上述振幅光谱分布的直流成分的比率作为基础进行判定的构成。

15 上述判定机构可以是当上述比率超过由不产生区带现象时的反应和产生区带现象时的反应两者的分布结果求出的基准值时，最好是判定上述测定机构的上述反应中不产生区带现象，当低于上述基准值时判定上述测定机构中的上述反应中产生区带现象的构成。

上述时间区间也可以是从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行
20 混合前开始直至上述反应实质上饱和后光学的变化量实质上达到一定的时刻为止，此时上述判定机构的构成最好是当相当于从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应实质饱和时刻的为止的时间区间的倒数的频率处的振幅值，与相当于对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻开始直至上述反应实质上饱和后光学的变化量
25 实质上达到一定的时刻为止的时间区间的倒数的频率处的振幅值的差，为正的数时，最好判定在上述反应中不产生区带现象，当上述差值为负的数时，最好判定在上述反应中产生区带现象。

另外，上述免疫反应测定装置，还可以备有与上述测定数据处理机构连接，根据上述振幅光谱分布的形状，对上述被测定物质的浓度进行定量的
30 定量机构。

对上述被测定物质的浓度进行定量的定量机构，可以以上述振幅光谱分布的直流成分的振幅值作为基础对上述被测定物质的浓度进行定量。

5 根据本发明可以提供简便、测定精度高的免疫学测定方法以及方法中使用的免疫学测定装置。

附图说明

图 1 是表示本发明实施方式中的免疫反应测定方法的各个步骤的流程图。

10 图 2 (a) 是表示本发明的实施方式中的离散的光学的变化量的测定数据的图，图 2 (b) 是表示本发明的实施方式中的振幅光谱分布的图。

图 3 是表示本发明的实施方式的免疫学测定装置构成的梗概图。

15 图 4 是表示对于在本发明的实施例中利用免疫散射测浊法进行人白蛋白溶液的测定，免疫反应充分饱和 150 秒至 200 秒之间测定值的平均值作图的结果图。

图 5 是表示在本发明实施例中的入白蛋白溶液的测定中得到的散射光强度随时间变化的图。

图 6 是表示对于在本发明实施例中的 5mg/dl 的人白蛋白溶液的测定中得到的散射光强度随时间变化，实施傅立叶变换得到的振幅光谱分布。

20 图 7 是表示对于在本发明实施例中的 10mg/dl 的人白蛋白溶液的测定中得到的散射光强度随时间变化，实施傅立叶变换得到的振幅光谱分布。

图 8 是表示对于在本发明实施例中的 20mg/dl 的人白蛋白溶液的测定中得到的散射光强度随时间变化，实施傅立叶变换得到的振幅光谱分布。

25 图 9 是表示对于在本发明实施例中的 30mg/dl 的人白蛋白溶液的测定中得到的散射光强度随时间变化，实施傅立叶变换得到的振幅光谱分布。

图 10 是表示对于在本发明实施例中的 50mg/dl 的人白蛋白溶液的测定中得到的散射光强度随时间变化，实施傅立叶变换得到的振幅光谱分布。

30 图 11 是表示对于在本发明实施例中的 100mg/dl 的人白蛋白溶液的测定中得到的散射光强度随时间变化，实施傅立叶变换得到的振幅光谱分布。

图 12 是表示对于在本发明实施例中的 200mg/dl 的人白蛋白溶液的测定中得到的散射光强度随时间变化，实施傅立叶变换得到的振幅光谱分布。

5 图 13 是表示对于在本发明实施例中的 300mg/dl 的人白蛋白溶液的测定中得到的散射光强度随时间变化，实施傅立叶变换得到的振幅光谱分布。

图 14 是表示对于在本发明实施例中的 5mg/dl 和 300mg/dl 的人白蛋白溶液的测定中得到的散射光强度随时间变化，实施傅立叶变换得到的振幅光谱分布。

10 图 15 是表示在 5mg/dl 和 300mg/dl 的人白蛋白溶液的测定中的散射光强度随时间变化的图。

图 16 是表示对图 15 所示的时间区间的测定数据付加散乱噪音后的结果。

15 图 17 表示对图 15 所示的测定数据，错开 0.5 秒数据后获得的差分结果。

图 18 表示对图 16 所示的测定数据，错开 0.5 秒数据后获得的差分结果。

图 19 表示对图 16 所示的付加散乱噪音时的测定数据进行离散傅立叶变换，求出的振幅光谱分布的结果。

20 图 20 (a) 和 (b) 是表示在均一体系的免疫反应测定方法的反应体系中的抗原和抗体反应的样子模式图。

图中：10 免疫学测定装置，11 测定机构，12 测定数据处理机构，13 判定/定量机构，14 测定杯

25 具体实施方式

在对样品中被测定物质的含量进行测定的免疫反应测定方法中，使被测定物质和与被测定物质特异结合的特异结合物质反应，对该反应过程中的光学特性的变化量进行测定，由测定的结果算出被测定物质的量。

(第一个免疫学测定方法)

30 以下参照图 1 和图 2，对本发明的第一个免疫学测定方法进行说明。

图 1 是表示本实施方式的第一个免疫学测定方法的各个步骤的流程图，图 2 (a) 是表示离散的光学变化量的测定数据的曲线图，图 2 (b) 是表示振幅光谱分布的曲线图。图 2 (b) 中进行离散傅立叶变换的时间区间 (1 周期) 的倒数作为基本频率用 f 表示，被测定物质和特异结合物质的组合是抗原和抗体的组合。

在本发明的第一个免疫反应测定方法中，首先，在图 1 所示的步骤 St1 (相当于权利要求范围的步骤 (e))，构建只含有被测定物质或特异结合物质任一方的反应体系，开始进行反应体系的光学变化量的测定。这里，作为反应体系，所谓可以是含有被测定物质或特异结合物质任一方的反应体系是因为可以向被测定物质添加特异结合物质，也可以向特异结合物质添加被测定物质。

接下来，在步骤 St2 (相当于权利要求范围的步骤 (a))，被测定物质和特异结合物质开始混合，反应体系的光学的变化量随时间的变化以离散的测定数据获得。而所谓的该「光学的变化量」具体指的是散射光强度或透射光量的变化量，光学的变化量的测定是以一定的采样周期进行的。这里，当反应体系含有被测定物质时，向反应体系添加特异结合物质，当反应体系含有特异结合物质时向反应体系添加被测定物质。

通过以上的步骤 St1 和步骤 St2 可以获得例如图 2 (a) 所示的光学变化量的测定数据。而图 2 (a) 的光学变化量的测定数据是用线将在各个测定时间的离散的测定结果连接起来的数据。

在本实施方式的免疫学的测定方法中，被测定物质是抗原时，特异结合物质是抗体，被测定物质是抗体时，特异结合物质是抗原。在步骤 St1 中，当反应体系只含有被测定物质和特异结合物质中任一方时，在反应体系中不会发生通过被测定物质和特异结合物质的抗原抗体反应生成凝集复合物。与此相反，在步骤 St2 中，当将被测定物质和特异结合物质混合时，在反应体系中开始生成由被测定物质和特异结合物质的抗原抗体反应形成的凝集复合物。

当在步骤 St2 反应体系中生成凝集复合物时，反应体系出现浑浊、散射光强度以及透射光量等光学的变化量发生变化。因此通过测定该光学变化量，可以估计反应体系的浑浊程度。而作为该评估的基准最好是测定反

应体系中只含有被测定物质和特异结合物质中任一方时的光学变化量、即散射光强度或透射光量的变化量。

接下来，在图 1 所示的步骤 St3（相当于权利要求范围的步骤（b）），在获得的测定数据中选择含有光学变化量的增加率（即反应速度）为最大时的时间区间。即在图 2（a）中选择时间区间 d_2+d_3 。

接下来，在图 1 所示的步骤 St4（相当于权利要求范围的步骤（c）），将选择的时间区间 d_2+d_3 作为周期函数的 1 个周期，通过对被选择的时间区间 d_2+d_3 内的离散的光学变化量的测定数据进行离散傅立叶变换处理，可以得到如图 2（b）所示的振幅光谱分布。

接下来，在图 1 所示的步骤 St5（相当于权利要求范围的步骤（d）），根据振幅光谱分布的形状，判定在上述步骤 St2 反应体系中是否产生了区带现象。具体来说，此时作为「基准形状」预先获得在反应体系中不产生区带现象时的振幅光谱分布的形状，通过将步骤 St4 中得到的振幅光谱分布与基准形状进行比较来判定。该判定方法在下面叙述的实施例 4 中进行详细说明。另外，在本步骤中，也可以通过目视判定振幅光谱分布的形状，也可以用计算机进行判定。就象下面实施例 2 说明的那样，也可以以步骤 St4 中得到的振幅光谱分布的直流成分的振幅值为基础对上述被测定物质的浓度进行定量。

通过实施以上步骤，可以得到被测定物质的含量（浓度）。特别是根据本实施方式的免疫学测定方法，由于可以在判定在反应体系中是否产生区带现象的同时，可以测定反应体系的光学变化量，所以根据光学变化量得到的被测定物质的含量（浓度）的数值的可信度非常高。

另外，根据本实施方式的免疫学测定方法，由于可以在判定在反应体系中是否产生区带现象的同时，可以测定反应体系的光学变化量，因此对于一个样品溶液不需要进行多次测定，不需要准备多个反应容器，所以测定手续非常简单。

另外，在本实施方式的免疫学测定方法中，由于利用傅立叶变换，相对于测定数据的变化，可认为噪音为高频率信号，可以将测定数据变化引起的信号和由噪音引起的信号分离。因此很难受到噪音的影响。因此按照本实施方式可以提供简便、可信度高的免疫反应测定方法。

而在本实施方式的免疫学测定方法中，光学的变化量最好是散射光强度的变化量或透射光量的变化量。由于测定依赖于抗原和抗体的复合物生成的透射光量的变化的免疫比浊法以及测定散射光量变化的免疫散射测浊法容易受到区带现象的影响，因此使用本实施方式测定方法时的效果非
5 常。

另外，在步骤 St3 中选择的时间区间 d_2 、 d_3 最好是根据不产生区带现象时的光学变化量的测定数据决定的时间区间。就是说，作为 d_2 、 d_3 最好是在不测定作为测定对象的反应体系的反应时间，而使用预先测定不产生区带现象时的反应时间。不产生区带现象时的测定数据与产生区带现象时的测定数据相比，反应体系的光学的变化量的增加率（反应速度）的峰值
10 时刻、抗原抗体反应的饱和时刻等信息是明确的，抗原抗体反应饱和后的稳定性高，在对时间区间进行选择上的基准位置的选定容易。

特别是，根据不产生区带现象时的光学变化量的测定数据选择的测定数据的时间区间 $d_2 + d_3$ ，最好是从对上述特异结合物质和上述样品溶液进行混合时刻（即反应开始）直至反应实质上饱和后反应体系的光学变化量实质上达到一定的时刻。这样一来，可以得到反映不产生区带现象时的测定数据与产生区带现象时的测定数据的差别的离散傅立叶变换光谱，可以更明确地判定步骤 St2 的反应体系中是否产生区带现象。而在本说明书和
15 权利要求范围内所谓的「光学变化量实质上一定」具体来说不仅指的是图 2(a) 所示的时间区间 d_3 的光学变化量，测定的光学的变化量一定的情形，也包括光学的变化量变化的情形，该变化程度与在时间区间 d_2 的光学变化量的变化可明显区别。另外在本说明书和权利要求的范围内，所谓「反应实质上饱和的时刻」具体来说指的是图 2(a) 所示的时间区间 d_2 和时间
20 区间 d_3 交界的时刻，指的是图 2(a) 所示的曲线中的光学的变化量的变化趋势为最大的地方。

另外，在步骤 St5 中，在步骤 St4 得到的离散傅立叶变换振幅光谱分布中，最好是以相对于频率的振幅值的直流成分的大小的变化为基础判定抗原抗体反应是否是区带区。上述振幅光谱分布中的振幅值，由于明显反映出免疫反应的反应曲线上升的不同，所以步骤 St2 的反应体系中产生区
30 带现象情形和不产生区带现象的情形的判定变得容易。

另外最好是以步骤 St4 得到的振幅光谱分布的直流成分的振幅值作为基础对上述被测定物质的浓度进行定量。这样一来，可以降低噪音对测定数据的影响，另外也可以有效地活用离散傅立叶变换后的数据。

(第 2 个免疫学测定方法)

5 以下象上述第 1 个免疫学测定方法那样，作为时间区间对于不是从反应开始时直至反应饱和后光学变化量实质上达到一定为止的时间区间（图 2 (a) 所示的时间区间 d_2+d_3 ），而是从对特异结合物质和样品溶液进行混合前（反应开始前）直至反应实质上饱和后光学变化量实质上达到一定为止的时刻进行选择的情形进行说明。

10 此时，在图 1 所示的步骤 St1、St2 中进行与第 1 个免疫学测定方法同样的测定，在步骤 St3 中选择时间区间 $d_1+d_2+d_3$ ，在步骤 St4 中将时间区间 $d_1+d_2+d_3$ 作为一个周期通过进行离散傅立叶变换处理获得振幅光谱分布。然后在步骤 St5 中，在步骤 St4 得到的离散傅立叶变换振幅光谱分布中，相当于反应开始时刻直至反应达到饱和的时间区间（图 2(a)表示的时间区间 d_2 ）的倒数的频率（ $1/d_2$ ）的振幅值减去相当于反应开始时刻直至反应达到饱和的时间区间（ d_2 ）和反应实质上饱和后光学变化量实质上达到一定的时刻为止的时间区间（ d_3 ）的和（ d_2+d_3 ）的倒数的频率（ $1/(d_2+d_3)$ ）的振幅值的值作为基础，可以判定进行的抗原抗体反应是否是区带区。此时，当[（ $1/d_2$ 的振幅值）-（ $1/(d_2+d_3)$ 的振幅值）]的差为正数时，判定上述反应体系中不产生区带现象，当上述差值为负数时，判定上述反应体系中产生区带现象。这样一来，反应体系中产生区带现象情形和不产生区带现象的情形的判定就变得容易了。

25 此时，在选择从反应开始前到反应达到饱和的时间区间时，反应开始前的时间区间 d_1 、反应速度增加中的时间区间 d_2 以及反应饱和后的时间区间 d_3 的各个时间区间，如果能够实质上按照 3 等分那样选择时间区间，上述差值就变得明确了。

(免疫学测定装置)

30 以下参照图 3 对上述免疫学测定方法中使用的免疫学测定装置进行说明。就象图 3 所示那样，本实施方式的免疫学测定装置 10 由测定机构 11、与测定机构 11 电连接的测定数据处理机构 12、与测定数据处理机构 12

电连接的判定机构兼定量机构 13 构成。而本说明书中所谓的「连接」没有特别指定的话，指的是「电连接」。

测定机构 11 是收容测定杯 14、对测定杯 14 内构建的反应体系的光学变化量进行测定的机构，例如可以举出测定作为光学变化量的散射光强度或透射光量的变化量的装置等。而在本实施方式中，将测定机构 11 作为测定时导入测定杯 14 的构成，但是对此没有限定。例如也可以是在测定机构 11 的内部设置测定杯的构成。

测定数据处理机构 12，选择通过测定机构 11 得到的测定数据中包括光学变化量的增加率（即反应速度）变为最大时刻在内的时间区间（例如图 2 (a) 中的时间区间 d_2+d_3 或时间区间 $d_1+d_2+d_3$ ），将选择的时间区间 D 作为周期函数的一个周期，通过对处于上述时间区间 d_2+d_3 或时间区间 $d_1+d_2+d_3$ 内的离散的光学变化量的测定数据进行离散傅立叶变换处理。通过这样处理可以得到如图 2 (b) 所示的振幅光谱分布。

判定/定量机构 13 根据通过测定数据处理机构 12 得到的振幅光谱分布的形状，判定测定杯 14 内反应体系中是否产生区带现象，另外当判定不产生区带现象时，对被测定物质的浓度进行定量。另外判定/定量机构 13 可以通过将反应体系中不产生区带现象时的振幅光谱分布的形状作为「基准形状」以电子数据的方式预先存储，通过将测定数据处理机构 12 得到的振幅光谱分布与基准形状进行比较来判定。另外判定/定量机构 13 为了对被测定物质的浓度进行定量，将特定频率成分的振幅值与被测定物质的浓度对应给出的数式（校正曲线）以电子数据的方式预先存储，可以通过将通过测定数据处理机构 12 得到的特定的频率成分的振幅值代入到数式（校正曲线）中求被测定物质的浓度。

测定杯 14 由透明的材料构成，内部可以贮存液体。进行测定时，将反应体系注入后置于测定机构 11 中，以一定的采样周期一边继续进行光学的变化量的测定，一边对特异结合物质和样品溶液进行混合。

以下，就本实施方式中的免疫学测定装置 10 的动作进行说明。

首先，将被测定物质和特异结合物质中的任一方导入到测定杯 14 中后构建反应体系，将测定杯 14 置于测定机构 11 中。

然后在测定机构 11 中开始反应体系的光学的变化量的测定。此时，

反应体系的光学的变化量的测定是以一定的采样周期进行的。

然后，以一定的采样周期一边继续进行反应体系的光学的变化量的测定，一边对与测定物质特异结合的的特异结合物质和样品溶液进行混合。然后，作为离散光学变化量的测定数据（例如图 2（a）所示的光学变化量的测定数据）获得反应体系的光学变化量随时间的变化。

而测定机构 11 最好是以只含有被测定物质和特异结合物质任一方的反应体系作为基准测定反应体系的光学变化量（例如，散射光强度或透射光量的变化量）的构成。

测定数据处理机构 12 选择通过测定机构 11 得到的测定数据中的包括光学变化量的增加率（即反应速度）变为最大时刻在内的时间区间。即选择图 2（a）中的时间区间 d_2+d_3 或时间区间 $d_1+d_2+d_3$ 。

测定数据处理机构 12 通过将选择的时间区间 d_2+d_3 或时间区间 $d_1+d_2+d_3$ 作为周期函数的一个周期，通过对处于上述 d_2+d_3 或时间区间 $d_1+d_2+d_3$ 内的离散的光学变化量的测定数据进行离散傅立叶变换处理，可以得到例如图 2（b）所示的振幅光谱分布。

判定/定量机构 13 根据通过测定数据处理机构 12 得到的振幅光谱分布的形状，判定测定杯 14 内的反应体系中是否产生区带现象，然后对被测定物质的浓度进行定量。

利用本实施方式的免疫学测定装置 10 可以判定在反应体系中是否产生区带现象的同时，测定反应体系的光学变化量。由此根据光学变化量得到的被测定物质的含量（浓度）的数值的可信度非常高。因此利用本实施方式可以进行简便、可信度高的免疫反应测定。

而作为测定机构 11 的具体例子，可以举出吸光光度计。而作为测定数据处理机构 12 最好是使用 A/D 变换元件，通过 A/D 变换由测定机构 11 获得测定数据的构成。

本实施方式的免疫反应测定装置 10 可以做成测定数据处理机构 12 和判定/定量机构 13 分别设置的构成，但是对此没有限定。例如也可以由软件和 1 台计算机构成测定数据处理机构 12 和判定/定量机构 13。另外，也可以使用 DSP（Digital Signal Processor）等电路元件构成。

作为测定数据处理机构 12 使用计算机时，可以做成测定数据处理机

构 12 中的时间区间的选择基准和范围通过软件由操作者任意指定的构成。

另外，测定数据处理机构 12 是计算机，使用特定样品溶液进行测定时，最好是使通过测定数据处理机构 12 选择的时间区间可在 ROM、RAM 等存储器上存储的构成。此时存储的时间区间最好是根据不产生区带现象时的光学变化量的测定数据存储的。

另外，作为判定/定量机构 13 使用计算机时，区带现象判定中使用的基准形状可以是根据软件由操作者任意设定的构成。

另外，判定/定量机构 13 是计算机，使用特定样品溶液进行测定时，最好是使基准形状可在 ROM、RAM 等存储器上存储的构成。另外，基准形状最好是做成具有各个频率的振幅值的振幅光谱分布。

就象以上说明的那样，利用本实施方式的免疫学测定方法和免疫学测定装置，对于一个样品溶液不需要进行多次测定，不用准备多个反应容器，另外，不需要多波长测定，测定手续和装置构成非常简单。

特别是利用本实施方式的免疫学测定方法和免疫学的测定装置，通过利用一个波长的光进行的测定，由于可以判定是否产生区带现象，所以装置构成变得简单，另外测定工序也不烦杂。另外由于利用傅立叶变换，相对于测定数据的变化，可以认为噪音为高频率信号，可以将测定数据变化引起的信号和由噪音引起的信号分离。因此很难受到噪音的影响。

20 实施例

以下用实施例对本发明进行说明，但本发明并不限于这些实施例。

(实施例 1)

以下叙述上述实施方式中说明的免疫学的测定装置 10 的具体构成例子。而在本实施例中，用上述第 1、第 2 个免疫学测定方法中的后者的方法（选择时间区间 $d_1 + d_2 + d_3$ 的方法）进行说明。

本实施例中测定机构 11 构成如下。作为光源使用在 270Hz 调制的波长 680nm 的发射功率 15mW 半导体激光指示器（キユ一技研生产、型号 MLXS-D-12-680-35），作为检测器使用可见红外精密测光用硅光电二极管（滨松フォトニクス公司生产、型号 S2387-66R）。作为测定杯使用四周为厚 0.1cm 的光学玻璃板的正四角柱形，容量约为 200 μ l 的测定杯。

光源、检测器、测定杯的各个配置，在离开光源 0.5cm 的地方配置测定杯，使其一面与来自光源发射光的光轴垂直，检测器配置在与光源成 90° 度的方向，离开测定杯 5.5cm 的地方，为了使杂散光不入射到检测器，在检测器和杯之间设置遮光筒。依赖于通过检测器检测的光量的电流信号通过电
5 流电压变换电路 (10^6V/A) 和运算放大器经放大电路放大到 100 倍的电压信号后，通过同步放大器 (エヌエフ电路设计ブログ生产、型号 5610B) 进行相位敏感检波，通过 GPIB 调控以一定间隔整合到计算机中。本实施例的采样周期为 0.5 秒。

测定数据处理机构 12 的构成如下。在本实施例中，将选择的时间区
10 间的设定做成从反应开始前开始直至反应饱和经过一定时间后的范围，按照反应开始前、反应增加中、以及饱和后的数据长度实质上等分那样进行设定。对于下面叙述的实施例 2 所示抗原抗体反应，获得从反应开始 10 秒前直至反应开始后约 22 秒为止的时间区间的 64 点的采样数据。将这些数据当作周期 32 秒、频率 0.03125Hz 的周期信号，在 Microsoft Excel
15 (Microsoft 公司生产) 上进行离散的傅立叶变换处理，求出振幅光谱分布。

判定/定量机构 13 中的判定机构，采用对相当于对被测定物质和特异结合物质进行混合、反应开始时刻直至反应达到饱和的时间区间 (图 2(a) 中的 d_2) 的倒数 ($1/d_2$) 的频率处的振幅值，与相当于反应开始时刻直至反应达到饱和的时间区间 (图 2(a) 中的 d_2) 和反应实质上饱和后光学的
20 变化量实质上达到一定的时刻为止的时间区间 (图 2(a) 中的 d_3) 的和 ($d_2 + d_3$) 的倒数的频率 ($1/(d_2 + d_3)$) 处的振幅值进行比较的方法。具体来说，做成通过计算求相当于上述的 d_2 约 10 秒的倒数的频率 0.0938Hz 处的振幅值与相当于上述的 $d_2 + d_3$ 约 15 秒的倒数的频率 0.0625Hz 处振幅值的差 { (0.0938Hz 的振幅值) - (0.0625Hz 的振幅值) } 值，该值为正时，
25 判定没有产生区带现象，该值为负时判定为在上述反应体系中产生区带现象的构成。

另外，定量机构采用使用振幅光谱分布的直流成分的振幅值进行定量的方法。具体来说，做成将通过被测定物质的测定得到的直流成分的振幅值代入将直流成分的振幅值和被测定物质的浓度对应给出的数式 (校正曲线) 中求出被测定物质的浓度的构成。
30

(实施例 2)

在本实施例中表示第 1 个实施例所述的判定是有效的。这里，使用预先已知浓度的被测定物质进行抗原抗体反应，在对从哪一个浓度开始出现区带现象进行解析后，对产生区带现象的情形和不产生的情形的振幅光谱进行比较。这里给出了以人白蛋白作为被测定物质的免疫反应测定方法的例子。而在以下所示缓冲液等的配制中，使用经 Milli-Q SP TOC (Millipore 公司生产) 过滤的纯水。而以下没有特别说明的盐、缓冲剂等试剂都使用和光纯药工业生产的产品，聚乙二醇 6000 使用 1 级试剂，其他都使用特级试剂。

兔抗人白蛋白多克隆抗体 (以下简称称为抗体) 溶液从经免疫人白蛋白的兔采集的抗血清中使用蛋白 A 柱层析进行纯化后经透析获得。作为填充在柱中的蛋白 A 固定化凝胶使用 Amersham Pharmacia 生产的凝胶。纯化使用的平衡缓冲液使用 1.5M 甘氨酸、3.0M NaCl、pH8.9，洗脱缓冲液使用柠檬酸水溶液 (0.1M 柠檬酸、pH4.0)。将洗脱下来的抗体级分装入分级分子量 1 万的透析袋中对组成为约 100 倍容量的 0.05M 3- (吗啉代) 丙磺酸 (Dojin 生产, 以下略称为 MOPS)、0.15M NaCl、0.04 重量% NaN₃、pH7.4 的缓冲液透析数次，置换缓冲液成分。然后通过测定 280nm 的吸光度推定抗体浓度，使用与透析用缓冲液相同的缓冲液将抗体浓度调到 3.0mg/ml。

用作抗原的人白蛋白 (和光纯药工业制造) 溶液 (即样品溶液) 用与透析抗体的缓冲液相同的缓冲液溶解配制成浓度分别为 0、5、10、20、30、50、70、100、200、300mg/dl 的白蛋白溶液。

测定中使用的缓冲液为 0.05M MOPS、4 重量% 聚乙二醇 6000、pH7.4 的组成。

就各个缓冲液象下面所述那样进行各个浓度的人白蛋白溶液的测定。反应体系的组成，缓冲液为 160 μ l，人白蛋白溶液为 9 μ l、抗体溶液为 23 μ l。反应体系中的抗体和人白蛋白的最终浓度，抗体约 0.11mg/ml、人白蛋白为测定时使用的人白蛋白溶液的浓度乘 0.046 的结果。

首先向上述那样构成的免疫测定装置的测定杯内按照上述容量加入缓冲液和人白蛋白溶液，搅拌混合，构建反应体系。然后再按照上述容量

向反应体系中加入抗体溶液，搅拌混合，使抗原抗体反应发生。散射光的测定从加抗体溶液的 10 秒钟之前开始，间隔 0.5 秒钟连续 200 秒。测定值可以电压值得到。测定杯的污染对测定的影响可以在各个反应测定前向测定杯中加入纯水进行测定，通过对测定值进行校正除去。测定在室温（约 5 20℃）下进行。

图 4 给出了对从免疫反应充分饱和 150 秒至 200 秒之间测定值的平均值进行作图的结果。由图 4 可知，100mg/dl 以上的人白蛋白溶液的测定受到区带现象的影响。

图 5 是表示在各个人白蛋白溶液的测定中得到的散射光强度随时间变化的图。用于检测区带现象的离散傅立叶变换相对于该测定值进行。 10

图 6~13 是表示对通过 5mg/dl 至 300mg/dl 浓度的人白蛋白溶液的测定得到的测定数据进行离散傅立叶变换后，求振幅光谱分布的结果的图。根据这些结果可以确认在没有产生区带现象的 5~50mg/dl 的人白蛋白溶液的情形中，任一个{ (0.0938Hz 的振幅值) - (0.0625Hz 的振幅值) } 15 的值都为正。而产生区带现象的 100~300mg/dl 的人白蛋白溶液的情形中，任一个{ (0.0938Hz 的振幅值) - (0.0625Hz 的振幅值) } 的值都为负。实际的计算值分别为：5mg/dl 的人白蛋白溶液的结果为 1.65，10mg/dl 的人白蛋白溶液的结果为 3.37，20mg/dl 的人白蛋白溶液的结果为 5.54，30mg/dl 的人白蛋白溶液的结果为 5.80，50mg/dl 的人白蛋白溶液的结果为 8.69，100mg/dl 的人白蛋白溶液的结果为 -0.962，200mg/dl 的人白蛋白溶液的结果为 -1.93，300mg/dl 的人白蛋白溶液的结果为 -2.44。 20

图 14 是表示对实质上经历与图 5 同样的时间变化的 5mg/dl 的人白蛋白溶液情形的振幅光谱分布和 300mg/dl 的人白蛋白溶液情形的振幅光谱的分布进行对比给出的结果。由该图可知，在没有产生区带现象的 5mg/dl 25 的人白蛋白溶液的情形和产生区带现象的 300mg/dl 的人白蛋白溶液的情形中，0.0938Hz 的振幅值和 0.0625Hz 的振幅值颠倒。即，{ (0.0938Hz 的振幅值) - (0.0625Hz 的振幅值) } 的值的正负反映区带现象是否发生。

接下来叙述对浓度定量的结果。对于校正曲线使用上述得到的 5、10、20mg/dl 的人白蛋白溶液的结果做成的曲线。求出的测量线，如果直流成分的振幅值为 y ，人白蛋白溶液浓度为 x ，则 $y=6.12x+29.1$ 。为了证实该 30

校正曲线是有效的，将测定的 15mg/dl 的人白蛋白溶液的直流成分的振幅值的结果代入上述校正曲线，求人白蛋白溶液浓度，确认与实际的浓度是否一致。

5 振幅值合计测定 3 次。在 3 次测定中，直流成分的振幅值分别为 123、124、122，由上述测量线求出的人白蛋白溶液浓度分别为 15.3、15.5、15.2mg/dl，对实际的浓度可进行有效的推定。由此可以确认使用直流成分的振幅值的方法作为用于对被测定物质的浓度进行定量的机构非常有效。

10 由以上结果可以确认本发明的免疫学测定方法和免疫学测定装置在区带现象的检测中是有效的。而本发明由于可进行通过单一波长、单一测定进行区带现象的检测，所以不需要多次测定，也不需要准备多个反应容器，也不需要多波长测定，测定工序和装置构成容易。另外通过本发明能够确认被测定物质的浓度可以测定。

(实施例 3)

15 在本实施例中表示本发明的免疫学的测定方法很难受到噪音的影响的情况。图 15 是表示实施例 2 得到的 5mg/dl 和 300mg/dl 的人白蛋白溶液中散射光强度随时间变化的图。在实施例 2 中，对图 15 所示的时间区间的测定数据进行离散傅立叶变换，得到振幅光谱分布。而图 16 是表示相对于图 15 所示的时间区间的测定数据，付加变动幅度以散射光强度值换算相当于 0.2 的散乱噪音后的结果。在本实施例中，利用图 15 和图 16 所示的数据，对利用以往的微分（差分）法和本发明的免疫学的测定方法进行对比。

20 图 17 表示相对于图 15 所示的没有付加散乱噪音时的测定数据，错开 0.5 秒数据后获得的差分的结果。根据该结果，在没有产生区带现象的 5mg/dl 的人白蛋白溶液的结果和产生区带现象的 300mg/dl 的人白蛋白溶液的结果中，峰的位置、即反应速度的峰的位置发生变化。因此可知根据图 17 可以判定是否产生区带现象。

30 图 18 表示相对于图 16 所示的付加散乱噪音时的测定数据，错开 0.5 秒数据后获得的差分的结果。根据该结果，由于散乱噪音的影响，决定峰的位置、即反应速度的峰的位置不容易。另外没有产生区带现象的 5mg/dl

的人白蛋白溶液的结果和产生区带现象的 300mg/dl 的人白蛋白溶液的结果的差不明确。因此可知根据图 18 判定是否产生区带现象不容易。就象以上说明的那样，以微分（差分）为基础的方法容易受到噪音的影响。

以下，就本发明的区带现象的检测方法，图 14 给出了对于图 15 所示的没有付加散乱噪音情形的测定数据进行离散傅立叶变换，求出振幅光谱分布的结果，图 19 给出了对于图 16 所示的付加了散乱噪音情形的测定数据进行离散傅立叶变换，求出振幅光谱分布的结果。就象两个图表明的那样，{（0.0938Hz 的振幅值）－（0.0625Hz 的振幅值）}的值不受噪音的影响，无论哪一种情形，5mg/dl 的人白蛋白溶液的情形为正，300mg/dl 的人白蛋白溶液的情形为负，都可以判定是否是区带现象。

由以上结果可以确认利用本发明的免疫学的测定方法，不受噪音的影响可以稳定获得区带现象是否发生的判定结果。

（实施例 4）

以下就使用上述实施方式中说明的第 1 个、第 2 个的免疫学的测定方法中的前者的方法（选择时间区间 d_2+d_3 的方法）时的免疫学的测定方法进行说明。

测定机构 11 的构成与实施例 1 同样。测定数据处理机构 12 的构成如下。在本实施例中，将选择的时间区间的设定作为从混合被测定物质和特异结合物质反应开始时直至反应实质上饱和经过一定时间后的范围。对于与上述实施例 2 所示的同样的抗原抗体反应，获得从反应开始直至反应开始后约 32 秒为止的时间区间的 64 点采样数据。将这些数据当作周期 32 秒、频率 0.03125Hz 的周期信号，在 Microsoft Excel 上进行离散的傅立叶变换处理，作为求振幅光谱分布的构成。

对于判定/定量机构 13 的判定机构，采用以上上述求出的振幅光谱分布为基础至少对于相当于被测定物质和特异结合物质混合，反应开始时刻直至反应实质上达到饱和后经过一定期间后的时间区间（图 2（a）中的 d_2+d_3 ）的倒数的频率处的振幅值，求相对于直流成分的振幅值的比率，以其大小为基础进行判定的方法。

具体来说，通过计算求出相当于上述 d_2+d_3 时间区域的约 15 秒的倒

数的频率 0.0625Hz 处振幅值的相对于直流成分的比率。通过这样计算，在被测定物质不产生区带现象的浓度情形以及被测定物质产生区带现象的浓度情形中，显示求出的值不同的分布，差异变得明确。例如，对于实施例 2 所示的抗原抗体反应的条件，相对于 0.0625Hz 处振幅值的直流成分的振幅值的比率在 5mg/dl 的人白蛋白溶液的结果场合为 0.135，10mg/dl 的人白蛋白溶液的结果场合为 0.124，20mg/dl 的人白蛋白溶液的结果场合为 0.125，30mg/dl 的人白蛋白溶液的结果场合为 0.123，50mg/dl 的人白蛋白溶液的结果场合为 0.133，100mg/dl 的人白蛋白溶液的结果场合为 0.113，200mg/dl 的人白蛋白溶液的结果场合为 0.110，300mg/dl 的人白蛋白溶液的结果场合为 0.095，对于被测定物质的浓度不产生区带现象的浓度情形，以超过 0.120 的值分布，对于被测定物质的浓度产生区带现象的浓度的情形，相对于 0.0625Hz 的振幅值的直流成分的振幅值的比率以低于 0.120 的值分布。

因此，对于实施例 2 所示的抗原抗体反应的条件，以基准值为 0.120，求出相对于通过浓度不清楚的样品溶液算出的振幅值的直流成分的振幅值的比率和基准值的差{（相对于 0.0625Hz 的振幅值的直流成分的振幅值的比率）-（基准值）}，通过该值为正时判断不是区带区，该值为负时是区带区的构成可以判定被测定物质的浓度是否是产生区带现象的浓度。

由以上结果可以确认本发明的第 4 个实施例所述的免疫学测定方法和免疫学测定装置在区带现象的检测中是有效的。而本发明由于可通过单一波长、单一测定进行区带现象的检测，所以不需要多次测定，也不需要准备多个反应容器，也不需要多波长测定，测定工序和装置构成容易。

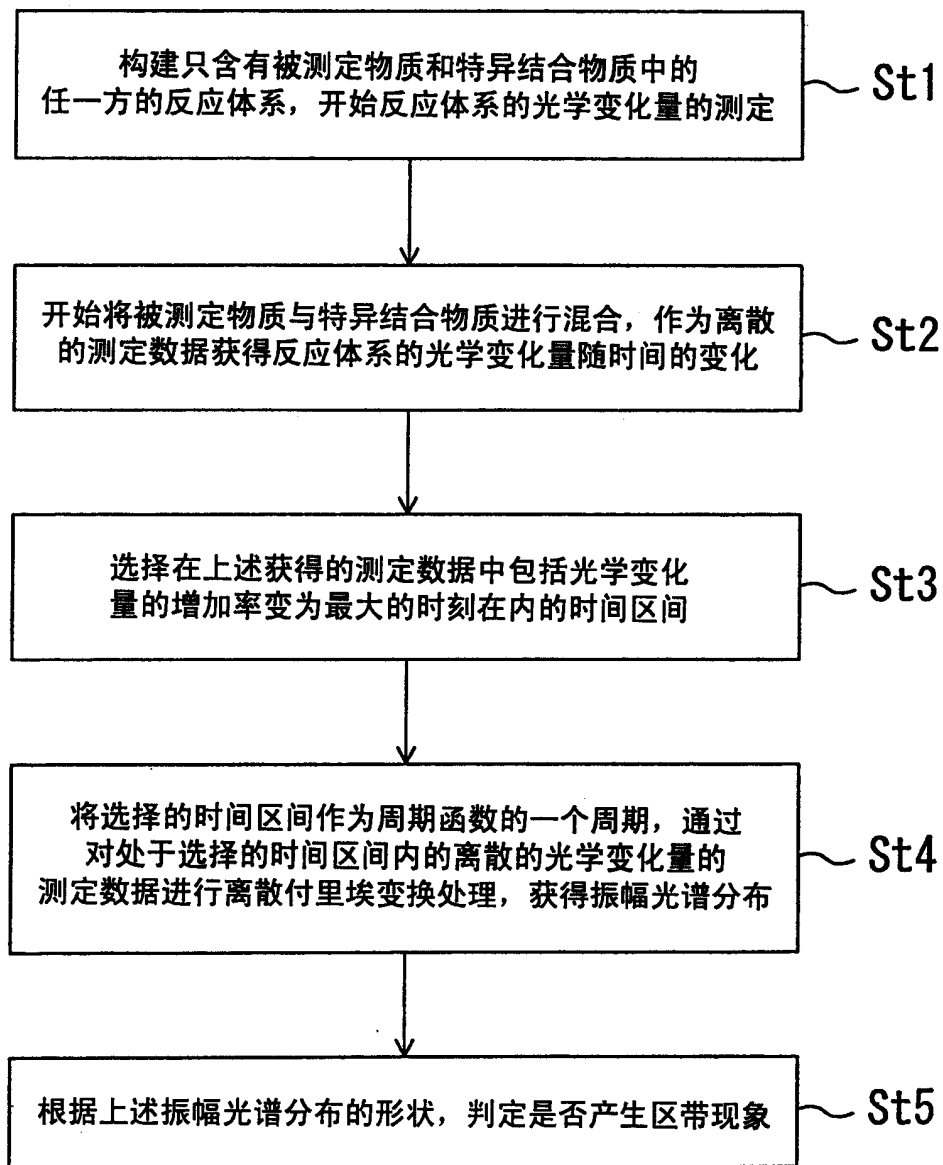


图 1

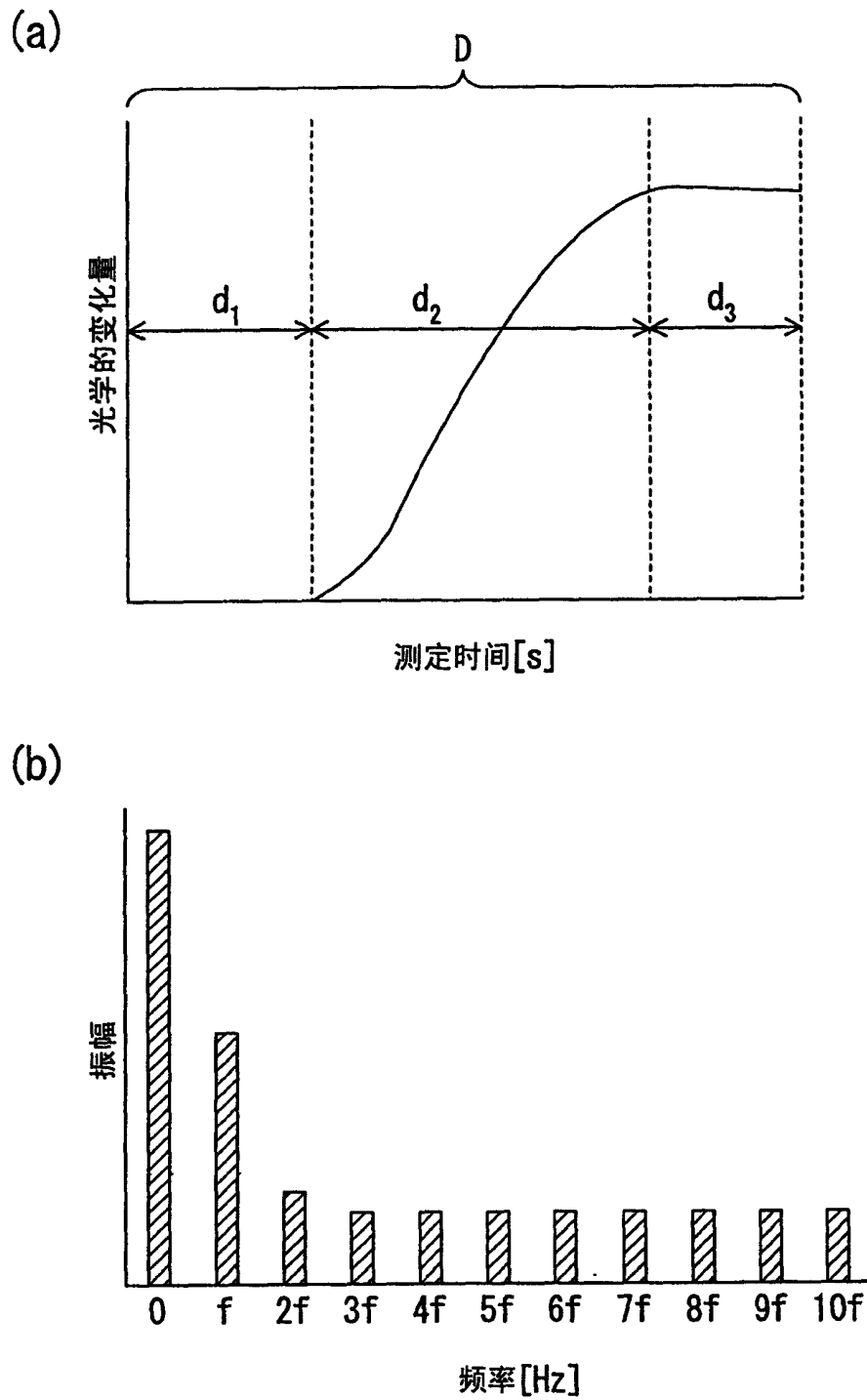


图 2

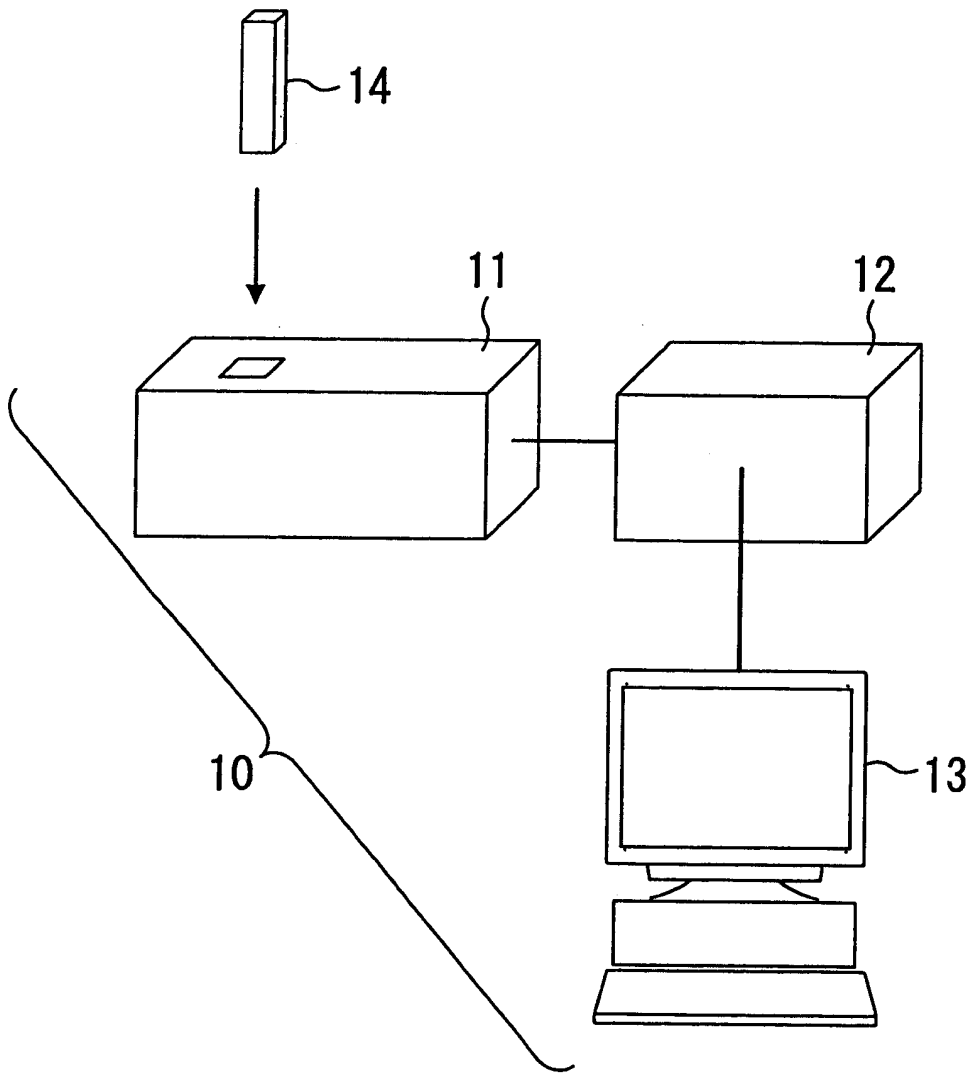


图 3

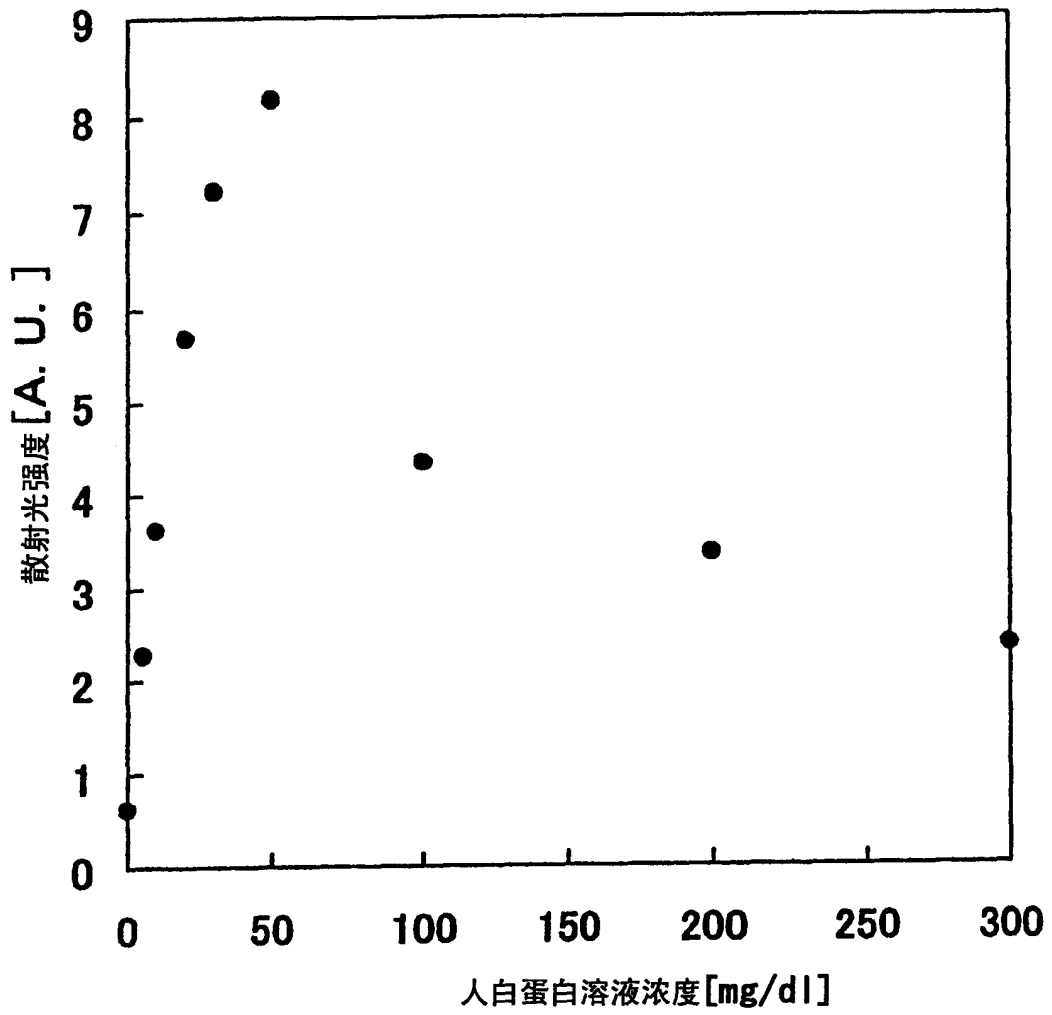


图 4

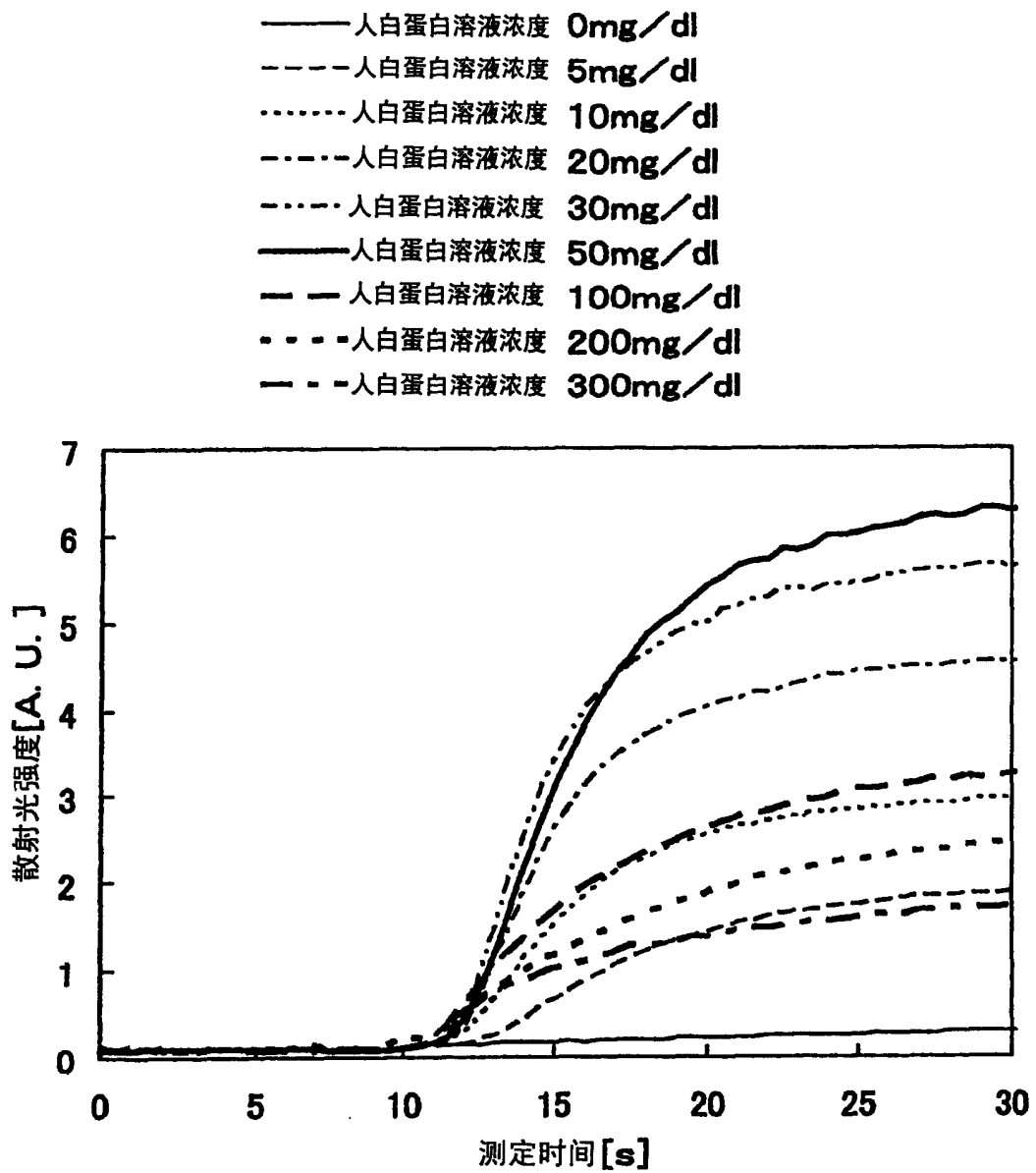


图 5

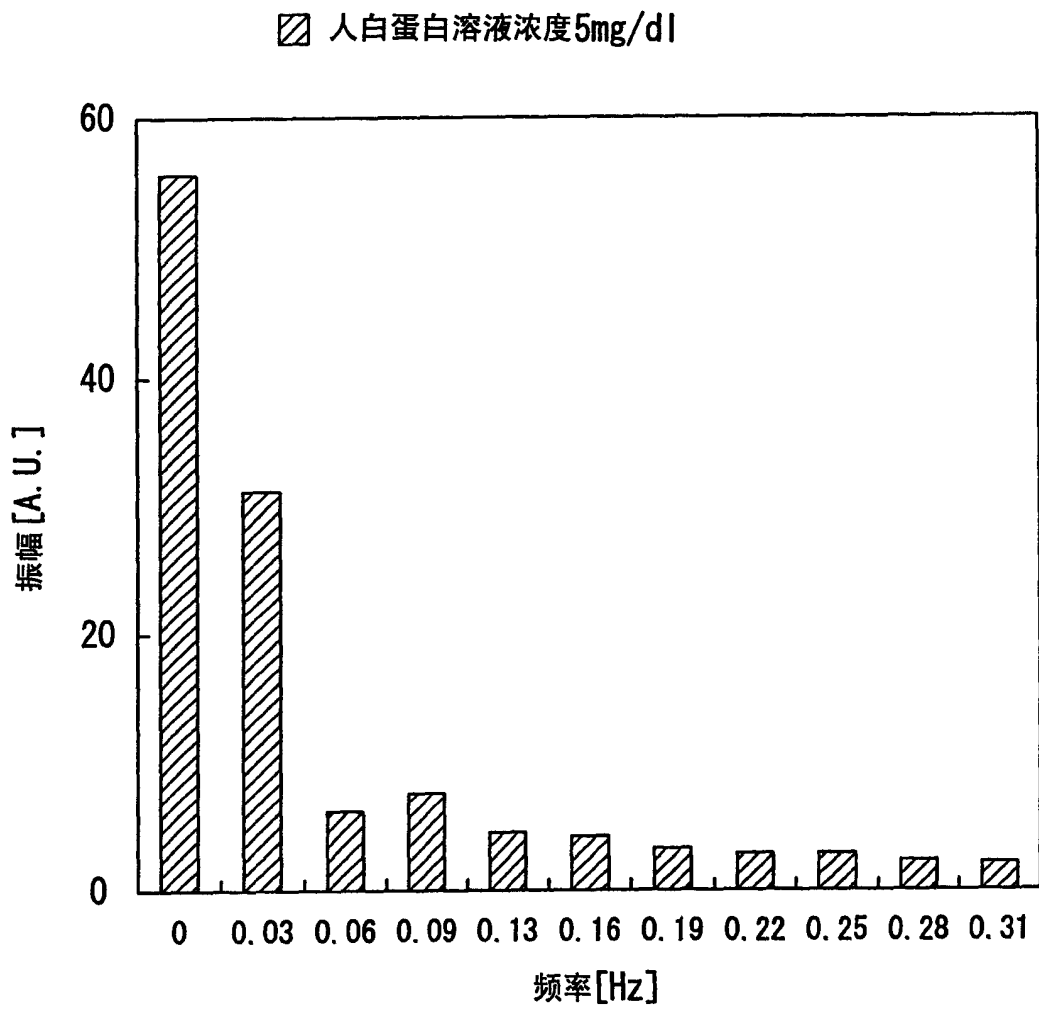


图 6

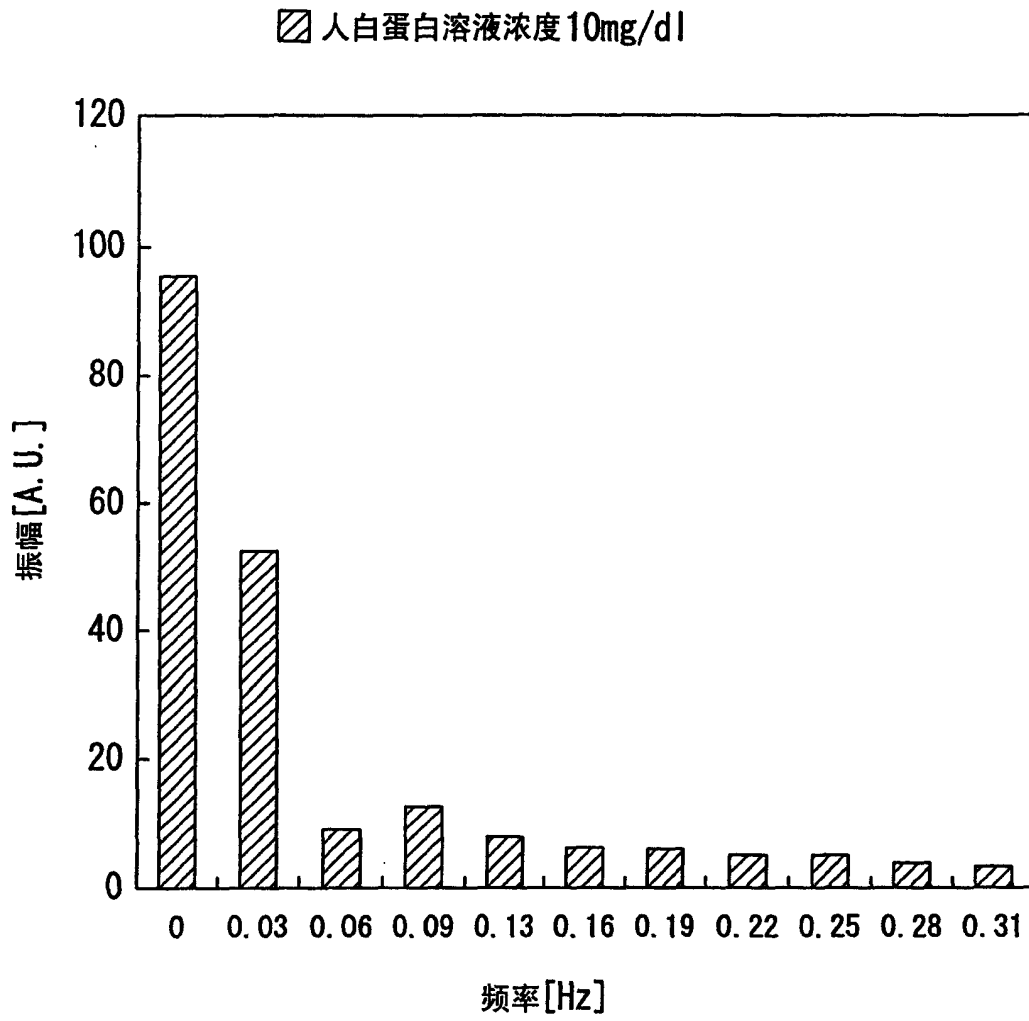


图 7

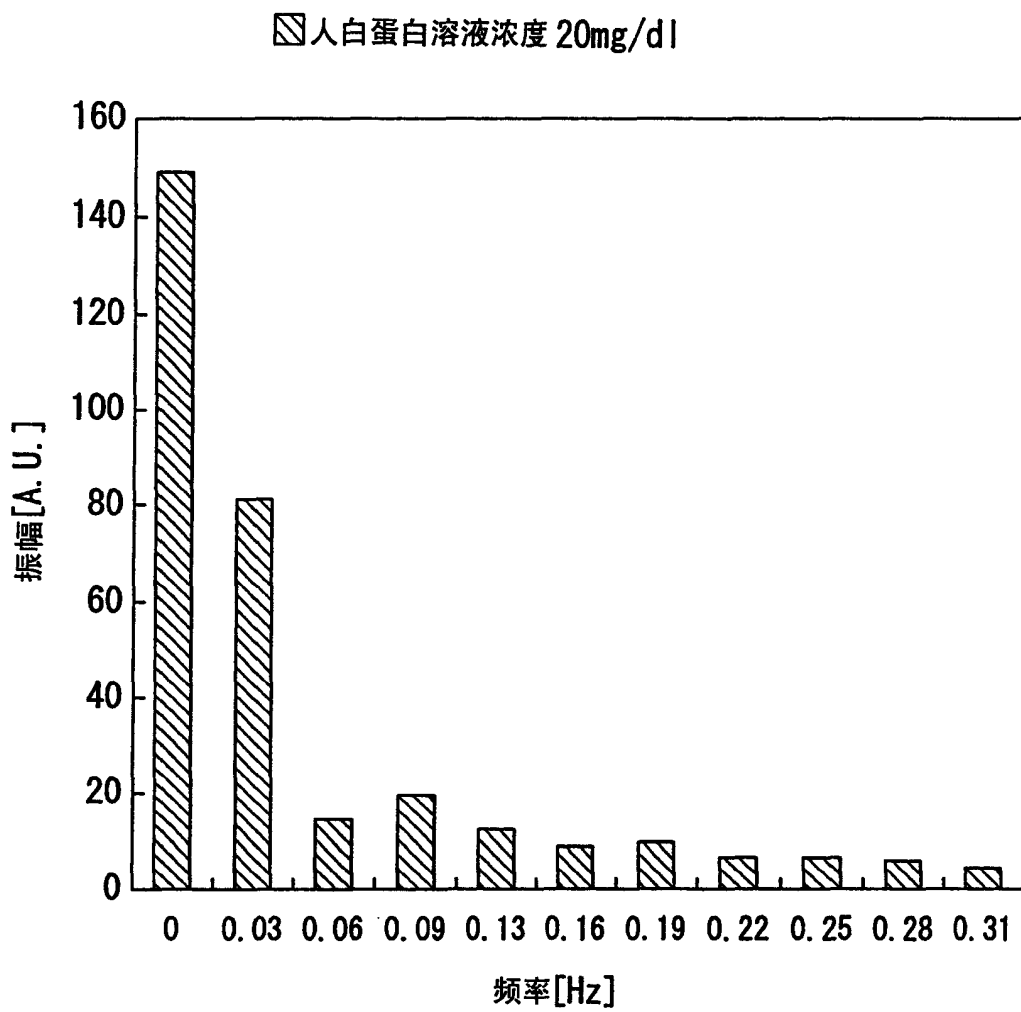


图 8

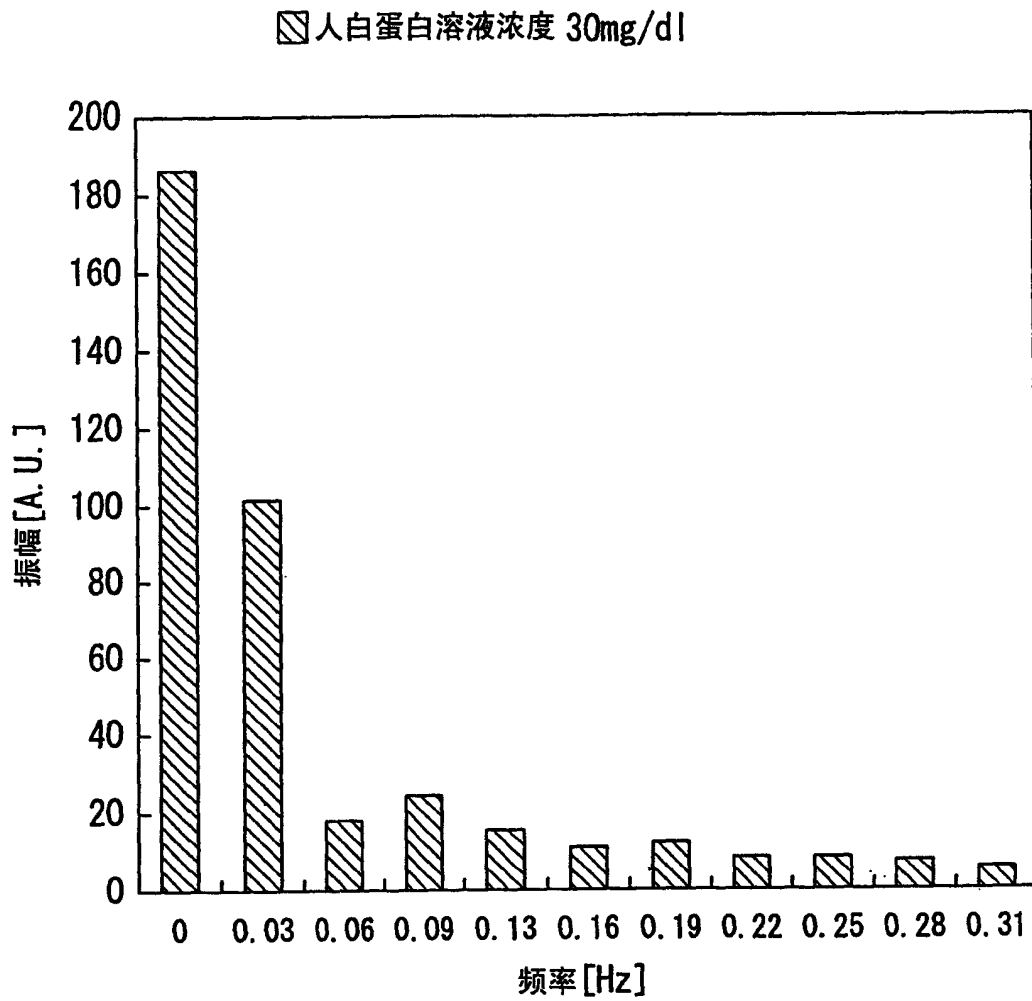


图 9

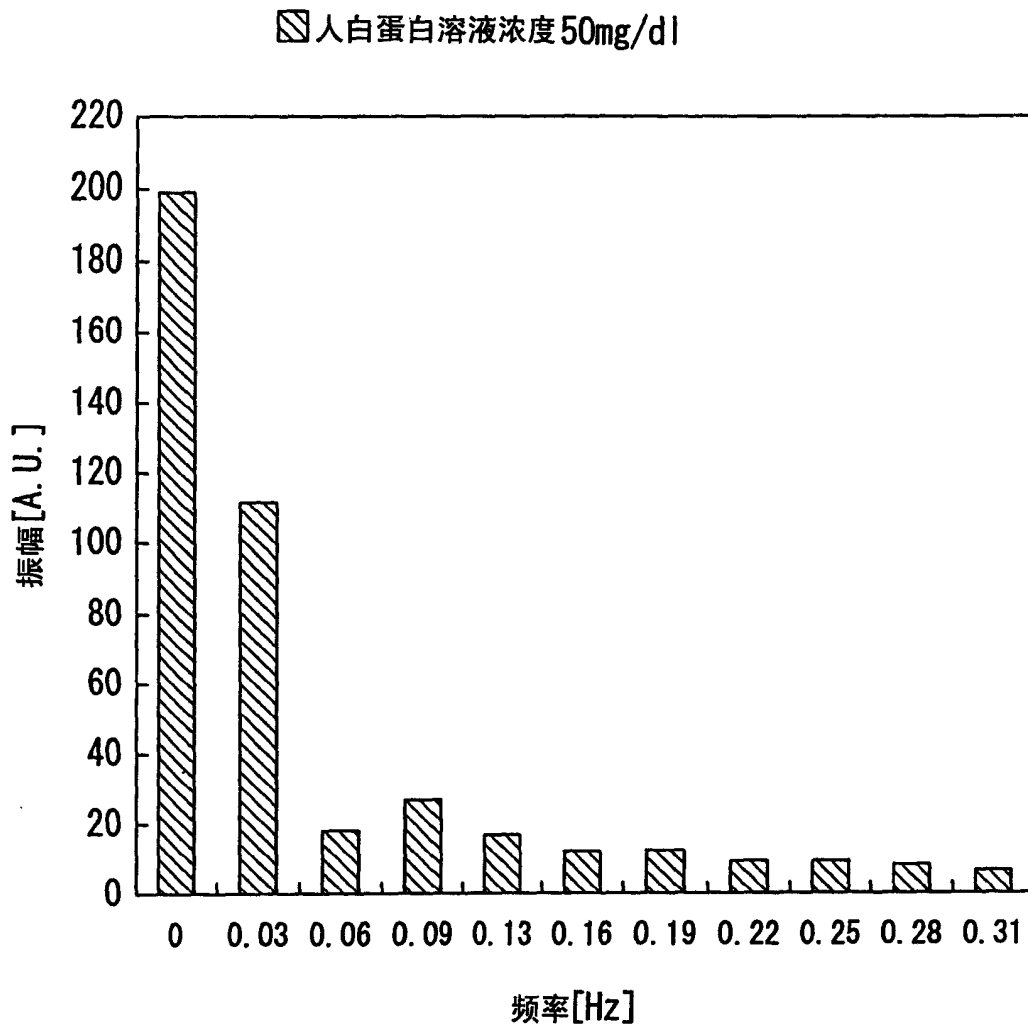


图 10

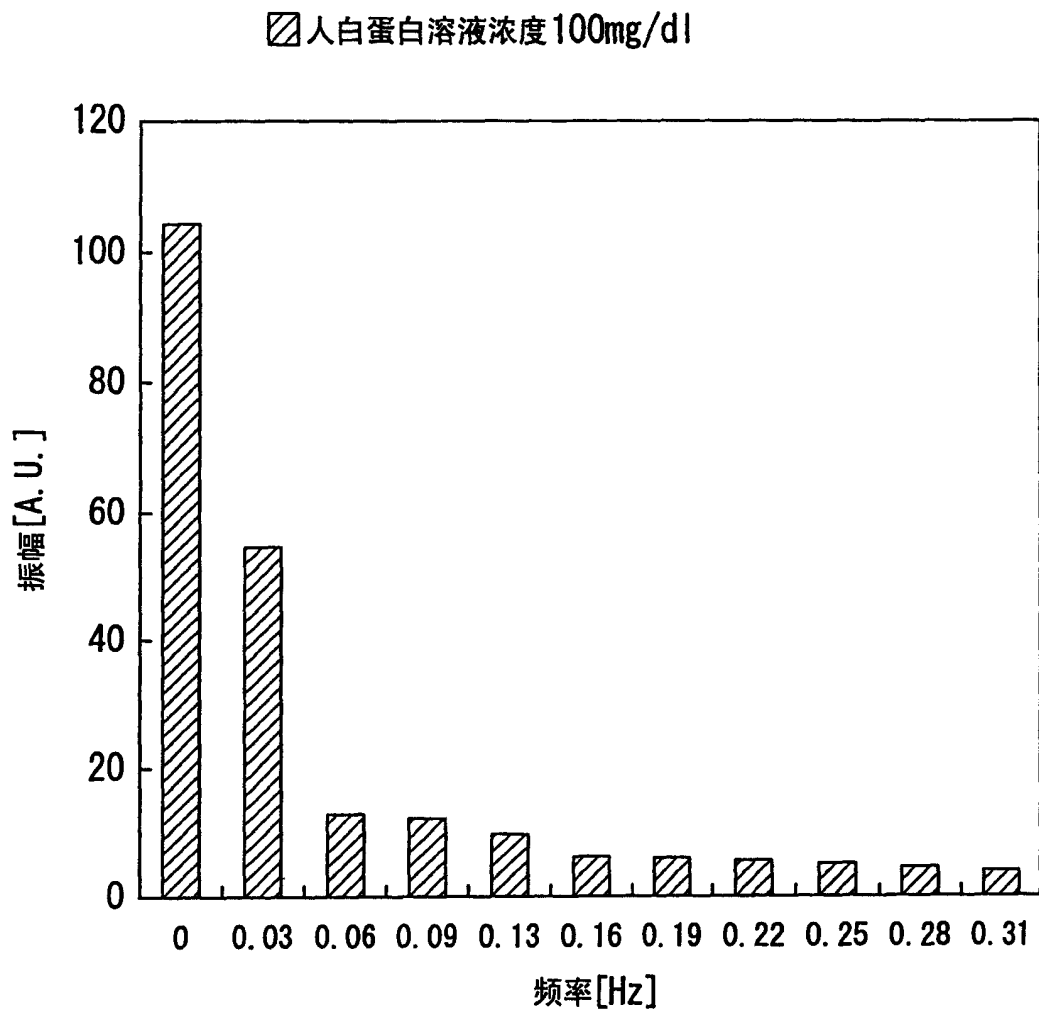


图 11

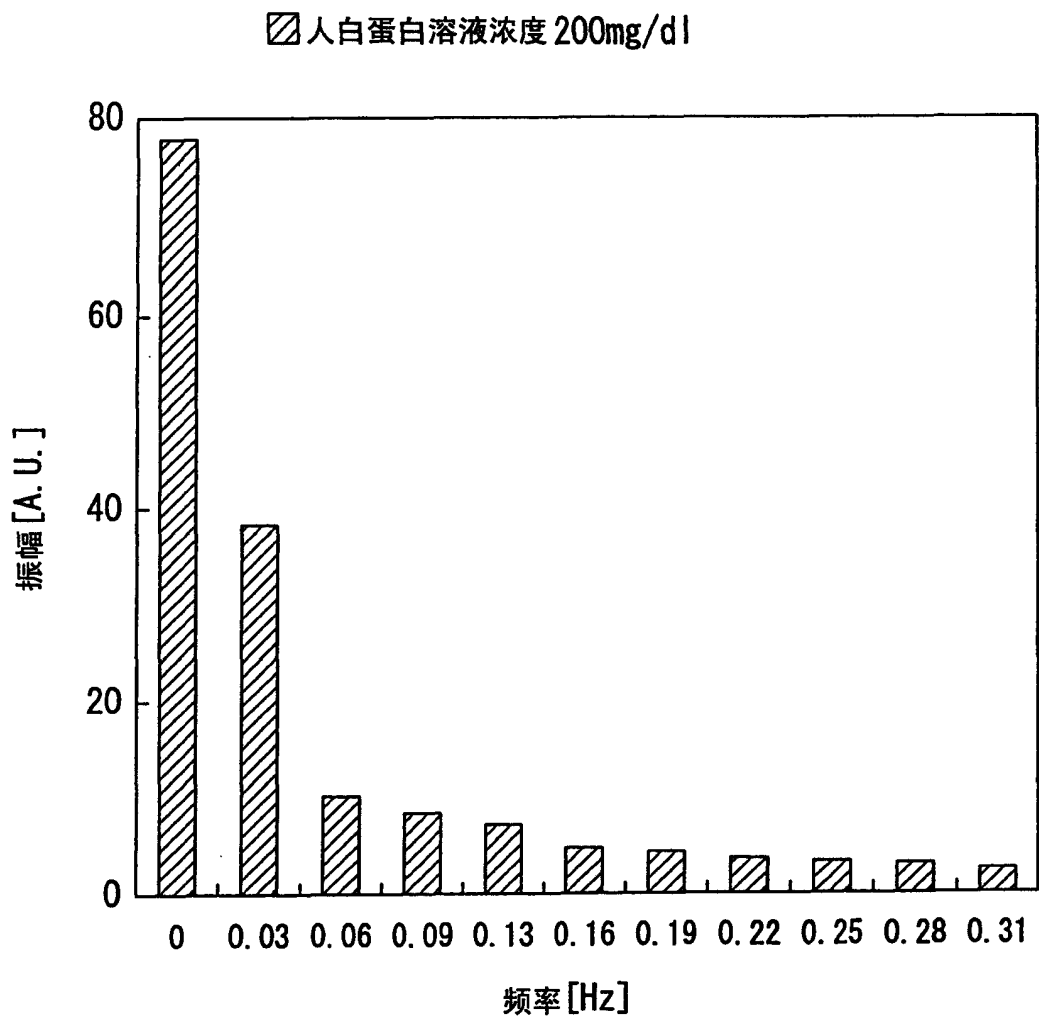


图 12

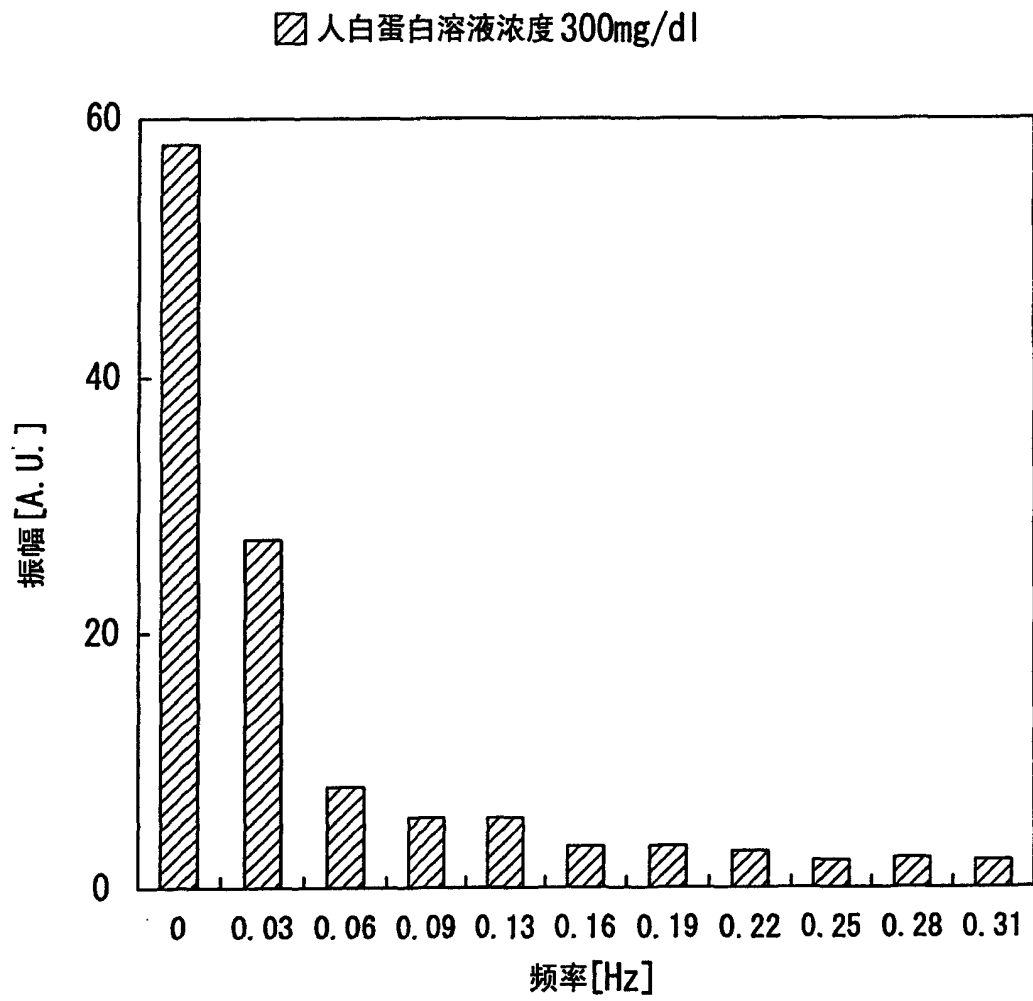


图 13

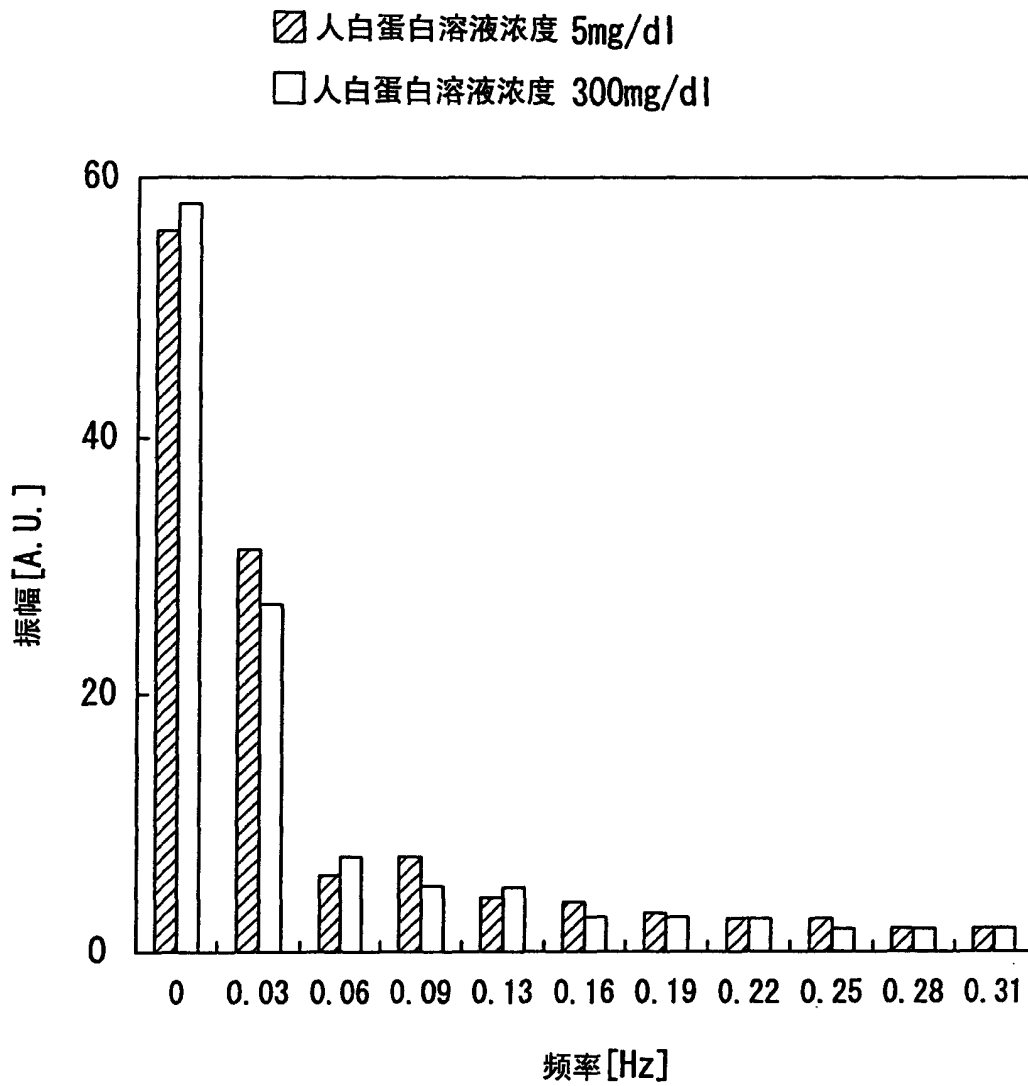


图 14

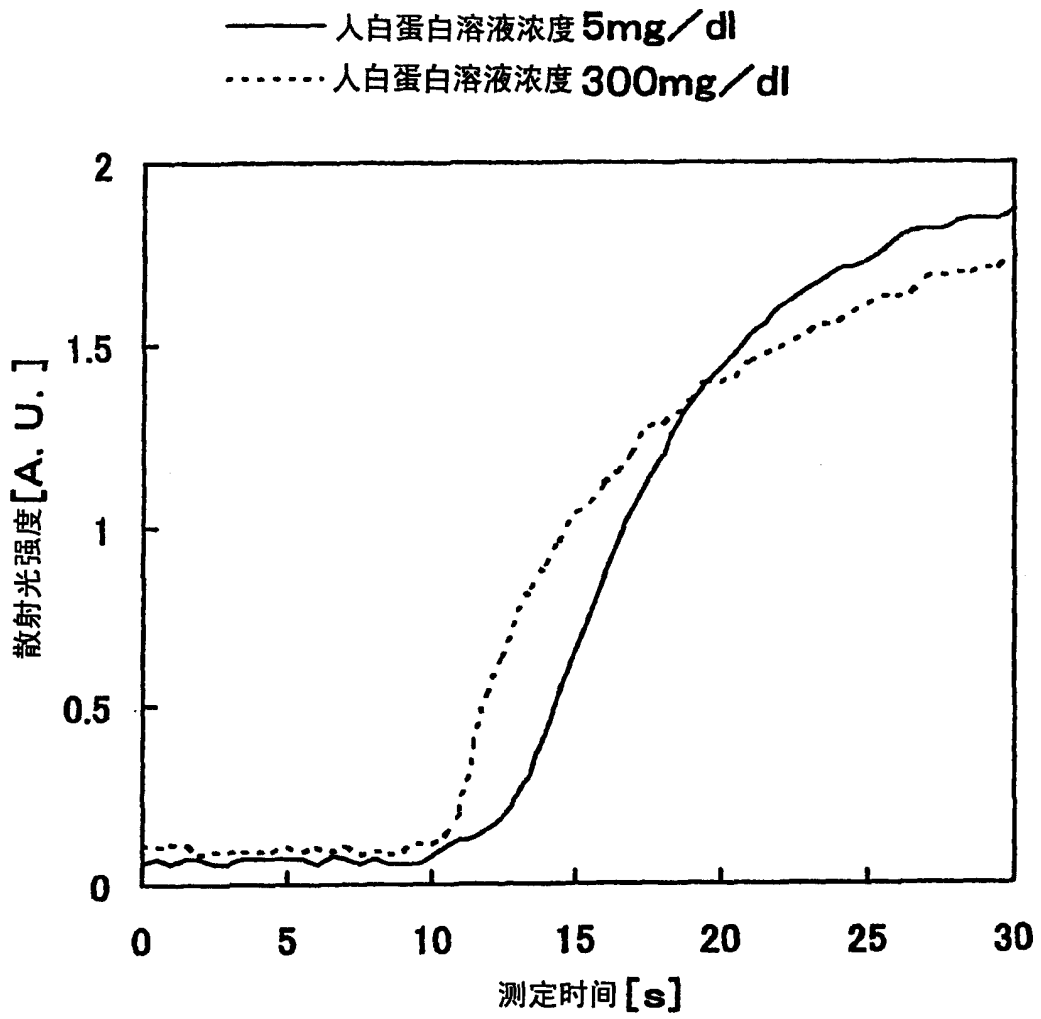


图 15

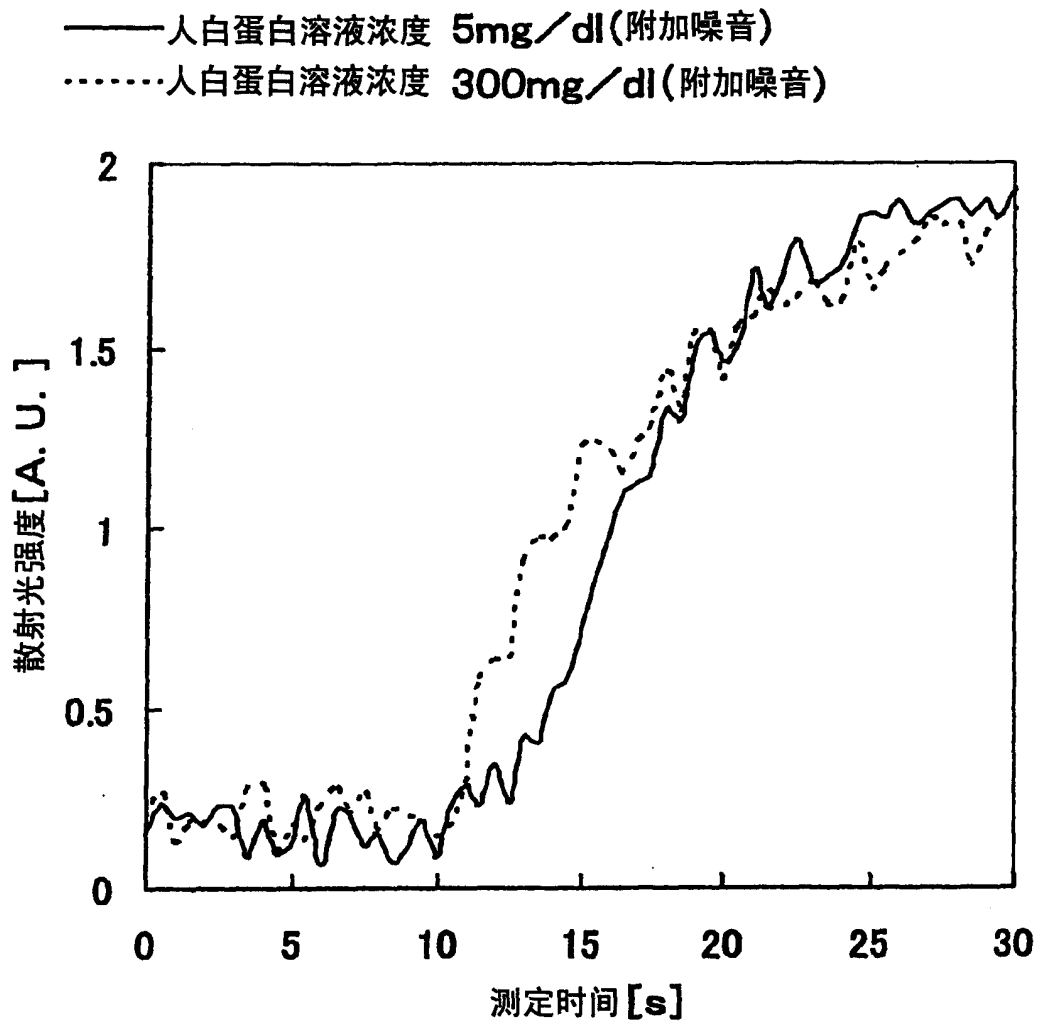


图 16

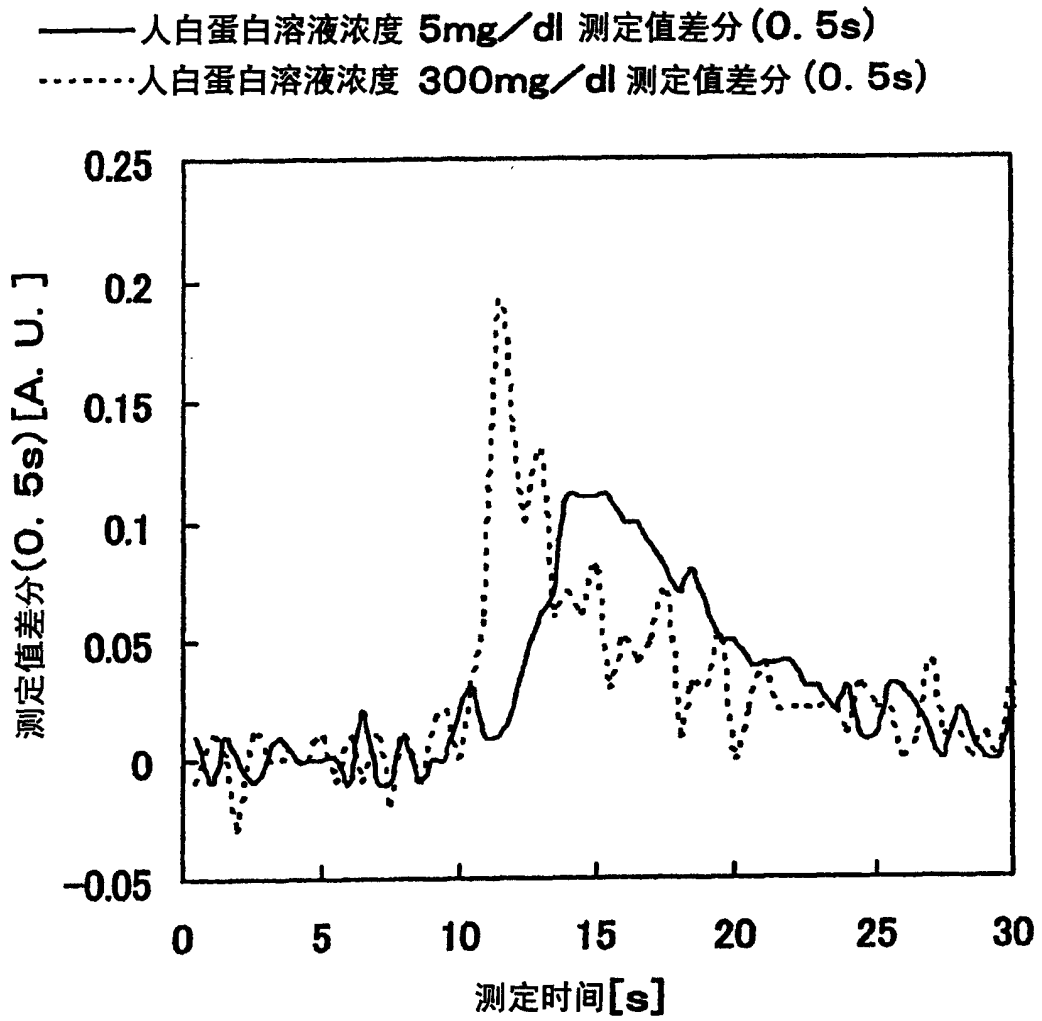


图 17

—— 人白蛋白溶液浓度 5mg/dl 噪音附加测定值差分(0.5s)
..... 人白蛋白溶液浓度 300mg/dl 噪音附加测定值差分(0.5s)

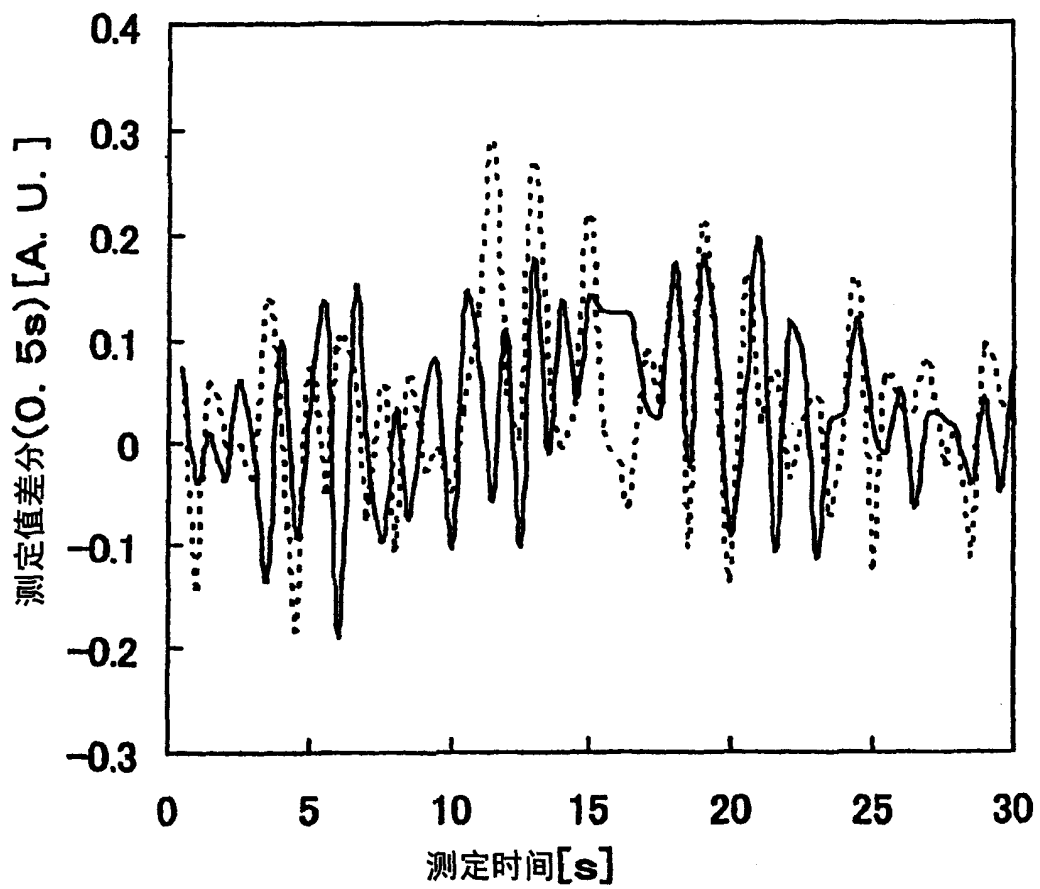


图 18

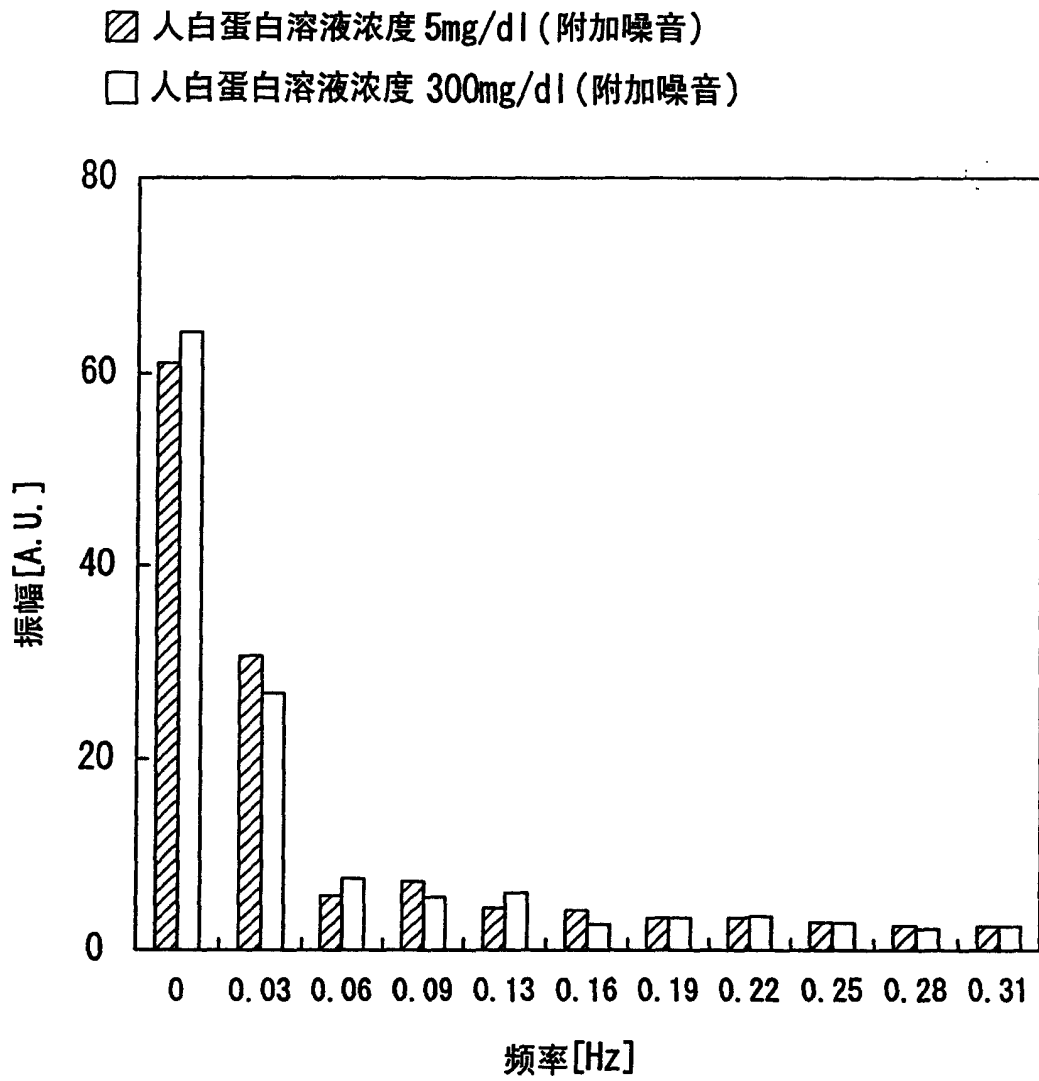


图 19

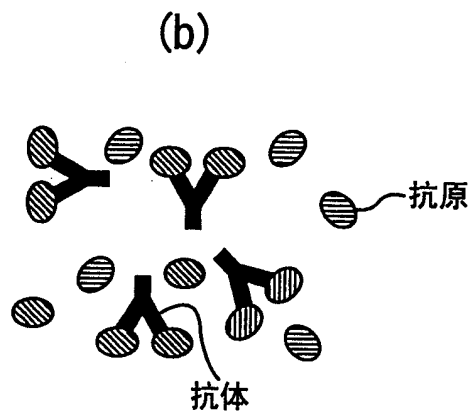
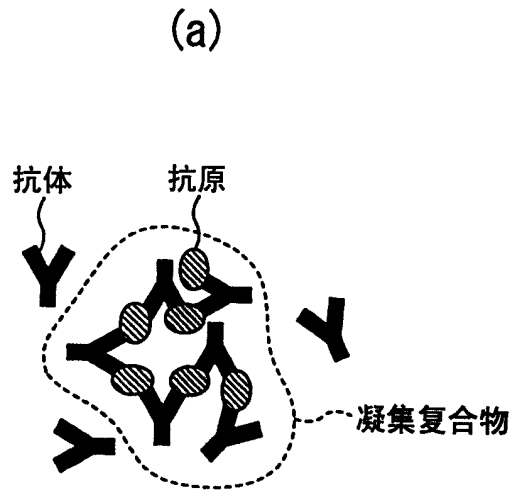


图 20