



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 002 902 T2 2007.02.01**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 496 361 B1**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/53** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 002 902.5**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 016 024.4**

(96) Europäischer Anmeldetag: **07.07.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.01.2005**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **25.10.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.02.2007**

(30) Unionspriorität:
2003271423 07.07.2003 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB

(73) Patentinhaber:
**Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., Kadoma,
Osaka, JP**

(72) Erfinder:
**Kamei, Akihito, Yawata-shi Kyoto 614-8295, JP;
Kawamura, Tatsuro, Kyotanabe-shi Kyoto
610-0351, JP**

(74) Vertreter:
**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(54) Bezeichnung: **Immuntest - Verfahren und Vorrichtung, welche zum Nachweis von Zonenphänomenen dient unter Verwendung einer Fourier-Transformation.**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Immunoassay-Verfahren, welches die Messung des Gehalts einer Substanz, die in einer Probe gemessen werden soll, ermöglicht, sowie ein Immunoassay-System, verwendet in dem Immunoassay-Verfahren.

[0002] Auf dem Gebiet der klinischen Untersuchung, zur Diagnose verschiedener Erkrankungen und zur Untersuchung des Verlaufs des Zustandes einer Erkrankung wurde das Messen des Gehaltes eines charakteristischen Proteins, kennzeichnend für jede Erkrankung und existierend in menschlichen Körperflüssigkeiten weithin verwendet. Für solch eine Messung des Proteingehalts wird hauptsächlich ein Immunoassay, welcher eine Reaktion verwendet (eine Antigen-Antikörper-Reaktion), welche einen Antikörper einsetzt, der in der Lage ist, spezifisch ein Zielprotein als Antigen zu erkennen, weithin eingesetzt. Bis heute wurden Immunoassay-Verfahren, basierend auf verschiedenen unterschiedlichen Prinzipien entwickelt.

[0003] Unter solchen Immunoassay-Verfahren sind Immunoassay-Verfahren, Messverfahren, wie z.B. Immuno-Nephelometrie, welche hier als "Nephelometrie" bezeichnet wird), Immunoturbidimetrie (welche hier im folgenden als "Turbidimetrie" bezeichnet wird) und eine Objektträger-Verklumpung (slide agglutination), verwendet zum Nachweis von Verklumpungen von Antigen-Antikörper-Komplexen, welche im folgenden hier als "Verklumpungs-Komplexe" bezeichnet werden, erzeugt infolge einer Antigen-Antikörper-Reaktion, für die Zwecke der Messung des Gehaltes einer Substanz, welche in einer Probe gemessen werden soll, wohl bekannt.

[0004] In einer Antigen-Antikörper-Reaktion tritt Trübung in einem Reaktionssystem aufgrund der Erzeugung von Verklumpungs-Komplexen auf. Der Grad der Trübung, erzeugt durch die Erzeugung von Verklumpungs-Komplexen, hängt von den Mengen an Antigen und Antikörpern ab. Die Nephelometrie und Turbidimetrie sind Verfahren, basierend auf diesem Prinzip, zur optischen Messung des Grades der Trübung, erzeugt in einem Reaktionssystem, welche außerdem die Menge eines Antigens oder eines Antikörpers aus einem erhaltenen Messwert berechnen. Genauer gesagt ist die Nephelometrie ein Verfahren zum Messen von Verklumpungs-Komplexen, basierend auf einer Veränderung in der Menge an gestreutem Licht, gestreut in einem Reaktionssystem und die Turbidimetrie ist ein Verfahren zum Messen der Verklumpungs-Komplexe, basierend auf einer Veränderung in einer Verminderungsmenge der Menge an transmittiertem Licht aufgrund der Streuung von Licht

in einem Reaktionssystem. Diese Messverfahren werden zur Messung verwendet, durchgeführt mit Antigenen und Antikörpern, welche einheitlich verteilt sind. Folglich nennt man diese Messungen im allgemeinen "homogene Immunoassays".

[0005] Im allgemeinen ist bekannt, dass in einem homogenen Immunoassay-Verfahren, ein Phänomen, welches das "Zonen-Phänomen" genannt wird, auftritt. Das Zonen-Phänomen, ist ein Phänomen, wo, wenn ein exzessiver Überschuss an Antigenen oder Antikörpern, im Vergleich mit einem Äquivalenzpunkt, an welchem die Antigene und Antikörper die maximale Menge an Verklumpungs-Komplexen bilden, beobachtet wird, Verklumpungs-Komplexe kaum erzeugt werden. Speziell verursacht ein Antigenüberschuss Probleme in vielen Fällen. Im folgenden wird das Phänomen beschrieben unter Verweis auf die [Fig. 20A](#) und [Fig. 20B](#). Die [Fig. 20A](#) und [Fig. 20B](#) sind schematische Darstellungen, welche eine Reaktion von Antigenen und Antikörpern in einem Reaktionssystem illustrieren, verwendet in einem homogenen Immunoassay.

[0006] Wie in [Fig. 20](#) gezeigt, wird normalerweise in einem homogenen Immunoassay ein Agglutinat-Komplex als eine große Molekülkette, einschließlich einen Antikörper und ein Antigen, welche alternierend aneinander binden, ausgebildet. Das Zonen-Phänomen ist ein Phänomen, wo ein Agglutinat-Komplex weniger leicht ausgebildet wird, wenn das Antigen in einer überschüssigen Menge im Vergleich zum Antikörper existiert wird, wie dies in [Fig. 20B](#) gezeigt ist, im Vergleich zu der Menge am Äquivalenzpunkt, an welchem das Antigen und der Antikörper die maximale Menge an Verklumpungs-Komplexen bilden. Wie für die Bindungsreaktion zwischen einem multivalenten Antikörper und einem divalenten oder höhervalenten Antigen ist die Gittertheorie von Heidelberger et al., bekannt und Details werden beschrieben in William E. Paul, *Fundamental Immunology*, 1989.

[0007] In einem Antigen-Antikörper-Konzentrationsbereich, abgesehen von dem Zonenphänomen, wie in [Fig. 20A](#) dargestellt, wird ein Verklumpungs-Komplex als eine große Molekülkette ausgebildet, in welcher der Antikörper und das Antigen alternativ aneinander binden. Falls in diesem Fall eine Antikörper-Konzentration konstant ist, erhöht sich die Menge und Größe der Verklumpungs-Komplexe mit der Zunahme der Antigen-Konzentration. Folglich kann durch Messen sowohl der Menge als auch der Größe der Verklumpungs-Komplexe in Form einer optischen Veränderung, die Antigen-Konzentration quantitativ gemessen werden. Darüber hinaus können Verklumpungs-Komplexe sichtbar bestätigt werden mit dem bloßen Auge in Form einer Trübung oder Verklumpung abhängig von den Antikörper- und Antigen-Konzentrationen. Folglich ist es auch möglich,

eine qualitative Beurteilung durch visuelle Beobachtung und dergleichen durchzuführen.

[0008] Jedoch wird in tatsächlich vorkommenden homogenen Immunoassays eine Antigen-Konzentration häufig unter Verwendung eines Antikörpers gemessen. Darüber hinaus haben Messwerte häufig signifikante Bedeutung in dem Fall, wo die Antigen-Konzentration hoch ist im Vergleich zu dem Fall, wo sie niedrig ist. Jedoch wenn das Antigen in einem überschüssigen Maß im Vergleich zum Antikörper vorliegt, ist die Menge der Antikörper mit durch Antigenen gesättigten Bindungsstellen erhöht, wie dies in [Fig. 20B](#) dargestellt ist und folglich wird die Erzeugung von Verklumpungs-Komplexen schwierig. Folglich ist es schwierig, die Ergebnisse der Antigen-Antikörper-Reaktion in dem Fall zu unterscheiden, wo die Antigen-Konzentration gering ist im Vergleich zu denjenigen im Falle, wo das Antigen im Überschuss vorliegt. Dementsprechend kann die korrekte Quantifizierung und Beurteilung gemäß der Antigen-Konzentration nicht realisiert werden. In einem anderen Fall ist die Durchführung der qualitativen Beurteilung bzw. die Beurteilung entsprechend der Antigen-Konzentration auf einen messbaren Konzentrationsbereich begrenzt. Wie oben beschrieben, wird das Zonen-Phänomen, verursacht durch den Antigenüberschuss, häufig Ursache eines Problems in homogenen Immunoassays.

[0009] Um die oben beschriebenen Probleme zu lösen, wird ein Verfahren offenbart, in welchem ein Antikörper (oder Antigen), d.h. eine bindende Substanz, welche in der Lage ist, spezifisch an ein Antigen (oder einen Antikörper) zu binden, d.h. eine Substanz, welche gemessen werden soll, in verschiedenen Konzentrationen präpariert, bei welchen der Gehalt des Antikörpers (oder Antigens) $1/n$ ist, (wobei n eine zufällige Zahl größer als 1 ist) und die bindende Substanz in jeder Konzentration wird in Reaktion mit der zu testenden Substanz gebracht und anschließend wird ein erzeugter Verklumpungs-Komplex gemessen (siehe die japanische offengelegte Veröffentlichungsnummer 60-79269). Gemäß dem Verfahren, kann beurteilt werden, ob eine Antigen-Antikörper-Reaktion innerhalb eines Konzentrationsbereichs aufgetreten ist, in welchem ein Antigen-Überschuss vorliegt (was hier im folgenden als "Zonenregion" bezeichnet wird).

[0010] Darüber hinaus wird ein Verfahren offenbart, in welchem aus Messergebnissen, erhalten durch Messen unter Verwendung von zwei Lichtquellen von verschiedenen Wellenlängen, ein Beurteilungsindex, wie z.B. ein Absorptionsverhältnis, durch Berechnen erhalten wird, und ermittelt wird, ob eine Antigen-Antikörper-Reaktion in einer Zonenreaktion auftreten ist, basierend auf dem Bewertungsindex oder nicht (siehe japanische offengelegte Publikationsnummer 63-19560, japanische offengelegte Publikationsnum-

mer 63-149564 und japanische offengelegte Publikationsnummer 4,204,378).

[0011] Desweiteren wird ein Verfahren offenbart, in welchem unter Verwendung einer Reaktionsrate, erhalten durch die Differentiation eines optischen zu messenden Signals mit der Zeit beurteilt wird, ob eine Antigen-Antikörper-Reaktion in einer Zonenregion aufgetreten ist, basierend auf einem Peak-Raten-Wert, in welchem die Reaktionsrate an einem Maximum angekommen ist und der vergangenen Zeit von einem Start einer Reaktion bis zu der Zeit, wenn die Peak-Rate erreicht ist (siehe US-Patent Nr. 4,157,871).

[0012] Jedoch müssen in dem Verfahren, offenbart in der japanischen offengelegten Publikations-Nr. 60-79269, eine Vielzahl von Reaktionsgefäßen präpariert werden und eine Vielzahl von Messungen müssen für jede Probe durchgeführt werden. Dementsprechend werden die Messprozeduren schwierig.

[0013] Desweiteren müssen in den Verfahren, offenbart in der japanischen offengelegten Publikations-Nr. 63-19560, in der japanischen offengelegten Publikations-Nr. 63-149564 und in der japanischen offengelegten Publikationsnummer 4-204378, eine Vielzahl von Lichtquellen hergestellt werden oder Mittel zum Abtrennen von Licht einer jeden Wellenlänge von weißem Licht sowie Mittel zum Durchführen einer Vielzahl von Messungen oder Mittel zum Durchführen von Wellenlängen-Abtrennungen an einer Detektorstelle müssen bereitgestellt werden.

[0014] Dementsprechend wird die Konfiguration eines Meßsystems komplex und auch die Messprozeduren werden schwierig.

[0015] Darüber hinaus wird in dem Verfahren, offenbart im US-Patent Nr. 4,157,871, wenn der Peak-Raten-Wert klein ist, dieser Peak-Raten-Wert leicht durch eine Verunreinigung beispielsweise durch Blasen oder Staub und die Erzeugung von Rauschen aufgrund des Einflusses von Magnetwellen auf einen Dekoder und dergleichen beeinflusst. Folglich ist die Möglichkeit des Auftretens eines Fehlers in der Beurteilung der Resultate erhöht.

[0016] Die US-Anmeldung 2003/0100129 betrifft ein spezifisches Bindungsanalyse-Verfahren zum quantitativen Bestimmen eines Analyten in einer Probe aus einem Signal, zugeordnet zu einer spezifischen Bindungsreaktion zwischen dem Analyt in der Probe und einer spezifisch bindenden Substanz, welche in der Lage ist, spezifisch an den Analyten zu binden, charakterisiert dadurch, dass die folgenden Schritte umfasst werden:

(a) vorab Herstellen einer Datenbank umfassend für eine individuelle Probe enthaltend einen zu er-

wartenden Analyt, zumindest die Beziehung zwischen einer Konzentration des Analyts und einem Sättigungswert oder einer Veränderung der Signalintensität, zugeordnet zu einer spezifischen Bindungsreaktion zwischen dem Analyt in der Probe und einer spezifischen Bindungssubstanz, welche in der Lage ist, spezifisch an den Analyten zu binden, die Veränderung der Signalintensität mit der Zeit und die Zeit t_s , zu welcher der Sättigungswert erhalten wird sowie die Zeit t_m , zu welcher ein Maximumwert der Signalintensität erhalten wird;

(b) Erzeugen einer Probe, enthaltend einen Analyten und Bestimmen, basierend auf der Datenbank, eines Messmusters der Signalintensität korrespondierend mit der Probe;

(c) Auslösen einer spezifischen Bindungsreaktion zwischen dem Analyten und einer spezifischen Bindungssubstanz;

(d) Messen der Signalintensität, basierend auf dem Messmuster, zumindest zweimal in einem Zeitraum, in welchem die Signalintensität, zugeordnet zur spezifischen Bindungsreaktion eine Sättigung erreicht, nach dem Schritt (c); und

(e) Bestimmen basierend auf der Datenbank, einer Menge des Analyts in der Probe durch Verwendung von zumindest zwei Signalintensitäten, erhalten in dem Schritt (d).

[0017] WO 91/04489 offenbart ein homogenes Immunoassay-System zur Bestimmung eines Antikörpers oder eines Antigens in einer Probe, welches aus einem interferometrischen Signal einer optischen Quelle besteht, einen Wellenleiter, gecoatet mit einem Antikörper oder einem Antigen und aufweisend zumindest eine Region, eingetaucht in eine Lösung, enthaltend eine Probe, wobei das korrespondierende Antigen oder der korrespondierende Antikörper auf dem Wellenleiter komplexiert werden können, einen Detektor, adaptiert, um das interferometrische Signal nach seiner Ausbreitung durch den Wellenleiter zu messen, und eine Messeinheit, zur Durchführung einer Fourier-Transformation des interferometrischen Signals zum Bestimmen des Grades der Abschwächung des interferometrischen Signals einer Wellenlänge korrespondierend mit einer Absorptionscharakteristik des Antigen-Antikörper-Komplexes oder eines Labels, eingebracht in den Antigen-Antikörper-Komplex, wobei das Bestimmen der Menge an Antigen oder Antikörper in der Probe erfolgt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0018] Die vorliegende Erfindung wurde entwickelt mit Blick auf die oben beschriebenen Situationen. Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein einfaches und hochakkurates Immunoassay-Verfahren zur Verfügung zu stellen.

[0019] Ein Immunoassay-Verfahren gemäß der vor-

liegenden Erfindung ist ein Immunoassay-Verfahren zum Messen einer Konzentration einer Substanz, welche gemessen werden soll und in einer Probenlösung enthalten ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

a) Mischen der Probenlösung und einer spezifisch bindenden Substanz, die in der Lage ist, spezifisch an die zu messende Substanz zu binden und Erhalten innerhalb eines vorbestimmten Probennameintervalls, einer zeitlichen Veränderung einer optischen Größe in einer Reaktion der zu messenden Substanz und der spezifisch bindenden Substanz als diskrete Messwerte;

b) Auswahl eines Zeitintervalls aus den Messwerten, einschließlich einer Zeit, zu der die Steigerungsrate der Änderung der optischen Größe maximal ist;

c) Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation der Messwerte mit dem Zeitintervall, von dem angenommen wird, eine Periode einer periodischen Funktion zu sein, um eine Amplitudenspektrum-Verteilung zu erhalten; und

d) Bewerten, anhand der Form der Amplitudenspektrum-Verteilung, ob ein Zonen-Phänomen in der Reaktion in Schritt a) eingetreten ist.

[0020] In dem Verfahren ist eine Kombination der zu messenden Substanz und der spezifisch bindenden Substanz eine Kombination eines Antigens und eines Antikörpers.

[0021] Gemäß dem Immunoassay-Verfahren der vorliegenden Erfindung kann der Gehalt (die Konzentration) einer zu messenden Substanz erhalten werden. Genauer gesagt kann gemäß der vorliegenden Erfindung die Veränderung der Größe des optischen Parameters eines Reaktionssystems gemessen werden, während beurteilt wird, ob das Zonen-Phänomen in einem Reaktionssystem aufgetreten ist oder nicht. Folglich ist ein Wert für den Gehalt (die Konzentration) der zu messenden Substanz, erhalten basierend auf der Veränderung der Größe des optischen Parameters hoch verlässlich. Darüber hinaus ist die Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems messbar, während beurteilt wird, ob das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem aufgetreten ist oder nicht. Folglich können die Messprozeduren sehr einfach sein. Darüber hinaus wird gemäß der vorliegenden Erfindung eine Fourier-Transformation eingesetzt. Folglich kann für eine Veränderung in den Messdaten, Rauschen als ein hochfrequentes Signal betrachtet werden und ein Signal aufgrund der Veränderung in Messdaten kann von einem Signal aufgrund von Rauschen abgetrennt werden. Dementsprechend wird das Immunoassay-Verfahren dieser Ausführungsform kaum durch Rauschen beeinflusst.

[0022] Die Veränderung der Größe des optischen Parameters kann eine Größe einer Veränderung der

gestreuten Lichtintensität oder eine Größe einer Veränderung an transmittiertem Licht sein.

[0023] Das Zeitintervall kann im Voraus bestimmt worden sein, basierend auf Messdaten für die Veränderung der Größe des optischen Parameters, gemessen in einer Reaktion, in welcher kein Zonen-Phänomen auftritt.

[0024] Das Zeitintervall kann eines sein von einer Zeit, bei welcher die spezifische Bindungssubstanz und die Probenlösung vermischt werden bis zu einer Zeit, zu der die Veränderung der Größe des optischen Parameters konstant wird, nachdem die Reaktion substantiell gesättigt ist.

[0025] Es ist bevorzugt, dass in Schritt d) beurteilt wird, ob das Zonen-Phänomen in der Reaktion in Schritt a) aufgetreten ist oder nicht, basierend auf der Form der Amplitudenspektrum-Verteilung, gemessen in einer Reaktion, in welcher kein Zonen-Phänomen auftritt.

[0026] In Schritt e) kann beurteilt werden, ob das Zonen-Phänomen in der Reaktion in Schritt d) aufgetreten ist oder nicht, basierend auf der Form der Amplitudenspektrum-Verteilung und einer Form der Amplitudenspektrum-Verteilung, gemessen in einer Reaktion, welcher kein Zonen-Phänomen auftritt.

[0027] Es ist bevorzugt, dass in Schritt d) beurteilt wird, ob das Zonen-Phänomen in der Reaktion in Schritt a) aufgetreten ist oder nicht, basierend auf einem Verhältnis eines Amplitudenwertes bei einer Frequenz, korrespondierend mit einem reziproken Wert des Zeitintervalls, zu einer Gleichstromkomponente (d.h. einem Amplitudenwert bei einer Frequenz von 0) der Amplitudenspektrum-Verteilung.

[0028] Es ist bevorzugt, dass in dem Schritt d) beurteilt wird, dass kein Zonen-Phänomen in der Reaktion in dem Schritt a) aufgetreten ist, falls das Verhältnis höher ist als ein Referenzwert erhalten aus entsprechenden Verteilungen einer Reaktion, in welcher kein Zonen-Phänomen auftritt und einer Reaktion, in welcher das Zonen-Phänomen auftritt und dass das Zonen-Phänomen aufgetreten ist in der Reaktion in Schritt a), falls das Verhältnis geringer ist als der Referenzwert.

[0029] Das Immunoassay-Verfahren der vorliegenden Erfindung kann desweiteren vor dem Schritt a) den Schritt e) einschließen des Konstruierens eines Reaktionssystems, das nur einen Vertreter aus der Gruppe der Probenlösungen der spezifisch bindenden Substanz einschließt und des Erhaltens innerhalb eines vorher bestimmten Probenname-Intervalls, einer sich mit der Zeit ändernden optischen Größe (= Größe der Veränderung des optischen Parameters) in dem Reaktionssystem als diskrete Messwerte. In

diesem Verfahren wird im Schritt a) der andere Vertreter aus der Probenlösung und der spezifisch bindenden Substanz, der nicht in dem Reaktionssystem enthalten ist, ggf. zum Reaktionssystem hinzugegeben, um die Probenlösung und die spezifisch bindende Substanz zu vermischen und das Zeitintervall mag von einer Zeit, bevor die spezifisch bindende Substanz und die Probenlösung vermischt werden, bis zu einer Zeit, wenn die Veränderung der Größe des optischen Parameters substantiell konstant wird, nachdem die Reaktion substantiell gesättigt ist, reichen.

[0030] Es ist bevorzugt, dass in dem Schritt d) beurteilt wird, dass kein Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem in Schritt a) aufgetreten ist, falls eine Differenz zwischen einem reziproken Werts eines Zeitintervalls von einer Zeit, wenn die spezifische Bindungssubstanz und die Probenlösung vermischt werden bis hin zu einer Zeit, wenn eine Reaktion in dem Reaktionssystem substantiell gesättigt wird und einem Amplitudenwert bei einer Frequenz korrespondierend mit einem reziproken Wert eines Zeitintervalls von der Zeit, wenn die spezifisch bindende Substanz und die Probenlösung vermischt werden bis zu der Zeit, wenn die Veränderung der Größe des optischen Parameters substantiell konstant wird, nachdem die Reaktion wie im Reaktionssystem gesättigt wird, einen positiven Wert annimmt und das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem in Schritt a) auftreten ist, falls die Differenz einen negativen Wert annimmt.

[0031] Eine Konzentration der Substanz, welche gemessen werden soll, kann quantifiziert werden, basierend auf einem Amplitudenwert einer Gleichstromkomponente der Amplitudenspektrum-Verteilung in Schritt c).

[0032] Optional kann ein Immunoassay-System gemäß der vorliegenden Erfindung folgendes einschließen: ein Mittel zum Messen einer Veränderung einer Größe eines optischen Parameters einer Reaktion, ausgelöst, wenn eine Probenlösung enthaltend eine zu messende Substanz und eine spezifisch bindende Substanz, welche in der Lage ist, spezifisch eine. zu messende Substanz zu binden, vermischt werden; ein Mittel zum Verarbeiten von Messdaten, verknüpft mit dem Mittel zur Messung, zum Auswählen eines Zeitintervalls der Messdaten, erhalten durch das Mittel zum Messen, einschließlich einer Zeit, zu der eine Steigerungsrate der Veränderung der Größe des optischen Parameters maximal ist und das Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation, wobei angenommen wird, dass das Zeitintervall eine Periode einer periodischen Funktion ist, auf die gemessenen Daten, innerhalb des Zeitintervalls, um eine Amplitudenspektrum-Verteilung zu erhalten; und ein Auswertungsmittel verknüpft mit dem Mittel zum Verarbeiten der Messdaten zum Auswerten, basierend auf der Form der Amplitudenspektrum-Verteilung, ob ein Zo-

nen-Phänomen in der Reaktion aufgetreten ist oder nicht.

[0033] Mit dem optionalen Immunoassay-System der vorliegenden Erfindung kann die Veränderung der Größe des optischen Parameters einer Reaktion gemessen werden, während beurteilt wird, ob das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem aufgetreten ist oder nicht. Folglich ist ein Wert für den Gehalt (die Konzentration) der zu messenden Substanz, erhalten basierend auf der Veränderung der Größe des optischen Parameters höchst verlässlich. Darüber hinaus kann die Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems gemessen werden, während beurteilt wird, ob das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem aufgetreten ist oder nicht. Dementsprechend können Messprozeduren sehr einfach sein. Darüber hinaus wird gemäß der vorliegenden Erfindung eine Fourier-Transformation eingesetzt. Folglich kann für eine Veränderung der Messdaten das Rauschen als ein hochfrequentes Signal betrachtet werden und ein Signal aufgrund der Veränderung in den Messdaten kann von einem Signal hervorgerufen durch Rauschen unterschieden werden. Folglich ist das Immunoassay-Verfahren dieser Ausführungsform kaum durch Rauschen beeinflusst. Das heißt, gemäß dieser Ausführungsform kann eine einfache und hochverlässliche immunologische Messung durchgeführt werden.

[0034] Das Zeit-Intervall kann aus einer Zeit sein, wenn die spezifische Bindungssubstanz und die Probenlösung vermischt werden, bis hin zu einer Zeit, wenn die Veränderung der Größe des optischen Parameters substantiell konstant wird, nachdem die Reaktion substantiell gesättigt ist.

[0035] Das optionale Immunoassay-System kann eine Konfiguration aufweisen, in welcher das Mittel zum Auswerten im voraus gespeichert worden ist, als eine Referenzform, nämlich eine Form einer Amplitudenspektrum-Verteilung in dem Fall, wo kein Zonen-Phänomen in der Reaktion aufgetreten ist und es vergleicht die Referenzform mit einer Form der Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch das Messdaten-verarbeitende Mittel, wodurch die Beurteilung durchgeführt wird.

[0036] Das optionale Immunoassay-System kann eine Konfiguration aufweisen, in welcher das Auswertemittel eine Beurteilung durchführt, basierend auf einem Verhältnis eines Amplitudenwertes bei einer Frequenz korrespondierend mit einem reziproken Wert des Zeitintervalls zu einer Gleichstromkomponente der Amplitudenspektrum-Verteilung.

[0037] Das optionale Immunoassay-System kann eine Konfiguration aufweisen, in welcher das Auswertemittel beurteilt, dass kein Zonen-Phänomen in die Reaktion in dem Messmittel aufgetreten ist, falls

das Verhältnis größer ist als ein Referenzwert, erhalten aus entsprechenden Verteilungen einer Reaktion, in welcher kein Zonen-Phänomen aufgetreten ist und einer Reaktion, in welcher das Zonen-Phänomen auftritt und dass das Zonen-Phänomen in der Reaktion in dem Messmittel aufgetreten ist, falls das Verhältnis geringer als der Referenzwert ist.

[0038] Das Zeit-Intervall kann von einer Zeit stammen, bevor die spezifisch bindende Substanz und die Probenlösung vermischt werden bis zu einer Zeit, wenn die Veränderung der Größe des optischen Parameters substantiell konstant wird, nachdem die Reaktion substantiell gesättigt ist. In diesem Fall ist es bevorzugt, dass das Auswertemittel beurteilt, dass kein Zonen-Phänomen in der Reaktion aufgetreten ist, falls ein Unterschied zwischen einem Amplitudenwert bei einer Frequenz korrespondierend mit einem reziproken Wert eines Zeit-Intervalls von einer Zeit, zu der die spezifisch bindende Substanz und die Probenlösung vermischt werden bis zu einer Zeit, wenn eine Reaktion in dem Reaktionssystem gesättigt worden ist, eine positive Zahl ist und das Zonen-Phänomen in der Reaktion aufgetreten ist, falls die Differenz eine negative Zahl ist.

[0039] Desweiteren kann das optionale Immunoassay-System desweiteren ein Mittel zur Quantifikation enthalten, verknüpft mit dem Mittel zur Messdatenverarbeitung, zum Quantifizieren einer Konzentration der zu messenden Substanz, basierend auf der Form der Amplitudenspektrum-Verteilung.

[0040] Das Quantifizierungsmittel zum Quantifizieren der Konzentration der Substanz, welche gemessen werden soll, kann die Konzentration der Substanz, welche gemessen werden soll, quantifizieren, basierend auf dem Amplitudenwert der Gleichstromkomponente der Amplitudenspektrum-Verteilung.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0041] [Fig. 1](#) ist ein Flussdiagramm, welches die entsprechenden Schritte eines Immunoassay-Verfahrens gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung illustriert.

[0042] [Fig. 2A](#) ist ein Graph, welcher diskrete Messdaten für die Veränderung einer Größe eines optischen Parameters in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zeigt; und [Fig. 2B](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung in der Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zeigt.

[0043] [Fig. 3](#) ist eine schematische Ansicht, welche die Konfiguration eines Immunoassay-Systems gemäß der Ausführungsform der vorliegenden Erfindung illustriert.

[0044] [Fig. 4](#) ist ein Graph, welcher die Ergebnisse

des Plottens von Mittelwerten von Messwerten zeigt, erhalten von zwischen 150 Sekunden, wenn die Immunreaktion hinreichend gesättigt ist, bis zu 200 Sekunden bei Messungen von menschlichen Albuminlösungen durch Immunonephelometrie gemäß einem Beispiel der vorliegenden Erfindung.

[0045] [Fig. 5](#) ist ein Graph, welcher die Veränderungen mit der Zeit einer Streulicht-Intensität zeigt, erhalten in Messungen von menschlichen Albuminlösungen in einem Beispiel der vorliegenden Erfindung.

[0046] [Fig. 6](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation auf Veränderungen mit der Zeit in gestreuten Lichtintensitäten zeigt, erhalten in Messungen einer menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 5 mg/dl.

[0047] [Fig. 7](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation auf Veränderungen mit der Zeit in gestreuten Lichtintensitäten zeigt, erhalten in Messungen einer menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 10 mg/dl.

[0048] [Fig. 8](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation auf Veränderungen mit der Zeit in gestreuten Lichtintensitäten zeigt, erhalten in Messungen einer menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 20 mg/dl.

[0049] [Fig. 9](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation auf Veränderungen mit der Zeit in gestreuten Lichtintensitäten zeigt, erhalten in Messungen einer menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 30 mg/dl.

[0050] [Fig. 10](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation auf Veränderungen mit der Zeit in gestreuten Lichtintensitäten zeigt, erhalten in Messungen einer menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 50 mg/dl.

[0051] [Fig. 11](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation auf Veränderungen mit der Zeit in gestreuten Lichtintensitäten zeigt, erhalten in Messungen einer menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 100 mg/dl.

[0052] [Fig. 12](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation auf Veränderungen mit der Zeit in gestreuten Lichtintensitäten zeigt, erhalten in Messungen einer menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 200 mg/dl.

[0053] [Fig. 13](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation auf Veränderungen mit der Zeit in gestreuten Lichtintensitäten zeigt, erhalten in Messungen einer menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 300 mg/dl.

[0054] [Fig. 14](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation auf die jeweiligen Veränderungen mit der Zeit in gestreuten Lichtintensitäten zeigt, erhalten in Messungen von menschlichen Albuminlösungen mit einer menschlichen Albumin-Konzentrationen von 5 mg/dl und 300 mg/dl.

[0055] [Fig. 15](#) ist ein Graph, welcher die entsprechenden Veränderungen mit der Zeit an Streulicht-Intensitäten in Messungen von menschlichen Albuminlösungen zeigt, mit menschlichen Albumin-Konzentrationen von 5 mg/dl und 300 mg/dl.

[0056] [Fig. 16](#) ist ein Graph, welcher die Ergebnisse zeigt, erhalten durch Zugabe von zufälligem Rauschen zu den Messdaten in Zeitintervallen von [Fig. 15](#).

[0057] [Fig. 17](#) ist ein Graph, welcher die Ergebnisse zeigt, erhalten durch Verschieben der Messdaten von [Fig. 15](#) um 0,5 Sekunden, um einen Unterschied zu erzeugen.

[0058] [Fig. 18](#) ist ein Graph, welcher die Ergebnisse zeigt, erhalten durch Verschieben der Messdaten von [Fig. 16](#) um 0,5 Sekunden, um einen Unterschied zu erzeugen.

[0059] [Fig. 19](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung zeigt, erhalten durch Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation auf die Messdaten von [Fig. 16](#) in dem Fall, wo zufälliges Rauschen hinzugefügt worden ist.

[0060] [Fig. 20A](#) und [Fig. 20B](#) sind schematische Darstellungen, welche eine Reaktion eines Antigens und eines Antikörpers illustrieren in einem Reaktionssystem verwendet in einem homogenen Immunoassay-Verfahren.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0061] In einem Immunoassay-Verfahren, verwendet zum Messen des Gehalts einer Substanz, welche in einer Probe gemessen werden soll, wird die zu messende Substanz in Reaktion mit einer spezifisch bindenden Substanz gebracht, welche in der Lage ist, spezifisch eine Substanz, die gemessen werden soll, zu binden, die Größe der Veränderung an optischen Charakteristika während der Reaktion wird gemessen und die Größe der zu messenden Substanz wird aus den Messergebnissen berechnet.

(Erstes Immunoassay-Verfahren)

[0062] Im folgenden wird ein erstes Immunoassay-Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung unter Verweis auf die [Fig. 1](#) und [2](#) beschrieben. [Fig. 1](#) ist ein Flussdiagramm, welches die entsprechenden Schritte des ersten Immunoassay-Verfahrens dieser Ausführungsform beschreibt. [Fig. 2A](#) ist ein Graph, welcher die diskreten Messdaten für eine optische Veränderungsgröße zeigt. [Fig. 2B](#) ist ein Graph, welcher eine Amplitudenspektrum-Verteilung zeigt. In [Fig. 2B](#) wird der Kehrwert eines Zeitintervalls (einer Periode) diskret Fourier-transformiert und durch f als eine Fundamental-Frequenz repräsentiert. Es sollte festgehalten werden, dass die Kombination der Substanz, die gemessen werden soll, und der spezifisch bindenden Substanz die Kombination aus Antigen und Antikörper ist.

[0063] In dem ersten Immuno-Assay-Verfahren der vorliegenden Erfindung wird zunächst im Schritt St1 (von [Fig. 1](#)), welcher mit dem Schritt e in den Ansprüchen korrespondiert, ein Reaktionssystem einschließend nur einen Vertreter der Substanz, welche gemessen werden soll, und der spezifisch bindenden Substanz (fragliche Substanz), konstruiert und die Messung der Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems wird gestartet. In diesem Fall ist der Grund, warum das Reaktionssystem nur einen Vertreter der Substanz, welche gemessen werden soll, und der spezifisch bindenden Substanz einschließt, dass die spezifisch bindende Substanz zu der Substanz, welche gemessen werden soll, später hinzugegeben werden kann, oder die Substanz, welche gemessen werden kann, zur spezifisch bindenden Substanz später hinzugegeben werden kann.

[0064] Als nächstes wird im Schritt St2 (welche mit dem Schritt a) in den Ansprüchen korrespondiert), das Mischen der Substanz, welche gemessen werden soll, und der spezifisch bindenden Substanz gestartet, um Veränderungen mit der Zeit in der Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems werden als diskrete Messdaten erhalten. Es sollte festgehalten werden, dass die "Ver-

änderung der Größe des optischen Parameters", genauer gesagt, die Intensität des gestreuten Lichts oder die Größe der Veränderung an gestreutem Licht ist und die Messung der Veränderung der Größe des optischen Parameters durchgeführt wird mit einer konstanten Probenname-Periode. In dem Fall, wo das Reaktionssystem die zu messende Substanz einschließt, wird die spezifisch bindende Substanz zum Reaktionssystem hinzugegeben, und in dem Fall, in welchem das Reaktionssystem die spezifisch bindende Substanz einschließt, wird die zu messende Substanz zum Reaktionssystem hinzugegeben.

[0065] Durch die Schritte St1 und St2, wie oben beschrieben, werden beispielsweise Messdaten für die Veränderung der Größe des optischen Parameters, wie in [Fig. 2A](#) gezeigt, erhalten. Es sollte festgehalten werden, dass die Messdaten für die Veränderung der Größe des optischen Parameters gemäß [Fig. 2A](#) durch eine Linie, welche die diskreten Messergebnisse erhalten zu den Messzeiten verbindet, angezeigt werden.

[0066] In dem Immunoassay-Verfahren dieser Ausführungsform ist, wenn die zu messende Substanz ein Antigen ist, die spezifisch bindende Substanz ein Antikörper und wenn die zu messende Substanz ein Antikörper ist, die spezifisch bindende Substanz ein Antigen. Im Schritt St1 wird zu der Zeit, wenn das Reaktionssystem nur einen Vertreter der zu messenden Substanz und der spezifisch bindenden Substanz einschließt, kein Verklumpungs-Komplex resultierend aus einer Antigen-Antikörper-Reaktion aus der zu messenden Substanz und der spezifisch bindenden Substanz in dem Reaktionssystem erzeugt. Im Gegensatz dazu wird in Schritt St2, wenn die zu messende Substanz und die spezifisch bindende Substanz vermischt werden, ein Verklumpungs-Komplex resultierend aus einer Antigen-Antikörper-Reaktion der zu messenden Substanz und der spezifisch bindenden Substanz beginnen, in dem Reaktionssystem ausgebildet zu werden.

[0067] Wenn Verklumpungs-Komplexe in dem Reaktionssystem in Schritt St2 erzeugt werden, tritt eine Trübung in dem Reaktionssystem auf, so dass die Veränderung der Größe des optischen Parameters beispielsweise der Intensität an gestreutem Licht bzw. der Menge an transmittiertem Licht variiert. Folglich kann durch Messen der Veränderung der Größe des optischen Parameters, der Grad der Trübung des Reaktionssystems abgeschätzt werden. Es sollte festgehalten werden, dass als eine Referenz für die Abschätzung die Veränderung der Größe des optischen Parameters, wenn das Reaktionssystem nur einen Vertreter der zu messenden Substanz und der spezifisch bindenden Substanz einschließt, d.h. die Menge der Veränderung an der gestreuten Lichtintensität oder die Menge der Veränderung von der transmittierten Lichtmenge, vorzugsweise ge-

messen wird.

[0068] Als nächstes wird im Schritt St3 von [Fig. 1](#), (welcher mit dem Schritt b) in den Ansprüchen korrespondiert), in den erhaltenen Messdaten ein Zeitintervall, einschließlich eine Zeit, zu welcher eine Steigerungsrate der Veränderung der Größe des optischen Parameters (d.h. die Reaktionsrate) ein Maximum annimmt, ausgewählt. Genauer gesagt, wird in [Fig. 2A](#) ein Zeitintervall $d_2 + d_3$ ausgewählt.

[0069] Als nächstes wird im Schritt St4 von [Fig. 1](#) (welcher mit dem Schritt c) in den Ansprüchen korrespondiert) in dem ausgewählten Zeitintervall $d_2 + d_3$, von dem angenommen wird, dass es eine Periode einer periodischen Funktion ist, eine diskrete Fourier-Transformation durchgeführt auf die diskreten Messdaten der Veränderung der Größe des optischen Parameters in dem ausgewählten Zeitintervall $d_2 + d_3$, wodurch beispielsweise die Amplitudenspektrum-Verteilung von [Fig. 2B](#) erhalten wird.

[0070] Als nächstes wird im Schritt St5 von [Fig. 1](#), (welche mit dem Schritt d) in den Ansprüchen korrespondiert) beurteilt, ob ein Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem in Schritt St2 aufgetreten ist oder nicht, basierend auf der Form der Amplitudenspektrum-Verteilung. Genauer gesagt, wird in diesem Fall die Form der Amplitudenspektrum-Verteilung in dem Fall, wo das Zonen-Phänomen nicht aufgetreten ist, in dem Reaktionssystem im Voraus als eine "Referenzform" erhalten und anschließend wird die Beurteilung durchgeführt durch Vergleich der Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten in Schritt St4 mit der Referenzform. Das Beurteilungsverfahren wird im Detail später in Beispiel 4 beschrieben. Es sollte festgehalten werden, dass in diesem Schritt, die Form der Amplitudenspektrum-Verteilung mit dem bloßen Auge oder unter Verwendung eines Computers beurteilt werden kann. Darüber hinaus kann die Konzentration der zu messenden Substanz gemessen werden basierend auf einem Amplitudenwert einer Gleichstromkomponente in der Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten in Schritt St4.

[0071] Durch Durchführen der oben beschriebenen Schritte kann der Gehalt (Konzentration) der zu messenden Substanz erhalten werden. Genauer gesagt, kann gemäß dem Immunoassay-Verfahren dieser Ausführungsform die Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems gemessen werden, während beurteilt wird, ob das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem aufgetreten ist oder nicht. Folglich wird ein Wert für den Gehalt (Konzentration) der zu messenden Substanz, erhalten basierend auf der Veränderung der Größe des optischen Parameters, höchst verlässlich sein.

[0072] Darüber hinaus kann gemäß dem Immunoassay-Verfahren dieser Ausführungsform die Verän-

derung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems gemessen werden, während beurteilt wird, ob das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem aufgetreten ist, oder nicht. Dementsprechend ist es nicht notwendig, eine Vielzahl von Messungen durchzuführen und ebenso nicht notwendig, eine Vielzahl von Reaktionsgefäßen für jede Probenlösung herzustellen. Folglich können die Messprozeduren sehr einfach gehalten werden.

[0073] Darüber hinaus wird in dem Immunoassay-Verfahren dieser Ausführungsform eine Fourier-Transformation durchgeführt. Folglich kann für eine Veränderung in den Messdaten Rauschen als ein hochfrequentes Signal betrachtet werden und ein Signal aufgrund der Veränderung in den Messdaten kann abgetrennt werden von einem Signal aufgrund von Rauschen. Dementsprechend wird das Immunoassay-Verfahren dieser Ausführungsform kaum durch Rauschen beeinflusst werden. Folglich kann gemäß dieser Ausführungsform ein einfaches und hochverlässliches Immunoassay-Verfahren bereitgestellt werden.

[0074] Es sollte festgehalten werden, dass es in dem Immunoassay-Verfahren dieser Ausführungsform bevorzugt ist, dass die Veränderung der Größe des optischen Parameters die Größe der Veränderung in der gestreuten Lichtintensität oder die Größe der Veränderung in der transmittierten Lichtmenge ist. Dies liegt daran, dass Immunoturbidimetrie zum Messen einer Veränderung in der Menge des transmittierten Lichts sowie Immunonephelometrie zur Messung einer Veränderung in der Menge an gestreutem Licht, welche von der Erzeugung eines Antigen-Antikörper-Verklumpungs-Komplexes abhängig sind, geeignet, durch das Zonen-Phänomen beeinflusst zu werden und folglich große Effekte erzielt werden können mit der Verwendung von Assaytechniken dieser Ausführungsform.

[0075] Darüber hinaus ist es bevorzugt, dass beide der Zeitintervalle d_2 und d_3 , ausgewählt im Schritt St3 ein Zeitintervall darstellen, bestimmt basierend auf Messdaten für die Veränderung der Größe des optischen Parameters für den Fall, wo das Zonen-Phänomen nicht aufgetreten ist. Genauer gesagt ist es bevorzugt, dass ein Zeitintervall, erhalten durch Nicht-Messen einer Reaktionszeit eines Reaktionssystems, welches zu messen ist, sondern durch Im-Voraus-Messen einer Reaktionszeit für den Fall, wo kein Zonen-Phänomen auftritt, verwendet wird für jedes der beiden von d_2 und d_3 . Dies liegt daran, dass Messdaten in dem Fall, wo das Zonen-Phänomen nicht aufgetreten ist, eine klare Information zeigen, wie z.B. eine Zeit, zu welcher die Steigerungsrate (Reaktionsrate) der Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems sein Maximum erreicht und eine Zeit, an welcher eine Antigen-Antikörper-Reaktion gesättigt ist, im Vergleich

zu Messdaten für den Fall, wo einen Zonen-Phänomen aufgetreten ist, und hochstabil sind, so dass die Auswahl einer Referenzposition auf einfachere Art und Weise bei der Zeitintervall-Auswahl durchgeführt werden kann.

[0076] Genauer gesagt, ist das Zeitintervall d_2 und d_3 für die Messdaten, ausgewählt, basierend auf den Messdaten für die Veränderungen der Größe des optischen Parameters in dem Fall, wo das Zonen-Phänomen nicht aufgetreten ist, bevorzugt ein Zeitintervall von einer Zeit, zu der die spezifisch bindende Substanz und eine Probenlösung vermischt werden, (d.h. eine Zeit, wenn eine Reaktion gestartet wird) bis zu einer Zeit, zu der, nachdem die Reaktion substantiell gesättigt worden ist, die Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems substantiell konstant wird. Folglich kann ein diskretes Fourier-transformiertes Spektrum, welches einen Unterschied zwischen den Messdaten, für den Fall, in welchem das Zonen-Phänomen nicht aufgetreten ist, und den Messdaten für den Fall, in dem das Zonen-Phänomen aufgetreten ist, erhalten werden, so dass klarer beurteilt werden kann, ob das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem in Schritt St2 aufgetreten ist oder nicht.

[0077] Es sollte festgehalten werden in dieser Beschreibung und den Ansprüchen, dass die Veränderung der Größe des optischen Parameters in dem Begriff "die Veränderung der Größe des optischen Parameters (des Reaktionssystems) wird substantiell konstant" die Veränderung der Größe des optischen Parameters in dem Zeitintervall d_3 von [Fig. 2A](#) bedeuten soll und die Bezeichnung "die Veränderung der Größe des optischen Parameters (des Reaktionssystems) wird substantiell konstant" nicht nur den Fall einschließt, wo eine gemessene Veränderung der Größe des optischen Parameters konstant ist, sondern auch den Fall, wo die Veränderung der Größe des optischen Parameters in einer Größenordnung verändert wird, mit welcher, die Veränderung klarer als anders erkannt werden kann, verglichen mit der Veränderung der Größe des optischen Parameters in dem Zeitintervall d_2 von [Fig. 2A](#). Darüber hinaus soll in dieser Beschreibung in den Ansprüchen eine Zeit, zu welcher "die Reaktion substantiell gesättigt ist", genau eine Zeitgrenze bedeuten, zwischen dem Zeitintervall d_2 und dem Zeitintervall d_3 in [Fig. 2A](#) und auch zum Teil die Zeit, zu der die größte Veränderung der Steigung des Graphen, welcher die Veränderung der Größe des optischen Parameters anzeigt, beobachtet wird.

[0078] Darüber hinaus wird in Schritt St5 in der diskreten Fourier-transformierten Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten in Schritt St4, vorzugsweise beurteilt, ob eine Antigen-Antikörper-Reaktion in einer Zonenregion aufgetreten ist, oder nicht, basierend auf der Veränderung des Amplitudenwertes ei-

ner Gleichstromkomponente mit Blick auf die Frequenz. Amplitudenwerte in der Amplitudenspektrum-Verteilung reflektieren merklich Unterschiede in den Anstiegen einer Reaktionskurve, repräsentierend eine immunologische Reaktion. Folglich kann in einer einfachen Art und Weise beurteilt werden, ob das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem in Schritt St2 aufgetreten ist oder nicht.

[0079] Darüber hinaus wird die Konzentration der Substanz, welche gemessen werden soll, vorzugsweise gemessen, basierend auf dem Amplitudenwert einer Gleichstromkomponente in der Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten in Schritt St4. Folglich kann der Einfluss des Rauschens auf die Messdaten reduziert werden und desweiteren können diskrete Fourier-transformierte Daten effizient verwendet werden.

(Zweites Immunoassay-Verfahren)

[0080] Als nächstes wird, anders als im ersten Immunoassay-Verfahren, der Fall, wo das Zeitintervall von der Zeit, in der eine Reaktion gestartet wird, bis zu der Zeit, wonach die Reaktion substantiell gesättigt ist, und die Veränderung der Größe des optischen Parameters substantiell konstant wird, (d.h. im Zeitintervall $d_2 + d_3$ dargestellt in [Fig. 2A](#)) nicht ausgewählt, sondern ein Zeitintervall von der Zeit, vor der eine spezifische Bindungssubstanz und die Probenlösung vermischt werden (d.h. eine Zeit, bevor eine Reaktion gestartet wird), bis zu der Zeit, nach der die Reaktion substantiell gesättigt ist, und die Veränderungen der Größe des optischen Parameters substantiell konstant wird, ausgewählt als ein Zeitintervall und dies wird im folgenden beschrieben.

[0081] In diesem Fall wird die gleiche Messung, wie diejenige in dem ersten Immunoassay-Verfahren durchgeführt in den Schritten St1 und St2 von [Fig. 1](#) und das Zeitintervall $d_1 + d_2 + d_3$ wird in Schritt St3 ausgewählt, und eine diskrete Fourier-Transformation wird durchgeführt, wobei angenommen wird, dass das Zeitintervall $d_1 + d_2 + d_3$ eine Periode darstellt, um eine Amplitudenspektrum-Verteilung zu erhalten. Anschließend kann im Schritt St5, basierend auf einem Wert, erhaltend durch Abziehen eines Amplitudenwertes bei einer Frequenz ($1/d_2 + d_3$) korrespondierend mit dem Kehrwert einer Summe ($d_2 + d_3$) des Zeitintervalls (d_2) von der Zeit, wenn eine Antigen-Antikörper-Reaktion gestartet wird und der Zeit, bei der die Reaktion substantiell gesättigt ist, und dem Zeitintervall (d_3), von der Zeit, wenn die Reaktion substantiell gesättigt ist, bis zu der Zeit, wenn die Veränderung der Größe des optischen Parameters substantiell konstant wird aus einem Amplitudenwert bei einer Frequenz ($1/d_2$) korrespondierend mit dem reziproken Wert des Zeitintervalls von der Zeit, bei der eine Reaktion gestartet wird, bis zu der Zeit, bei der die Reaktion seine Sättigung erreicht (d.h. das Zeitinter-

vall d_2 von **Fig. 2**) beurteilt werden, ob die Antigen-Antikörper-Reaktion in der Zonenregion aufgetreten ist oder nicht. In diesem Fall wird, falls eine Differenz von $\{(1/d_2) - (1/d_2 + d_3)\}$ eine positive Zahl ist bewertet, dass kein Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem aufgetreten ist und falls der Unterschied eine negative Zahl darstellt, wird bewertet dass das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem aufgetreten ist. Folglich kann auf einfache Art und Weise bewertet werden, ob das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem aufgetreten ist oder nicht.

[0082] In diesem Fall wird angenommen, dass das Zeitintervall, von der Zeit, bevor die Reaktion gestartet wird, zu der Zeit, bei der die Reaktion gesättigt ist, ausgewählt wird. Falls die Auswahl eines Zeitintervalls so getroffen wird, dass ein jedes der Zeitintervalle d_1 , anzeigend ein Zeitintervall vor einer Reaktion, Zeitintervall d_2 , anzeigend ein Zeitintervall, in welche die Reaktionsrate erhöht wird, und Zeitintervall d_3 , anzeigend ein Zeitintervall, nachdem die Reaktion gesättigt ist, so definiert ist, dass sie alle die gleiche Länge haben, kann ein Wert für die Differenz klarer dargestellt werden.

(Immunoassay-System)

[0083] Als nächstes wird ein optionales Immunoassay-System in dem oben beschriebenen Immunoassay-Verfahren unter Verweis auf **Fig. 3** beschrieben werden. Wie in **Fig. 3** dargestellt, schließt ein Immunoassay-System **10** gemäß dieser Ausführungsform ein Mittel zum Messen **11** ein, ein Mittel zu Verarbeiten von Messdaten **12**, elektrisch verbunden mit dem Mittel zum Messen **11** sowie ein Mittel **13** zum Beurteilen/Quantifizieren, elektrisch verknüpft mit dem Mittel **12** zum Verarbeiten der Messdaten. Es sollte festgehalten werden, dass in dieser Beschreibung "Verknüpfung" oder "Verknüpfen" "eine elektrische Verknüpfung" oder "elektrisch Verknüpfen" bedeuten soll, solange nichts anderes angegeben wird.

[0084] Das Mittel zum Messen **11** soll angepasst sein an eine Messzelle **14** und geeignet sein zum Messen der Veränderung der Größe des optischen Parameters eines Reaktionssystems, konstruiert in der Messzelle **14**. Beispielsweise wird als Mittel **11** zum Messen ein System verwendet, welches das Messen der Größe der Veränderung an gestreuter Lichtintensität oder der Größe der Veränderung der transmittierten Lichtmenge als Veränderung der optischen Größe ermöglicht. Es sollte festgehalten werden, dass in dieser Ausführungsform das Mittel **11** zum Messen so erzeugt wurde, dass es eine Konfiguration enthält, in der die Messzelle **14** in das Mittel **11** zum Messen eingebracht wird, wenn die Messung durchgeführt wird. Jedoch ist die Konfiguration des Mittels **11** zum Messen nicht darauf limitiert, sondern kann eine Konfiguration sein, in welcher eine Mess-

zelle in dem Mittel **11** zum Messen angeordnet ist.

[0085] Das die Messdaten verarbeitende Mittel **12** wählt in den Messdaten, erhalten durch das Mittel zum Messen **11** ein Zeitintervall aus (beispielsweise das Zeitintervall $d_2 + d_3$ oder das Zeitintervall von $d_1 + d_2 + d_3$ in **Fig. 2A**), einschließlich eine Zeit, zu welcher die Steigerungsrate der Veränderung der Größe des optischen Parameters (d.h. die Reaktionsrate) einen maximalen Grad einnimmt und führt innerhalb eines ausgewählten Zeitintervalls D , von dem angenommen wird, dass es eine Periode einer periodischen Funktion ist, eine diskrete Fourier-Transformation für die diskreten Messdaten für die Veränderung der Größe des optischen Parameters in dem ausgewählten Zeitintervall $d_2 + d_3$ oder $d_1 + d_2 + d_3$ durch. Folglich wird beispielsweise die Amplitudenspektrum-Verteilung gemäß **Fig. 2B** erhalten.

[0086] Das Mittel **13** zum Auswerten/zur Quantifikation beurteilt, basierend auf der der Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch das die Messdaten verarbeitende Mittel **12**, ob das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem in der Messzelle **14** aufgetreten ist oder nicht und quantifiziert, falls bewertet wird, dass das Zonen-Phänomen nicht aufgetreten ist, die Konzentration der Substanz, die gemessen werden soll. Es sollte festgehalten werden, dass das Mittel zum Auswerten/zur Quantifikation **13** im vorhinein als "Referenzform" die Form der Amplitudenspektrum-Verteilung für den Fall speichert, in welchem das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem nicht aufgetreten ist und zwar in einem Zustand von elektronischen Daten im vorhinein, und dann eine Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch das die Messdaten verarbeitende Mittel **12** mit der Referenzform vergleicht, und dabei eine Auswertung durchführt. Darüber hinaus speichert das Mittel zur Auswertung/Quantifikation **13** im vorhinein einen mathematischen Ausdruck (eine Kalibrationskurve), in welchem Amplitudenwerte spezifischer Frequenzkomponenten gegen Konzentrationen der Substanz, welche gemessen werden soll, im Zustand von elektronischen Daten abgeglichen werden, um eine Quantifikation durchzuführen. Der Amplitudenwert einer spezifischen Frequenzkomponente, erhalten durch das die Messdaten verarbeitende Mittel **12** wird in dem mathematischen Ausdruck (der Kalibrationskurve) substituiert, wodurch die Konzentration der Substanz erhalten wird, die gemessen werden soll.

[0087] Die Messzelle **14** wird ausgebildet aus einem transparenten Material und kann eine Flüssigkeit im Inneren aufbewahren. Wenn eine Messung durchgeführt wird, wird ein Reaktionssystem in die Zellen injiziert und anschließend wird die Zelle in das Mittel zum Messen **11** eingebracht. Ein spezifisches Bindungssubstrat und eine Probenlösung werden vermischt, während die Veränderung der Größe des optischen Parameters fortschreitend gemessen wird in-

nerhalb eines konstanten Probenname-Intervalls.

[0088] Als nächstes wird die Operation des Immunoassay-Systems **10** dieser optionalen Ausführungsform beschrieben werden.

[0089] Zunächst wird eine zu messende Substanz oder eine spezifische Bindungssubstanz in die Messzelle **14** eingebracht, um ein Reaktionssystem zu konstruieren und anschließend wird die Messzelle **14** in das Mittel zum Messen **11** eingebracht.

[0090] Als nächstes wird in dem Mittel zum Messen **11** der Messung der Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems gestartet. In diesem Fall wird die Messung der Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems durchgeführt in einer konstanten Probenahme-Periode.

[0091] Nachfolgend wird die spezifische Bindungssubstanz, welche in der Lage ist, spezifisch an die Substanz, die gemessen werden soll, zu binden, mit einer Probenlösung vermischt, während die Messung der Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems voranschreitet, in der oben beschriebenen Probenahme-Periode durchgeführt zu werden. Als nächstes werden zeitliche Veränderungen in der Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems als diskrete Messdaten des Reaktionssystems als diskrete Messdaten für die Veränderung der Größe des optischen Parameters, erhalten (beispielsweise die Messdaten für die Veränderung der Größe des optischen Parameters, dargestellt in [Fig. 2A](#)).

[0092] Es sollte festgehalten werden, dass das Mittel zum Messen **11** vorzugsweise so ausgebildet wird, dass es eine Konfiguration aufweist, in welcher unter Verwendung des Reaktionssystems, einschließlich als Referenz nur entweder die zu messende Substanz oder die spezifisch bindende Substanz, die Veränderung der Größe des optischen Parameters des Reaktionssystems (beispielsweise die Menge der Veränderung der gestreuten Lichtintensität oder die Menge der Veränderung in der transmittierten Lichtmenge) gemessen wird.

[0093] Als nächstes wählt das Mittel zum Verarbeiten der Messdaten **12** in den Messdaten, erhalten durch das Mittel zum Messen **11**, ein Zeitintervall aus, einschließlich eine Zeit, zu welcher die Steigerungsrate der Veränderung der Größe des optischen Parameters (d.h. die Reaktionsrate) eingeschlossen ist. Genauer gesagt, werden in [Fig. 2A](#) das Zeitintervall $d_2 + d_3$ oder das Zeitintervalls $d_1 + d_2 + d_3$ ausgewählt.

[0094] Als nächstes nimmt das die Messdaten verarbeitende Mittel **12** an, dass das Zeitintervall $d_2 + d_3$ oder das Zeitintervall $d_1 + d_2 + d_3$, welches ausge-

wählt worden ist, eine Periode einer periodischen Funktion sei und führt eine diskrete Fourier-Transformation durch, um die Messdaten für die Veränderung des optischen Parameters im ausgewählten Zeitintervall $d_2 + d_3$ oder dem Zeitintervall $d_1 + d_2 + d_3$ zu separieren und dadurch eine Amplitudenspektrum-Verteilung entsprechend [Fig. 2B](#) zu erhalten.

[0095] Als nächstes bewertet das Auswerte-/Quantifikationsmittel **13**, basierend auf der Form der Amplitudenspektrum-Verteilung, erhalten durch das die Messdaten verarbeitende Mittel **12**, ob das Zonen-Phänomen im Reaktionssystem in der Messzelle **14** aufgetreten ist oder nicht und darüber hinaus wird die Konzentration der zu messenden Substanz quantifiziert.

[0096] Mit dem Immunoassay-System dieser optionalen Ausführungsform kann die Veränderung der Größe des optischen Parameters eines Reaktionssystems gemessen werden, während ausgewertet wird, ob das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem aufgetreten ist oder nicht. Dementsprechend ist die Verlässlichkeit eines numerischen Wertes für den Gehalt (die Konzentration) einer Substanz, welche gemessen werden soll, erhalten durch die Veränderung der Größe des optischen Parameters, sehr hoch. Folglich kann gemäß dieser Ausführungsform eine einfache und hoch verlässliche immunologische Messung durchgeführt werden.

[0097] Es sollte festgehalten werden, dass ein Absorptiometer ein spezifisches Beispiel eines Mittels zum Messen **11** darstellt. Darüber hinaus wird das die Messdaten verarbeitende Mittel **12** vorzugsweise so ausgebildet, dass es eine Konfiguration aufweist, in welcher Messdaten von dem Mittel zum Messen **11** durch eine A/D-Konversion unter Verwendung einer A/D-Konversionseinheit erhalten werden.

[0098] Das Immunoassay-System **10** dieser optionalen Ausführungsform wird so ausgebildet, dass es eine Konfiguration aufweist, in welcher das die Messdaten verarbeitende Mittel **12** und das Auswerte-/Quantifizierungsmittel **13** separat zur Verfügung gestellt werden. Jedoch ist das Immunoassay-System **10** nicht darauf limitiert. Beispielsweise können das die Messdaten verarbeitende Mittel **12** und das Auswerte-/Quantifikations-Mittel ausgebildet werden unter Verwendung von Software und einem Computer. Darüber hinaus können das die Messdaten verarbeitende Mittel **12** und das Auswerte-/Quantifizierungsmittel **13** ausgebildet werden unter Verwendung eines Schaltkreiselements, wie z.B. eines DSP (digital signal processor).

[0099] Wenn ein Computer als Messdaten verarbeitendes Mittel **12** verwendet wird, kann eine Konfiguration eingesetzt werden, in welcher eine ausgewählte Referenz und eine Größenordnung eines Zeitinter-

valls in dem Messdaten verarbeitenden Mittel **12** zufällig durch den Anwender per Software spezifiziert werden.

[0100] Darüber hinaus wird, wenn das die Messdaten verarbeitende Mittel **12** ein Computer ist und die Messung durchgeführt wird unter Verwendung einer spezifischen Probenlösung, eine Konfiguration, in welcher ein Zeitintervall, welches durch das Messdaten verarbeitende Mittel **12**, wie z.B. ROM oder RAM, gespeichert werden kann, vorzugsweise verwendet.

[0101] In diesem Fall ist das Zeitintervall, welches gespeichert werden soll, vorzugsweise ein Zeitintervall, basierend auf den Messdaten der Veränderung der Größe des optischen Parameters, in dem Fall, wo das Zonen-Phänomen nicht aufgetreten ist.

[0102] Wenn ein Computer als Auswertungs-/Quantifizierungsmittel **13** eingesetzt wird, kann eine Konfiguration, in welcher eine Referenzform, verwendet zur Beurteilung des Zonen-Phänomens zufällig durch einen Anwender per Software eingestellt wird, verwendet werden.

[0103] Darüber hinaus wird, wenn das Auswertungs-/Quantifizierungsmittel **13** ein Computer ist und die Messung durchgeführt wird unter Verwendung einer spezifischen Probenlösung eine Konfiguration, in welcher die Referenzform in einem Speicher, wie ROM oder RAM gespeichert werden kann, vorzugsweise eingesetzt. Darüber hinaus ist die Referenzform vorzugsweise eine Amplitudenspektrum-Verteilung, einschließlich die entsprechenden Amplitudenwerte bei verschiedenen Frequenzen.

[0104] Wie für das Immunoassay-Verfahren dieser Ausführungsform beschrieben wurde, ist es nicht notwendig, eine Vielzahl von Messungen durchzuführen, bzw. eine Vielzahl von Reaktionsgefäßen für jede Probenlösung herzustellen. Darüber hinaus ist eine langweilige Messung nicht notwendig. Dementsprechend können Messprozeduren und eine Systemkonfiguration sehr einfach gestaltet werden.

[0105] Genauer gesagt kann in dem Immunoassay-Verfahren dieser Ausführungsform durch Messen unter Verwendung von Licht mit einer Wellenlänge beurteilt werden, ob das Zonen-Phänomen ausgelöst wurde oder nicht. Dementsprechend wird eine Systemkonfiguration einfach und Messprozess-Schritte werden nicht schwierig werden. Darüber hinaus wird Fourier-Transformation verwendet, so dass für eine Veränderung in den Messdaten, Rauschen als ein hochfrequentes Signal betrachtet werden kann und ein Signal aufgrund einer Veränderung in den Messdaten und ein Signal aufgrund von Rauschen unterschieden werden können. Folglich ist der Immunoassay dieser Ausführungsform kaum durch Rauschen beeinflusst.

(Beispiele)

[0106] Im folgenden wird die vorliegende Erfindung beschrieben unter Verwendung von Beispielen, jedoch ist die vorliegende Erfindung nicht auf diese Beispiele limitiert.

- Beispiel 1 -

[0107] Im folgenden wird ein Beispiel der spezifischen Konfiguration des Immunoassays **10**, dargestellt in der oben beschriebenen Ausführungsform, beschrieben werden. Es sollte festgehalten werden, dass in diesem Beispiel eine Beschreibung getroffen wird unter Verwendung des zweiten Immunoassay-Verfahrens (in welchem das Zeitintervall $d_1 + d_2 + d_3$ ausgewählt wird) auf das erste und zweite Immunoassay-Verfahren, wie oben beschrieben.

[0108] In diesem Beispiel ist das Mittel zum Messen **11** so konfiguriert, dass es folgende Konfiguration aufweist. Ein Halbleiterlaserpointer (MLXS-D-12-680-35 verfügbar von Kiko Giken) geeignet zur Ausgabe einer Ausgabeleistung von 15 mW Laserlicht, moduliert bei 270 Hz und mit einer Wellenlänge von 680 nm wird als Lichtquelle verwendet und eine Silizium-Fotodiode für eine sichtbare bis infrarote Strahlungspräzisions-Fotometrie (S2387-66R verfügbar von Hamamatsu Photonics) wird als ein Detektor eingesetzt. Als eine Messzelle wird eine Messzelle ausgebildet aus 0,1 cm dicken optischen Glasplatten, welche miteinander verschmolzen sind und eine reguläre quadratische Prismenform aufweisen mit einer Kapazität von ungefähr 200 μ l verwendet. Was die Anordnung sowohl von Lichtquelle, Detektor als auch Messzelle betrifft, so ist die Messzelle in einem Abstand von 0,5 cm von der Lichtquelle entfernt, so dass eine Oberfläche der Messzelle vertikal zur optischen Achse des einfallenden Lichtes von einer Lichtquelle lokalisiert ist und der Detektor in einem Abstand von 5,5 cm von der Messzelle in der Richtung lokalisiert ist, in welcher der Detektor und die Lichtquelle einen Winkel von 90° mit Blick auf die Messzelle einnehmen. Zwischen den Detektor und der Zelle wird ein Schatten gebender Zylinder bereitgestellt, so dass kein Streulicht auf den Detektor fällt. Ein elektrisches Stromsignal, abhängig von der Menge an Licht, nachgewiesen durch den Detektor, wird so amplifiziert, dass es ein hundertfach großes Voltsignal durch einen Strom-Spannungs-Konversionsschaltkreis (10^6 V/A) und eines Amplifikationsschaltkreises unter Verwendung eines operationalen Verstärkers, phasensensitiv über einen Lock-in-Verstärker (5610B verfügbar von NF Corporation) ergibt, und dann in einen Computer in regelmäßigen Intervallen durch GPIB-Steuerung übertragen wird. In diesem Beispiel ist ein Probennahme-Intervall auf 0,5 Sekunden eingestellt.

[0109] Das die Messung verarbeitende Mittel **12**

wird so ausgebildet, dass es die folgende Konfiguration aufweist. In diesem Beispiel ist ein auszuwählendes Zeitintervall so eingestellt, dass das Zeitintervall innerhalb eines Bereiches liegt vor einer Zeit, bevor eine Reaktion gestartet wird, bis zu einer Zeit, wenn eine bestimmte Zeit nachdem die Reaktion gesättigt worden ist, abgelaufen ist, und so, dass die Datenlänge, bevor die Reaktion gestartet wird, während die Reaktion verstärkt wird und die Datenlänge, nachdem die Reaktion gesättigt ist, substantiell gleich sind. Für eine Antigen-Antikörper-Reaktion, wie sie später in Beispiel 2 beschrieben wird, wurden Probenahme-Daten aus 64 Punkten in einem Zeitintervall von 10 Sekunden erhalten vor einem Start einer Reaktion bis 22 Sekunden nach dem Start der Reaktion. Die erhaltenen Daten wurden als periodisches Signal angenommen mit einer Periode von 32 Sekunden und einer Frequenz von 0,03125 Hz und eine diskrete Fourier-Transformation mit Microsoft Excel (verfügbar von Microsoft) wurde durchgeführt, wodurch eine Amplitudenspektrum-Verteilung erhalten wurde.

[0110] Als Auswertungsmittel in dem Mittel zur Auswertung-/Quantifikation **13**, wurde ein Verfahren eingesetzt, in welchem eine Substanz, welche gemessen werden sollte und eine spezifische Bindungssubstanz vermischt werden und ein Amplitudenwert bei einer Frequenz, korrespondierend mit dem Kehrwert ($1/d_2$) des Zeitintervalls (da in [Fig. 2A](#)), von der Zeit, an welcher eine Reaktion gestartet wird, bis zu der Zeit, wann die Reaktion die Sättigung erreicht, wird mit dem Amplitudenwert verglichen, korrespondierend mit dem Kehrwert ($1/d_2 + d_3$) der Summe des Zeitintervalls (d_2 in [Fig. 2A](#)) von der Zeit, wenn eine Reaktion gestartet wird, bis zu der Zeit, wenn die Reaktion gesättigt wird und dem Zeitintervall (d_3 in [Fig. 2A](#)) von der Zeit, wenn die Reaktion substantiell gesättigt wird, bis zu der Zeit, wenn die Veränderung der Größe des optischen Parameters substantiell konstant wird. Genauer gesagt, wird ein Wert von $\{(\text{eine Amplitude bei } 0,0938 \text{ Hz}) - (\text{eine Amplitude bei } 0,0625 \text{ Hz})\}$, d.h. eine Differenz zwischen einer Amplitude bei einer Frequenz von 0,0938 Hz, korrespondierend mit einem Kehrwert von einem ungefähr 10 Sekunden-Intervall (d.h. da) und einer Amplitude bei einer Frequenz von 0,625 Hz, korrespondierend mit dem Kehrwert von ungefähr einem 15 Sekunden-Intervall (d.h. $d_2 + d_3$) durch Berechnung erhalten, um auszuwerten, dass das Zonen-Phänomen nicht aufgetreten ist, falls der Wert eine positive Zahl ist und dass das Zonen-Phänomen nicht aufgetreten ist, falls der Wert eine e negative Zahl ist.

[0111] Darüber hinaus wird als Quantifizierungsmittel ein Verfahren eingesetzt, in welchem die Quantifizierung durchgeführt wird unter Verwendung eines Amplitudenwertes einer Gleichstromkomponente in einer Amplitudenspektrum-Verteilung. Genauer gesagt wird der Amplitudenwert des Gleichstroms, er-

halten durch die Messung der Substanz, welche gemessen werden soll, in einen mathematischen Ausdruck substituiert (Kalibrationskurve), in welchem ein Amplitudenwert einer Gleichstromkomponente gegen die Konzentration der Substanz, welche gemessen werden soll, abgeglichen wird, wodurch die Konzentration der Substanz, welche gemessen werden soll, erhalten wird.

- Beispiel 2 -

[0112] In diesem Beispiel wird gezeigt werden, dass die Auswertung, beschrieben im ersten Beispiel, zutreffend ist. In diesem Fall wird eine Antigen-Antikörper-Reaktion verursacht unter Verwendung einer Substanz, welche gemessen werden soll, von welcher die Konzentration bekannt ist und eine Analyse wird durchgeführt, um zu bestätigen, bei welcher Konzentration das Zonen-Phänomen auftritt. Anschließend wird ein Vergleich durchgeführt zwischen den Amplitudenspektren in dem Fall, wo das Zonen-Phänomen aufgetreten ist und in dem Fall, wo das Zonen-Phänomen nicht aufgetreten ist. In diesem Fall wird ein Beispiel eines Immunoassay-Verfahrens beschrieben werden, in welchem die Substanz, welche gemessen werden soll, menschliches Albumin ist. Es sollte festgehalten werden, dass reines Wasser, filtriert durch Milli-Q SP TOC (verfügbar von Millipore) verwendet wird zum Herstellen einer Pufferlösung, wie unten beschrieben, od. dgl.. Darüber hinaus sollte festgehalten werden, dass Reagenzien, wie z.B. Salz und Pufferagentien, welche von Wako Pure Chemical Industries, Ltd. waren, eingesetzt wurden, solange nichts anderes angegeben wurde und ein Reagenz von First Grade-Reinheit verwendet wird für Polyethylenglykol 6000, wohingegen extra reine Grade für die anderen verwendet wurden. Ein Kaninchen-Antimensch-Albumin polyklonaler Antikörper (welcher hier im folgenden als ein "Antikörper" bezeichnet wird), wurde als Lösung erhalten durch Aufreinigen eines Antiserums, gesammelt von einem Kaninchen, immunisiert gegen menschliches Albumin, durch Protein A-Säulen-Chromatographie und anschließende Dialyse aus dem aufgereinigten Antiserum. Die Säule wurde mit stationärem Protein A-Gel von Amersham Pharmacia gefüllt. Eine Equilibations-Puffer-Lösung, zusammengesetzt aus 1,5 M Glycin und 3,0 M NaCl, pH 8,9 wurde zur Aufreinigung verwendet und eine Elution-Puffer-Lösung zusammengesetzt aus Zitronensäurelösung (0,1 M Zitronensäure, pH 4,0) wurde eingesetzt. Die eluierte Antikörper-Fraktion wurde in ein Dialysen-Gefäß eingefüllt mit einem fraktionellen Molekulargewicht von 10.000 und mehrmals dialysiert mit ungefähr einem hundertfachen Volumen einer Pufferlösung, zusammengesetzt aus 0,05 M 3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure (welche verfügbar ist von Dojin und hier im folgenden als "MOPS" bezeichnet wird), 0,15 M NaCl und 0,04 Gew.-% NaN_3 , pH 7,4, zur Ersetzung von Pufferkomponenten. Anschließend wurde die Anti-

körperkonzentration durch 280 nm Absorptionsmessung abgeschätzt und mit der gleichen Pufferlösung wie derjenigen, eingesetzt zur Dialyse, eingestellt, um eine Antikörperkonzentration von 3,0 mg/ml zu erhalten.

[0113] Menschliche Albuminlösungen wurden hergestellt, so dass sie menschliche Albumin-Konzentrationen von 0, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, und 300 mg/dl aufwiesen und zwar durch Auflösen unter Verwendung von menschlicher Albumin-(verfügbar von Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) Lösung (d.h. eine Probenlösung) als das Antigen und mit der gleichen Pufferlösung, wie derjenigen, verwendet für die Dialyse. Pufferlösungen mit einer Zusammensetzung von 0,05 M MOPS und 4 Gew.-% Polyethylenglykol 6.000, pH 7,4 wurden zur Messung eingesetzt.

[0114] Für jede Pufferlösung wurden die Messungen von menschlichen Albuminlösungen mit entsprechenden Konzentrationen in der folgenden Art und Weise durchgeführt. Jedes Reaktionssystem weist eine Zusammensetzung von 160 µl an Pufferlösung auf, 9 µl an menschlicher Albuminlösung und 23 µl der Antikörperlösung. Folglich wird die letztendliche Konzentration des Antikörpers in dem Reaktionssystem ungefähr 0,11 mg/ml sein und die letztendliche Konzentration an menschlichem Albumin wird ein Wert sein, erhalten durch Multiplizieren der Konzentration der menschlichen Albuminlösung verwendet zur Herstellung mit 0,046.

[0115] Zunächst wurde die Pufferlösung und die menschliche Albuminlösung mit entsprechendem Volumina, wie oben beschrieben, vermischt durch Rühren in der Zelle des Immunoassay-Systems, konfiguriert in der oben beschriebenen Art und Weise, um damit ein Reaktionssystem herzustellen. Nachfolgend wurde die Antikörperlösung mit dem oben beschriebenen Volumen zum Reaktionssystem hinzugegeben und gerührt, um eine Antigen-Antikörper-Reaktion auszulösen. Die Messung des Streulichts wurde 10 Sekunden vor der Zugabe von Antikörperlösung gestartet und in Intervallen von 0,5 Sekunden für 200 Sekunden durchgeführt. Die Messwerte wurden als Volt-Werte erhalten. Um den Einfluss der Kontamination der Messzelle auf die Messung zu verhindern, wurde eine Korrektur durchgeführt mit einem Wert, gemessen durch Einführen von reinem Wasser in die Messzelle vor der Messung einer jeden Reaktion. Die Messung wurde durchgeführt bei Raumtemperatur (ungefähr 20°C).

[0116] [Fig. 4](#) ist ein Graph, welcher die Ergebnisse des graphischen Darstellens von Mittelwerten von Messwerten zwischen 150 Sekunden, wenn eine Immunreaktion hinreichend gesättigt worden ist, bis 200 Sekunden zeigt. Aus [Fig. 4](#) kann gesehen werden, dass die Messungen von menschlichen Albuminlösungen mit menschlichen Albumin-Konzentration

von 100 mg/dl oder mehr durch das Zonen-Phänomen beeinflusst wird.

[0117] [Fig. 5](#) ist ein Graph, welcher die Veränderungen mit der Zeit der gestreuten Lichtintensität, erhalten in Messungen von jeder menschlichen Albuminlösung zeigt. Diskrete Fourier-Transformationen zum Nachweis des Zonen-Phänomens wurde durchgeführt mit Messwerten, erhalten in der Messung.

[0118] [Fig. 6](#) bis [Fig. 13](#) sind graphische Darstellungen, welche Amplitudenspektrum-Verteilungen zeigen, welche erhalten wurden durch Durchführen von diskreter Fourier-Transformation auf Messdaten, erhalten aus Messungen von menschlichen Albuminlösungen mit entsprechenden menschlichen Albumin-Konzentrationen von 5 mg/dl bis 300 mg/dl.

[0119] Gemäß den ergebenden Verteilungen kann in allen menschlichen Albumin-Lösungen mit Konzentrationen von 5 mg/dl bis 50 mg/dl, in welchen das Zonen-Phänomen nicht aufgetreten ist, bestätigt werden, dass ein Wert von {(ein Amplitudenwert bei 0,0938 Hz)-ein Amplitudenwert bei 0,0625 Hz)} positiv ist. Darüber hinaus kann für jede der menschlichen Albuminlösungen mit entsprechenden menschlichen Albumin-Konzentrationen von 100 mg/dl bis 300 mg/dl, in welchen das Zonen-Phänomen aufgetreten ist, bestätigt werden, dass ein Wert von {(ein Amplitudenwert bei 0,0938 Hz)-(eine Amplitude bei 0,0625 Hz)} negativ ist. Tatsächliche Berechnungswerte waren 1,65 für die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 5 mg/dl, 3,37 für die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 10 mg/dl, 5,54 für die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 20 mg/dl, 5,80 für die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 30 mg/dl, 8,69 für die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 50 mg/dl, -0,962 für die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 100 mg/dl, -1,93 für die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 200 mg/dl, und -2,44 für die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 300 mg/dl.

[0120] [Fig. 14](#) ist ein Diagramm, welches einen Vergleich zwischen der Amplitudenspektrum-Verteilung der menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 5 mg/dl und einer Amplitudenspektrum-Verteilung der menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 300 mg/dl zeigt, welches substantiell die gleichen Veränderungen mit der Zeit zeigt, wie diejenigen, dargestellt in [Fig. 5](#). Wie aus [Fig. 14](#) ersichtlich ist, sind die entsprechenden Amplitudenwerte bei 0,0938 Hz und bei 0,0628 Hz invertiert zwi-

schen der Amplitudenspektrum-Verteilung der menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 5 mg/dl, in welcher das Zonen-Phänomen nicht auftritt und der menschlichen Albuminlösung mit einer Albumin-Konzentration von 300 mg/dl, in welcher das Zonen-Phänomen auftritt. Das heißt, ob der Wert von {(einem Amplitudenwert bei 0,0938 Hz)-(ein Amplitudenwert bei 0,0625 Hz)} positiv oder negativ ist, reflektiert, ob das Zonen-Phänomen aufgetreten ist oder nicht.

[0121] Nachfolgend werden quantitative Konzentrationsergebnisse beschrieben werden. Eine Kalibrationskurve wurde erstellt unter Verwendung von quantifizierenden Ergebnissen für menschliche Albuminlösungen mit menschlichen Albumin-Konzentrationen von 5, 10 und 20 mg/dl, wie oben erhalten. Die erhaltene Kalibrationskurve wurde ausgedrückt durch $y = 6,12x + 29,1$, wobei der Amplitudenwert von einer Gleichstrom-Komponente y war und die Konzentration der menschlichen Albuminlösung x war. Um zu demonstrieren, dass diese Kalibrationskurve gültig war, wurden Ergebnisse von Messungen des Amplitudenwerts einer Gleichstromkomponente für die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 15 mg/dl in die Kalibrationskurve substituiert, um die Konzentration der menschlichen Albuminlösung zu erhalten und es wurde bestätigt, ob die erhaltene Konzentration der menschlichen Albuminlösung zur tatsächlichen Konzentration korrespondierte oder nicht.

[0122] Die Messung des Amplitudenwertes wurde durchgeführt insgesamt drei Mal. In drei Messungen waren die Ergebnisse für den Amplitudenwert der Gleichstromkomponente 123, 124 und 122 und die Werte für die Konzentration der menschlichen Albuminlösung, erhalten durch Berechnen aus der Kalibrationskurve waren 15,3, 15,5 und 15,2 mg/dl. Dies zeigt, dass geschätzte Werte, nahe der tatsächlichen Konzentration erzielt wurden. Folglich wurde bestätigt, dass das Verfahren unter Verwendung eines Amplitudenwerts einer Gleichstromkomponente effektiv als Mittel zum Quantifizieren der Konzentration einer zu messenden Substanz ist.

[0123] Aus den oben beschriebenen Ergebnissen wurde bestätigt, dass das Immunoassay-Verfahren und das Immunoassay-System der vorliegenden Erfindung effektiv sind beim Nachweis des Zonen-Phänomens. Darüber hinaus ermöglicht die vorliegende Erfindung den Nachweis des Zonen-Phänomens mit einer einzelnen Wellenlänge und einer einzelnen Messung, so dass eine Vielzahl von Messungen nicht notwendig ist und eine Vielzahl von Reaktionsgefäßen nicht präpariert werden müssen. Es wurde auch bestätigt, dass multiple Wellenlängenmessungen nicht von Nöten sind und folglich Messschritte und eine Systemkonfiguration einfach wären. Darüber hinaus wurde bestätigt, dass gemäß der vorliegenden

Erfindung die Konzentration einer zu messenden Substanz gemessen werden kann.

(Beispiel 3)

[0124] In diesem Beispiel wird beschrieben werden, dass das Immunoassay-Verfahren dieser Ausführungsform kaum durch Rauschen beeinflusst ist. **Fig. 15** ist ein Graph, welcher Veränderungen mit der Zeit an Streulicht-Intensität in menschlichen Albuminlösungen mit Konzentrationen von 5 mg/dl und 300 mg/dl, wie sie in Beispiel 2 erhalten wurden, anzeigt. In Beispiel 2 wurde eine diskrete Fourier-Transformation durchgeführt mit den Messdaten in dem Zeitintervall, dargestellt in **Fig. 15**, wodurch die Amplitudenspektrum-Verteilung erhalten wurde. Auf der anderen Seite wird in **Fig. 16** ein zufälliges Rauschen, dessen Fluktuationsausmaß mit 0,2 ausgedrückt als Streulichtintensitätswert korrespondiert, zu den Messdaten in dem Zeitintervall, dargestellt in **Fig. 15** hinzuaddiert. In diesem Beispiel werden unter Verwendung der Daten, dargestellt in den **Fig. 15** und **Fig. 16**, die bekannten Verfahren unter Verwendung von Differentiation (Differenz) und das Immunoassay-Verfahren der vorliegenden Erfindung miteinander verglichen.

[0125] **Fig. 17** ist ein Graph, welcher die Ergebnisse darstellt, erhalten aus Differentiation, durchgeführt mit Messdaten in jedem Fall, wobei das zufällige Rauschen gemäß **Fig. 15** nicht hinzuaddiert wurde, der um 0,5 Sekunden verschoben war. Gemäß diesen Ergebnissen sind die Peak-Position, d.h. die Peak-Position der Reaktionsrate unterschiedlich zwischen der menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 5 mg/dl, in welchem das Zonen-Phänomen nicht auftritt und der menschlichen Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 300 mg/dl, in welchem das Zonen-Phänomen auftritt. Folglich kann gesehen werden, dass basierend auf **Fig. 17** beurteilt werden kann, ob das Zonen-Phänomen aufgetreten ist oder nicht.

[0126] **Fig. 18** ist ein Graph, welcher die Ergebnisse zeigt, erhalten durch Differentiation, durchgeführt mit den Messdaten in dem Fall, wo das zufällige Rauschen gemäß **Fig. 16** hinzuaddiert worden ist, verschoben um 0,5 Sekunden. Gemäß diesen Ergebnissen ist es nicht einfach, eine Peak-Position zu bestimmen, d.h. eine Peak-Position einer Reaktionsrate aufgrund des Einflusses von Rauschen. Darüber hinaus sind Unterschiede zwischen den Ergebnissen für die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 5 mg/dl, in welcher das Zonen-Phänomen nicht auftritt und den Ergebnissen für die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 300 mg/dl, in welche das Zonen-Phänomen auftritt, nicht klar. Folglich kann gesehen werden, dass es nicht einfach

ist, zu beurteilen, basierend auf [Fig. 18](#), ob das Zonen-Phänomen aufgetreten ist oder nicht. Wie beschrieben worden ist, ist das Verfahren basierend auf Differentiation (Differenz) leicht durch Rauschen beeinflussbar.

[0127] Als nächstes wird ein Verfahren zum Nachweis des Zonen-Phänomens gemäß der vorliegenden Erfindung beschrieben werden. [Fig. 14](#) ist ein Graph, welcher die Ergebnisse zeigt, erhalten durch Durchführen der diskreten Fourier-Transformation auf Messdaten, um eine Amplitudenverteilung zu erhalten, wenn zufälliges Rauschen nicht addiert worden ist, wie in [Fig. 15](#) gezeigt, und [Fig. 19](#) ist ein Graph, welcher Ergebnisse zeigt, erhalten durch Durchführen von diskreter Fourier-Transformation auf Messdaten von [Fig. 16](#), in dem Fall, wo zufälliges Rauschen addiert worden ist, um eine Amplitudenverteilung zu erhalten. Wie klar dargestellt ist, war sowohl in [Fig. 14](#) als auch [Fig. 19](#) der Wert von $\{($ ein Amplitudenwert bei 0,0938 Hz)-(eine Amplitude bei 0,0625 Hz) $\}$ nicht beeinflusst und auch positiv in dem Fall, in dem die menschliche Albuminlösung eine menschliche Albumin-Konzentration von 5 mg/dl aufwies und negativ in dem Fall, in dem die menschliche Albuminlösung eine menschliche Albumin-Konzentration von 300 mg/dl aufwies. Dies zeigt, dass beurteilt werden kann, ob das Zonen-Phänomen aufgetreten ist oder nicht.

[0128] Aus den oben beschriebenen Ergebnissen wurde bestätigt, dass gemäß dem Immunoassay-Verfahren der vorliegenden Erfindung Ergebnisse zur Beurteilung, ob das Zonen-Phänomen aufgetreten ist oder nicht, kaum beeinflusst werden können und verlässlich erhalten werden können.

(Beispiel 4)

[0129] Im folgenden wird ein Immunoassay-Verfahren unter Verwendung des ersten Immunoassay-Verfahrens (in welchem das Zeitintervall $d_1 + d_2$ ausgewählt wird) der ersten und zweiten Immunoassay-Verfahren, beschrieben in den oben beschriebenen Ausführungsformen, beschrieben werden.

[0130] Die Konfiguration der Messmittel ist die gleiche, wie diejenige in Beispiel 1. Das Mittel zur Messdatenverarbeitung **12** wird ausgebildet, so dass es die folgende Konfiguration aufweist. In diesem Beispiel wird ein auszuwählendes Zeitintervall eingestellt innerhalb eines Bereiches von einer Zeit, wenn eine Substanz, welche gemessen werden soll, und eine spezifische Bindungssubstanz vermischt werden und eine Reaktion gestartet wird, bis zu einer Zeit, wenn ein in die bestimmte Zeitperiode abgelaufen ist, nachdem die Reaktion substantiell gesättigt ist. Für die gleiche Antigen-Antikörper-Reaktion, beschrieben im Beispiel 2, wurden Probenname-Daten erhalten aus 64 Punkten in einem Zeitintervall von ei-

nem Start einer Reaktion bis ungefähr 32 Sekunden nach dem Start der Reaktion. Die erhaltenen Daten wurden dann als periodisches Signal angenommen mit einer Periode von 32 Sekunden und einer Frequenz von 0,03125 Hz und wurde dann diskret Fourier-transformiert mit Microsoft Excel (verfügbar von Microsoft), wodurch eine Amplitudenspektrum-Verteilung erhalten wurde.

[0131] Für Mittel zum Auswerten in dem Auswerte-/Quantifikationsmittel **13** wird ein Verfahren eingesetzt, in welchem zumindest für einen Amplitudenwert bei einer Frequenz, korrespondierend mit dem Kehrwert des Zeitintervalls ($d_2 + d_3$ in [Fig. 2A](#)), wenn die Substanz, welche zu messen ist und eine spezifische Bindungssubstanz vermischt werden und eine Reaktion gestartet ist, bis zu einer Zeit, wenn eine bestimmte Zeitperiode abgelaufen ist, nachdem die Reaktion substantiell gesättigt wurde, das Verhältnis des Amplitudenwertes zu dem Amplitudenwert einer Gleichstromkomponente erhalten wird, und anschließend wird die Auswertung durchgeführt, basierend auf diesem Verhältnis.

[0132] Genauer gesagt, wird das Verhältnis eines Amplitudenwertes bei einer Frequenz von 0,0625 Hz korrespondierend mit dem Kehrwert des Zeitintervalls $d_2 + d_3$, d.h. ungefähr 15 Sekunden zu dem Amplitudenwert der Gleichstromkomponente durch Berechnung erhalten. Auf diese Art und Weise unterscheiden sich verschiedene Verteilungen, wie dargestellt, durch erhaltene Werte zwischen dem Fall, wo eine Substanz, welche zu messen ist, eine Konzentration aufweist, welche das Zonen-Phänomen nicht auslöst und dem Fall, wo die zu messende Substanz eine Konzentration aufweist, welche das Zonen-Phänomen auslöst, so dass Unterschiede zwischen den beiden Fällen klar gezeigt werden können. Beispielsweise ist unter den Bedingungen für die Antigen-Antikörper-Reaktion, beschrieben in Beispiel 2, das Verhältnis des Amplitudenwertes bei einer Frequenz von 0,0625 Hz zu der Amplitude der Gleichstromkomponente 0,135 für die Ergebnisse mit Blick auf die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 5 mg/dl um 0,124 für die Ergebnisse mit Blick auf die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 10 mg/dl, 0,125 für die Ergebnisse mit Blick auf die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 20 mg/dl, 0,123 für die Ergebnisse mit Blick auf die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 30 mg/dl, 0,133 für die Ergebnisse mit Blick auf die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 50 mg/dl, 0,113 für die Ergebnisse mit Blick auf die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 100 mg/dl, 0,110 für die Ergebnisse mit Blick auf die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration

von 200 mg/dl und 0,095 für die Ergebnisse mit Blick auf die menschliche Albuminlösung mit einer menschlichen Albumin-Konzentration von 300 mg/dl. Folglich zeigt das Verhältnis des Amplitudenwertes bei einer Frequenz von 0,0625 Hz zum Amplitudenwert der Gleichstromkomponente Verteilungen über einen Wert von 0,120, wenn die Konzentration der zu messenden Substanz eine Konzentration ist, welche das Zonen-Phänomen nicht auslöst und es zeigt eine Verteilung von unterhalb eines Wertes von 0,120, wenn die Konzentration der zu messenden Substanz eine Konzentration ist, welche das Zonen-Phänomen auslöst.

[0133] Folglich wird unter den Bedingungen für die Antigen-Antikörper-Reaktion, beschrieben in Beispiel 2 mit einem Referenzwert von 0,120 ein Unterschied zwischen dem Referenzwert und dem Verhältnis des Amplitudenwertes, erhalten durch Berechnung für eine Beispiellösung, deren Konzentration nicht bekannt ist, zum Amplitudenwert der Gleichstromkomponente, d.h. $\{(\text{dem Verhältnis des Amplitudenwertes bei } 0,0625 \text{ Hz zum Amplitudenwert der Gleichstromkomponente}) - (\text{Referenzwert})\}$ erhalten. Falls der erhaltene Wert positiv ist, wird bewertet, dass die bekannte Konzentration nicht in der Zonenregion liegt, und falls der erhaltene Wert negativ ist, wird bewertet, dass die bekannte Konzentration in der Zonenregion liegt. Mit dieser Konzentration kann ausgewertet werden, ob die Konzentration einer zu messenden Substanz eine Konzentration ist, welche das Zonen-Phänomen nicht auslöst oder nicht.

[0134] Aus den oben beschriebenen Ergebnissen wurde bestätigt, dass das Immunoassay-Verfahren und das Immunoassay-System gemäß dem vierten Beispiel effektiv im Nachweis des Zonen-Phänomens ist. Darüber hinaus ermöglicht die vorliegende Erfindung den Nachweis des Zonen-Phänomens mit einer einzelnen Wellenlänge und einer einzelnen Messung, so dass eine Vielzahl von Messungen nicht notwendig ist und eine Vielzahl von Reaktionsgefäßen nicht mehr hergestellt werden muss. Es wurde auch bestätigt, dass die multiple Wellenlängenmessung nicht benötigt wird und die Messschritte und eine Systemkonfiguration einfach werden.

Patentansprüche

1. Ein Immuntest-Verfahren zum Bestimmen einer Konzentration einer zu messenden Substanz, die in einer Probenlösung enthalten ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

a) Mischen der Probenlösung und einer spezifisch bindenden Substanz, die fähig ist spezifisch an die zu messende Substanz zu binden, und Erhalt, mittels eines vorher bestimmten Probennahme-Intervalls, einer sich mit der Zeit ändernden optischen Größe in einer Reaktion der zu messenden Substanz und der spezifisch bindenden Substanz als diskrete Mess-

werte;

b) Auswahl eines Zeitintervalls aus den Messwerten, einschließlich einer Zeit, zu der die Steigerungsrate der Änderung der optischen Größe maximal ist;

c) Durchführen einer diskreten Fourier-Transformation der Messwerte mit dem Zeitintervall, von dem angenommen wird, eine Periode einer periodischen Funktion zu sein, um eine Amplitudenspektrum-Verteilung zu erhalten; und

d) Bewerten, anhand der Form der Amplitudenspektrum-Verteilung, ob ein Zonen-Phänomen in der Reaktion in Schritt a) eingetreten ist oder nicht, wobei eine Kombination der zu messenden Substanz und der spezifisch bindenden Substanz eine Kombination eines Antigens und eines Antikörpers ist.

2. Der Immuntest gemäß Anspruch 1, wobei die Veränderung der Größe des optischen Parameters eine Veränderung der Menge gestreuter Lichtintensität oder eine Veränderung der Menge an transmittiertem Licht ist.

3. Der Immuntest gemäß Anspruch 1, wobei das Zeitintervall im voraus aufgrund von Messwerten für die Größe der Veränderung des optischen Parameters in einer Reaktion, in der kein Zonen-Phänomen auftritt, bestimmt wird.

4. Der Immuntest gemäß Anspruch 1, wobei das Zeitintervall von einem Zeitpunkt, an dem die spezifisch bindende Substanz und die Probenlösung gemischt werden, bis zu einem Zeitpunkt reicht, an dem die Veränderung der Größe des optischen Parameters im wesentlichen konstant wird, nachdem die Reaktion im wesentlichen gesättigt ist.

5. Der Immuntest gemäß Anspruch 4, wobei anhand der Amplitudenspektrum-Verteilung und der Form der Amplitudenspektrum-Verteilung, die in einer Reaktion gemessen wird, in der kein Zonen-Phänomen auftritt, im Schritt d) beurteilt wird, ob das Zonen-Phänomen in der Reaktion in Schritt a) aufgetreten ist oder nicht.

6. Der Immuntest gemäß Anspruch 4, wobei anhand des Verhältnisses zwischen einem Amplitudenwert bei einer Frequenz, die einem reziproken Wert des Zeitintervalls entspricht, und einer Gleichstromkomponente der Amplitudenspektrum-Verteilung, in Schritt d) beurteilt wird, ob das Zonen-Phänomen in der Reaktion Schritt a) aufgetreten ist.

7. Der Immuntest gemäß Anspruch 6, wobei im Schritt d) beurteilt wird, dass kein Zonen-Phänomen in der Reaktion im Schritt a) aufgetreten ist, wenn das Verhältnis höher als ein Referenzwert ist, der von den jeweiligen Verteilungen einer Reaktion, in der kein Zonen-Phänomen auftritt, und einer Reaktion, in der das Zonen-Phänomen auftritt, erhalten wird, und beurteilt wird, dass das Zonen-Phänomen in der Reak-

tion von Schritt a) aufgetreten ist, wenn das Verhältnis niedriger als der Referenzwert ist.

8. Der Immuntest gemäß Anspruch 1, weiter umfassend, vor Schritt a), den Schritt e) des Aufbaus eines Reaktionssystems, das nur einen Vertreter aus der Gruppe der Probenlösung und der spezifisch bindenden Substanz einschließt, und des Erhalts, mittels eines vorher bestimmten Probennahme-Intervalls, einer sich mit der Zeit ändernden optischen Größe in dem Reaktionssystem als diskrete Messwerte, wobei in Schritt a) der andere Vertreter aus der Gruppe der Probenlösung und der spezifisch bindenden Substanz, der nicht im Reaktionssystem enthalten ist, dem Reaktionssystem zugefügt wird, um die Testlösung und die spezifisch bindende Substanz zu mischen, und wobei das Zeitintervall von einem Zeitpunkt, der vor dem Mischen der spezifisch bindenden Substanz und der Probenlösung liegt, bis zu einem Zeitpunkt reicht, an dem die Veränderung der Größe des optischen Parameters im wesentlichen konstant wird, nachdem die Reaktion im wesentlichen gesättigt ist.

9. Der Immuntest gemäß Anspruch 8, wobei im Schritt d) beurteilt wird, dass kein Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem in Schritt a) aufgetreten ist, wenn eine Differenz zwischen einem Amplitudenwert bei einer Frequenz, die dem reziproken Wert eines Zeitintervalls entspricht, das von einer Zeit, zu der die spezifisch bindende Substanz und die Testlösung gemischt werden, bis zu einer Zeit reicht, zu der eine Reaktion in dem Reaktionssystem im wesentlichen gesättigt ist, und einem Amplitudenwert bei einer Frequenz, die dem reziproken Wert eines Zeitintervalls entspricht, das von einer Zeit, zu der die spezifisch bindende Substanz und die Testlösung gemischt werden, bis zu einer Zeit reicht, zu der die Veränderung der Größe eines optischen Parameters im wesentlichen konstant wird, nachdem die Reaktion im Reaktionssystem gesättigt ist, eine positive Zahl ist und beurteilt wird, dass das Zonen-Phänomen in dem Reaktionssystem in Schritt a) eingetreten ist, wenn die Differenz eine negative Zahl ist.

10. Der Immuntest gemäß Anspruch 1, wobei anhand eines Amplitudenwertes einer Gleichstromkomponente der Amplitudenspektrum-Verteilung in Schritt c) eine Konzentration der zu messenden Substanz quantifiziert wird.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

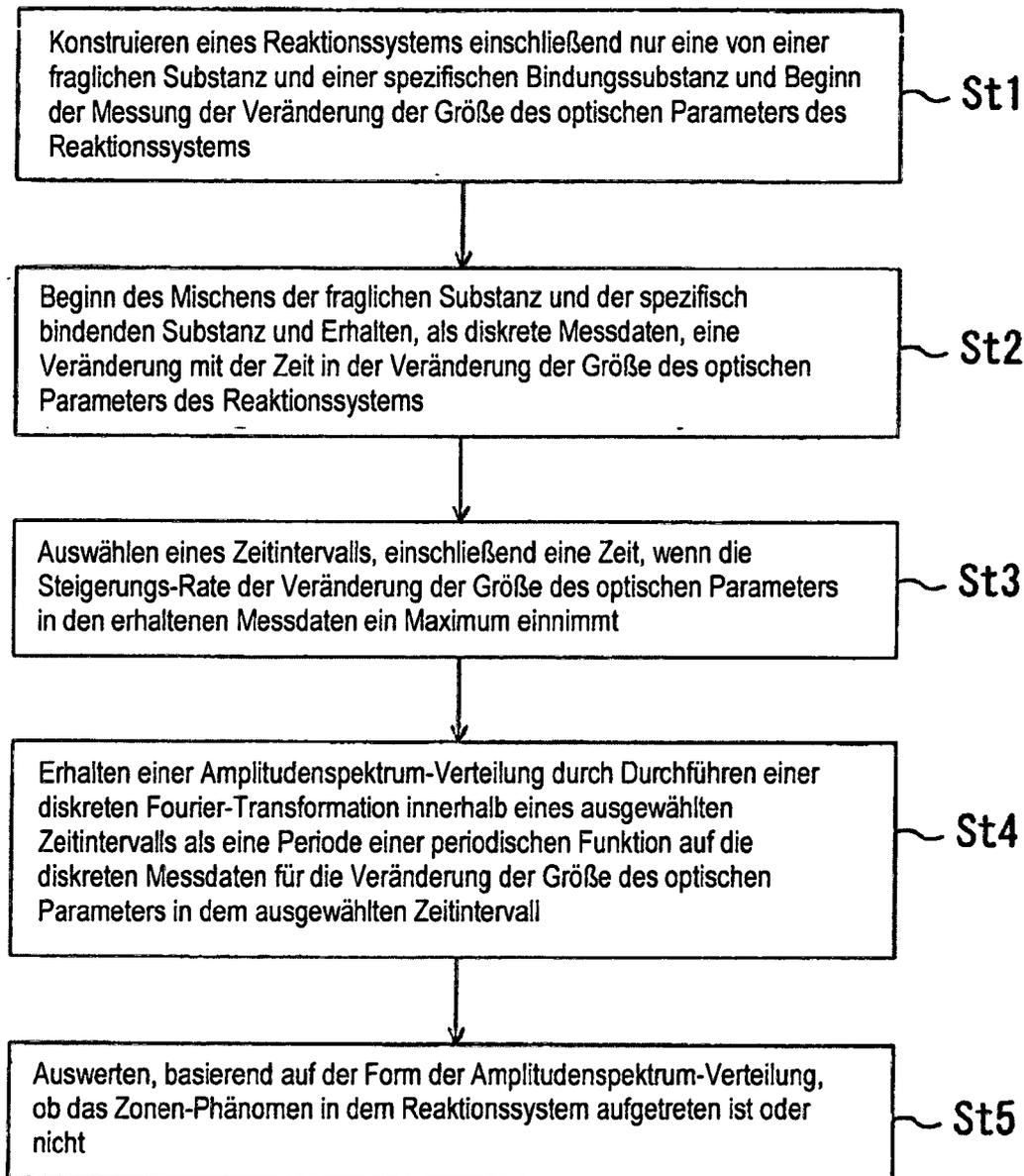


FIG. 2A

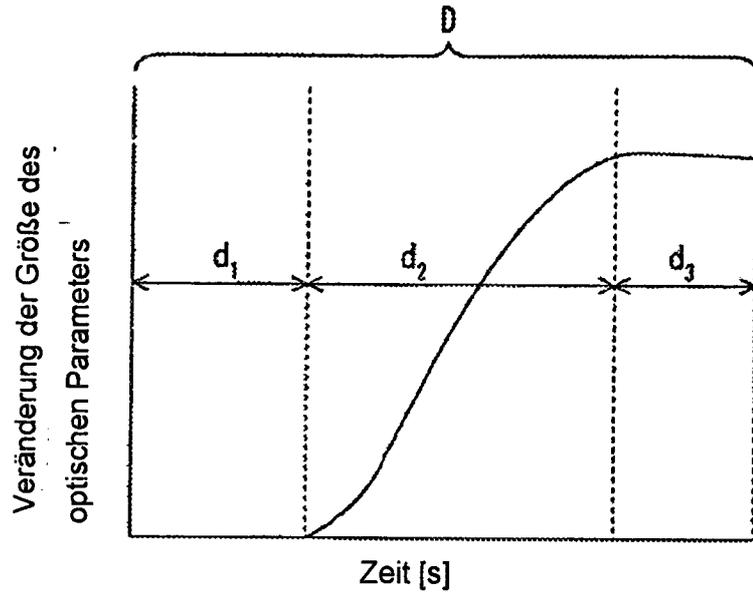


FIG. 2B

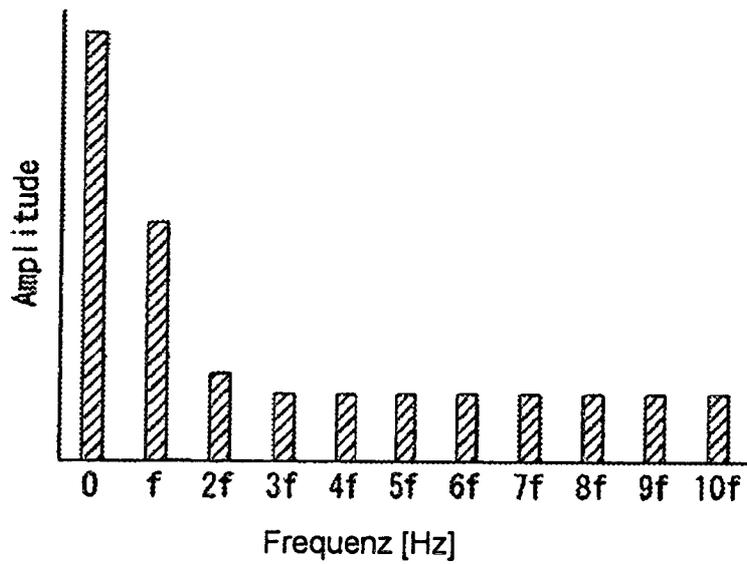


FIG. 3

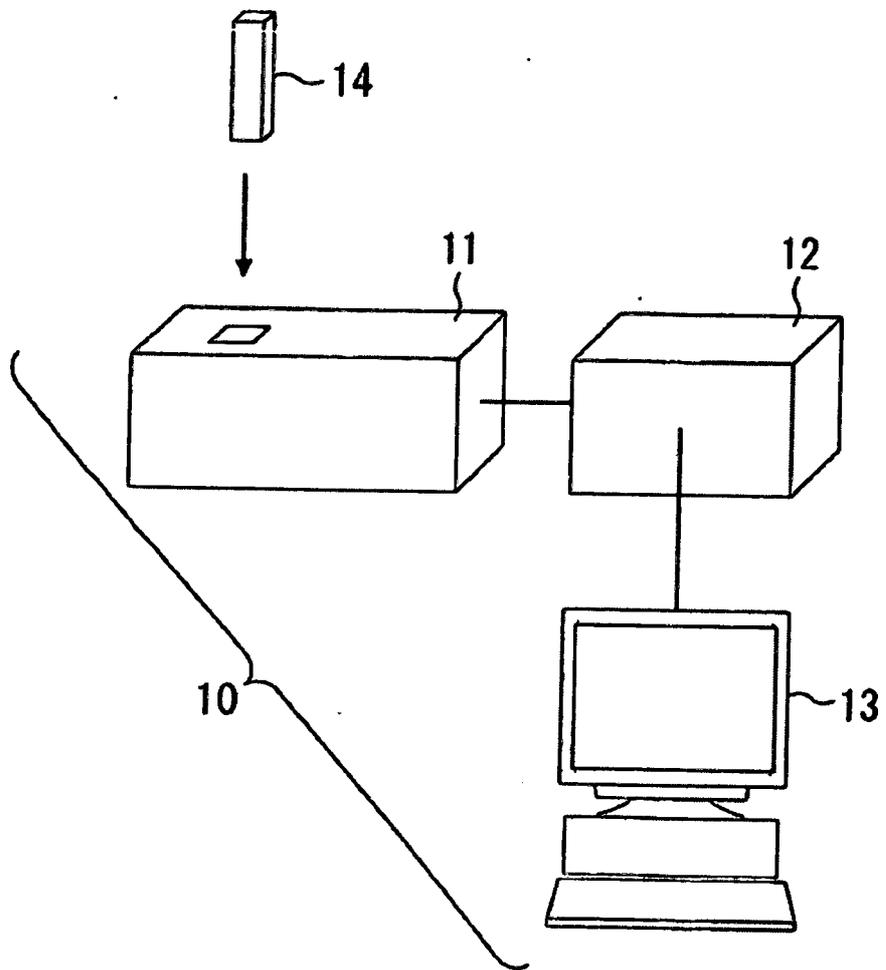


FIG. 4

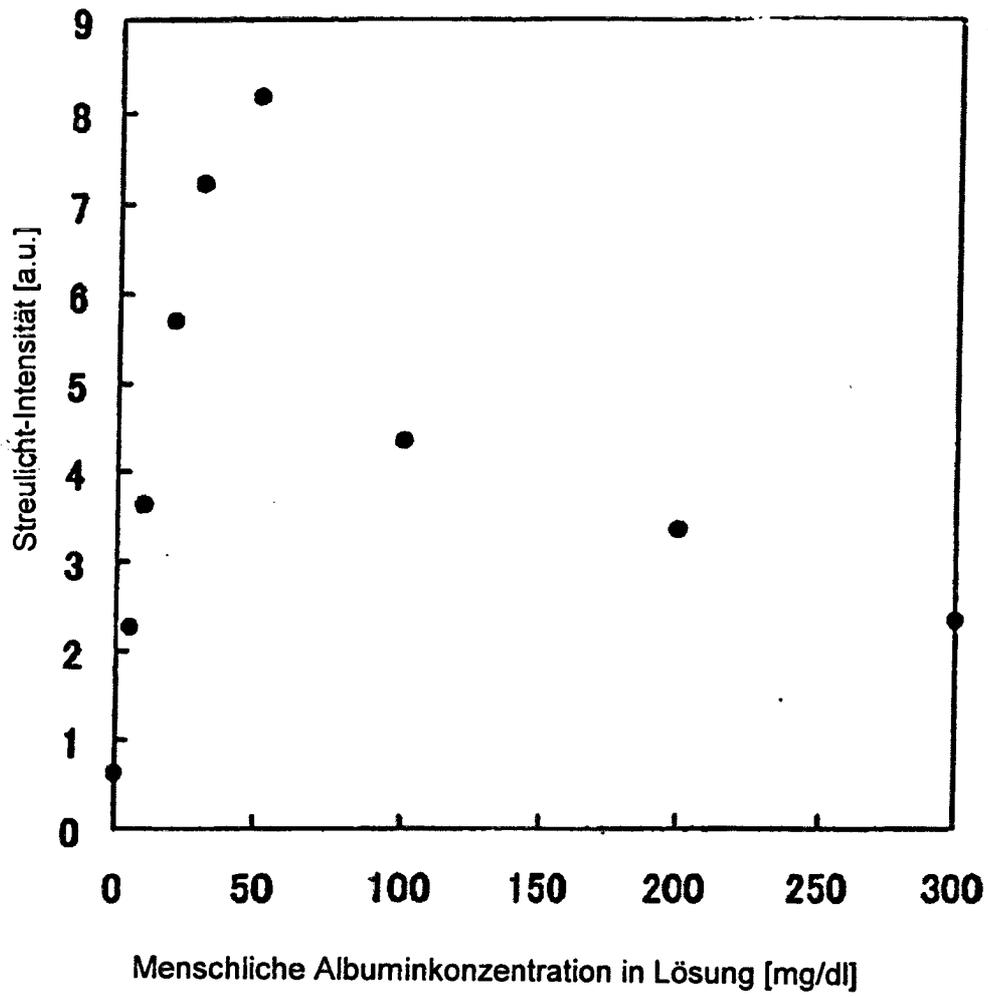


FIG. 5

- Menschliche Albuminkonzentration in Lösung 0 mg/dl
- - - Menschliche Albuminkonzentration in Lösung 5 mg/dl
- Menschliche Albuminkonzentration in Lösung 10 mg/dl
- . - . Menschliche Albuminkonzentration in Lösung 20 mg/dl
- . . - Menschliche Albuminkonzentration in Lösung 30 mg/dl
- Menschliche Albuminkonzentration in Lösung 50 mg/dl
- - - Menschliche Albuminkonzentration in Lösung 100 mg/dl
- . - . Menschliche Albuminkonzentration in Lösung 200 mg/dl
- . . - Menschliche Albuminkonzentration in Lösung 300 mg/dl

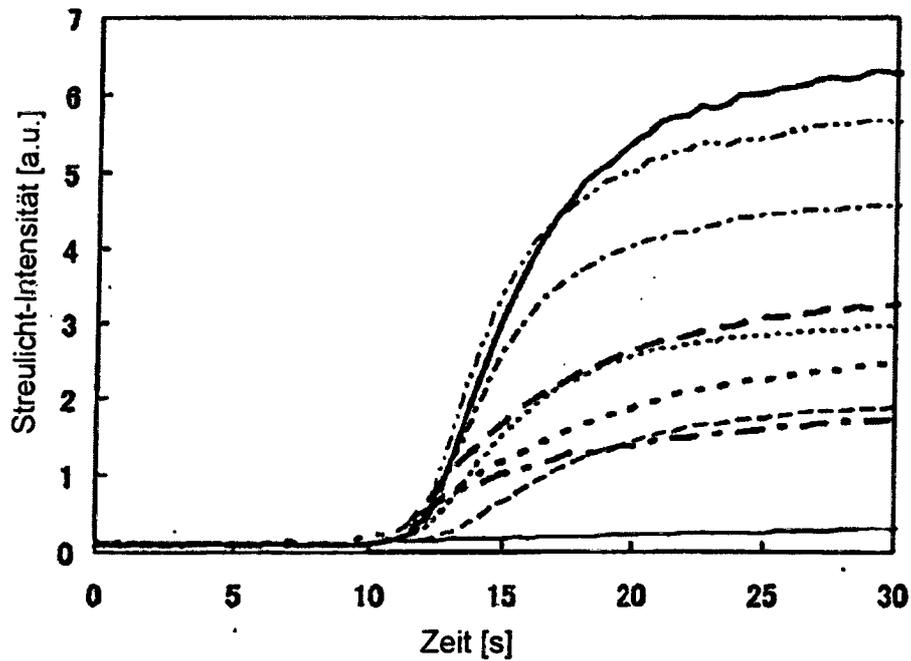


FIG. 6

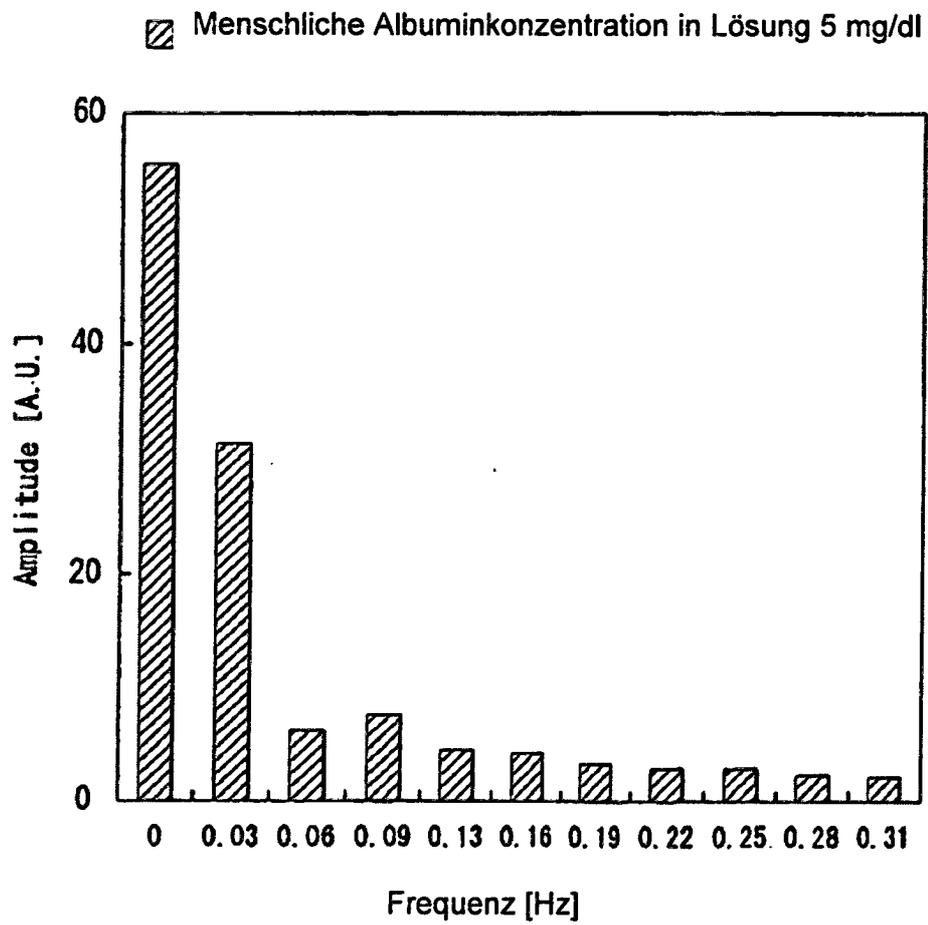


FIG. 7

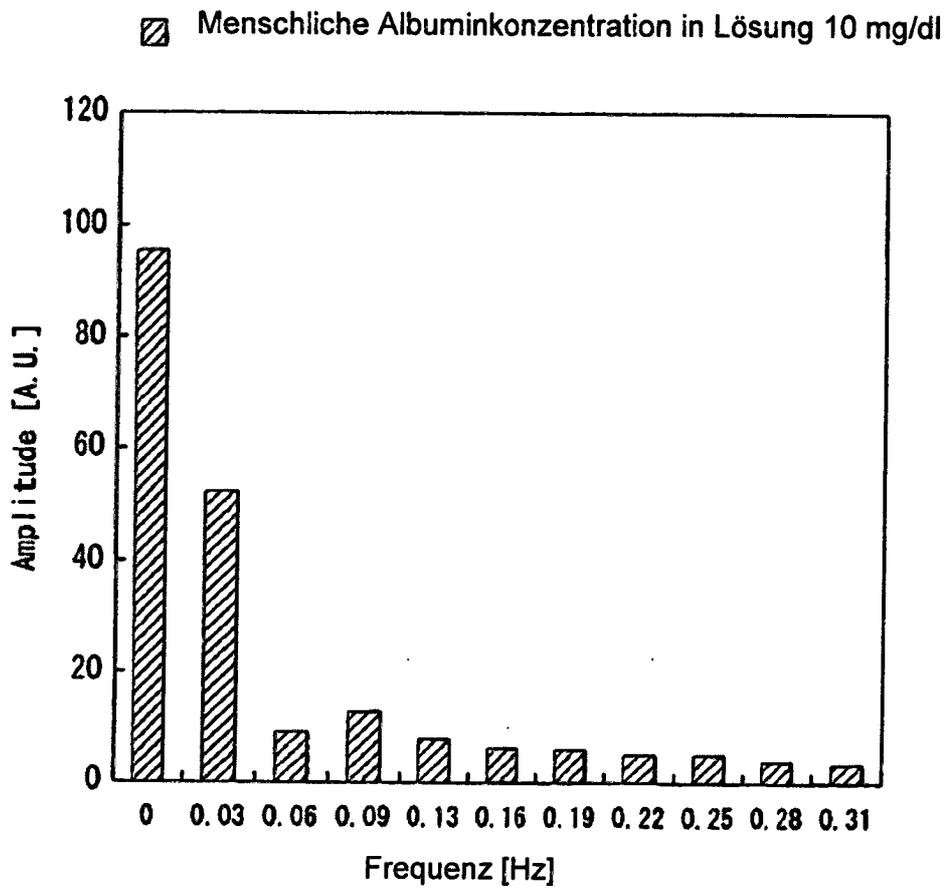


FIG. 8

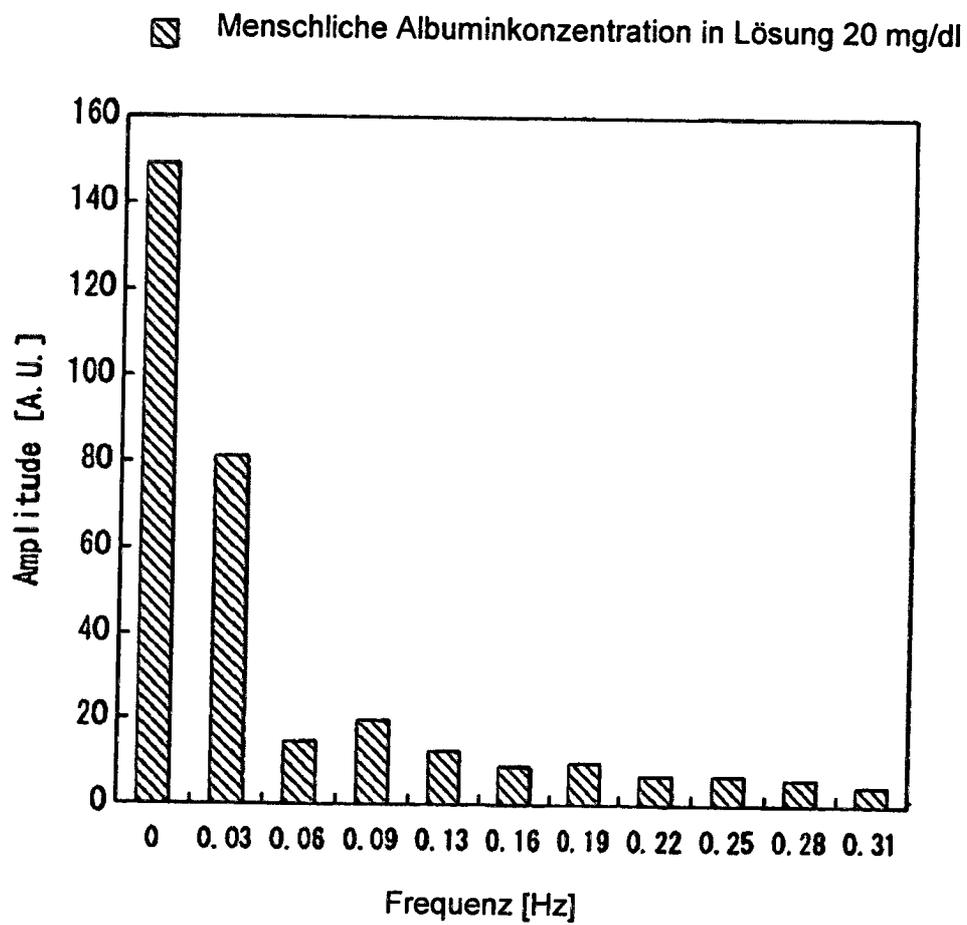


FIG. 9

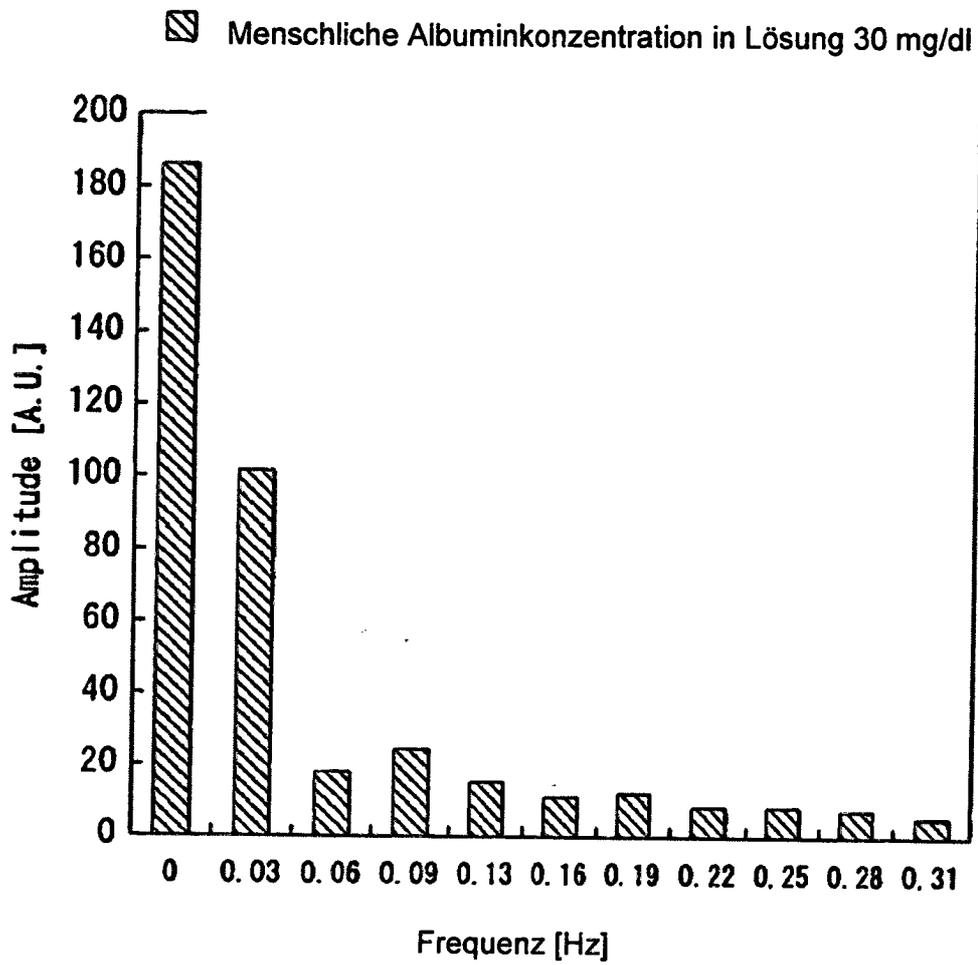


FIG. 10

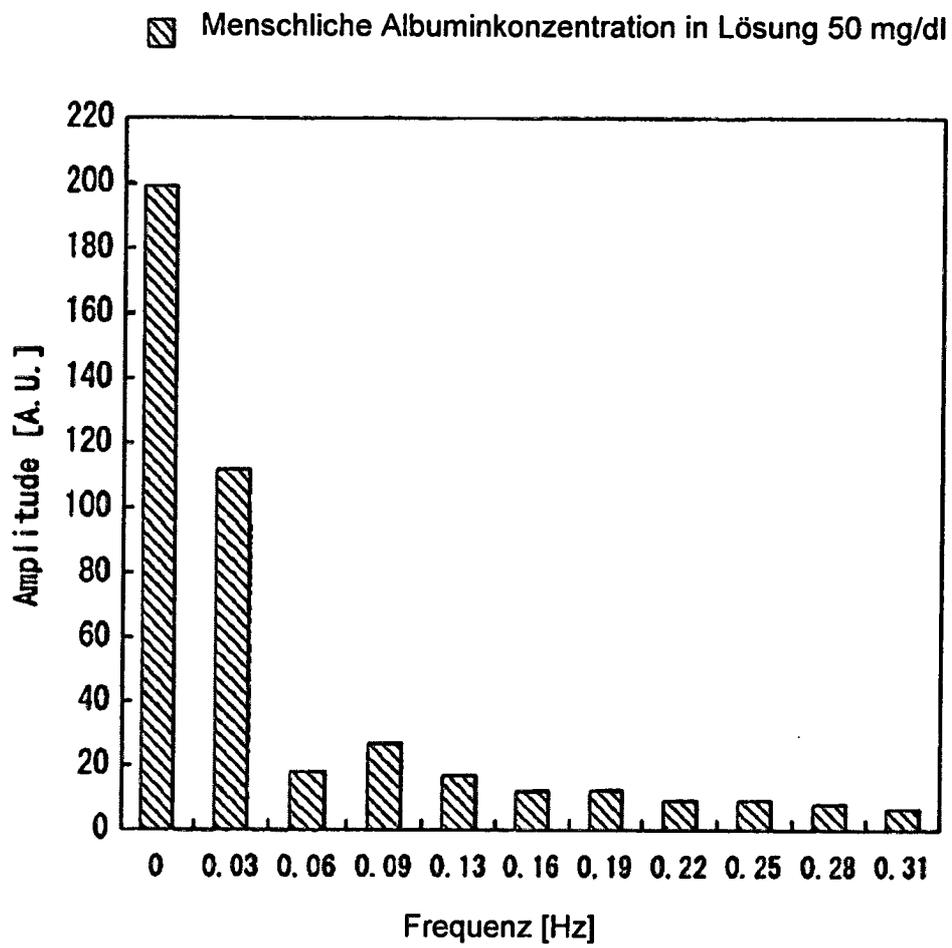


FIG. 11

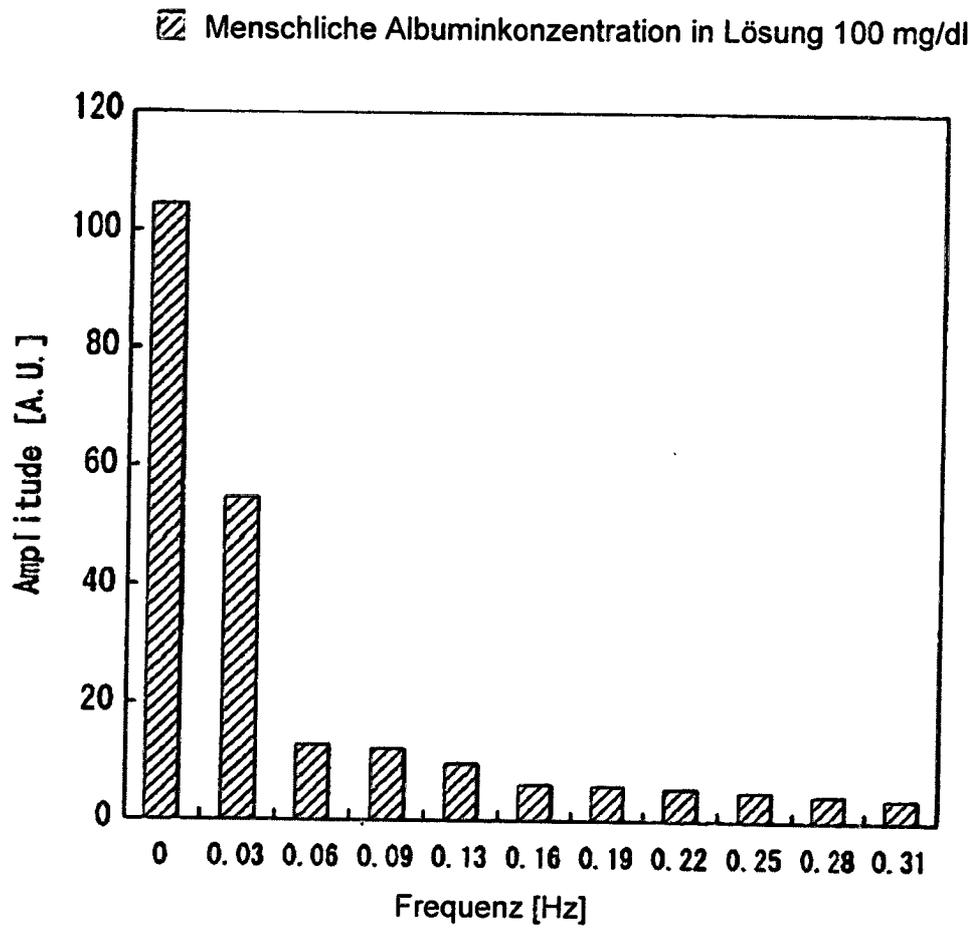


FIG. 12

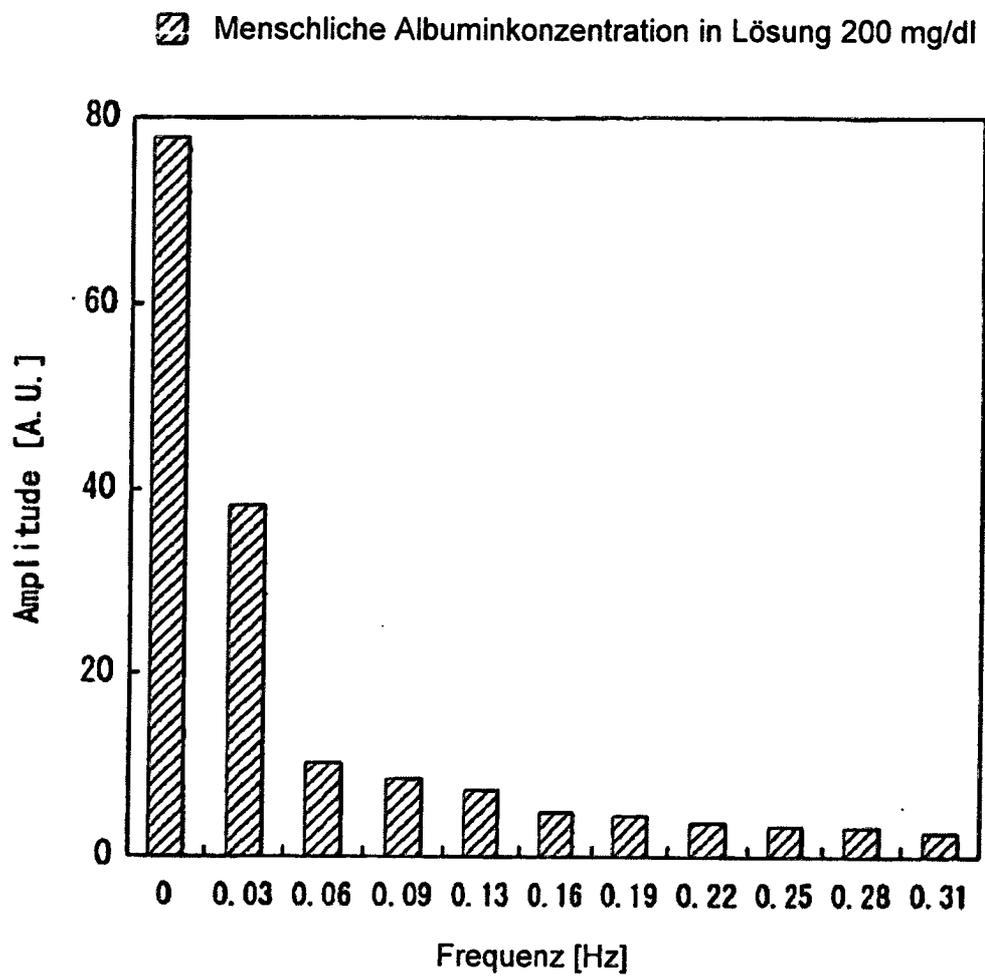


FIG. 13

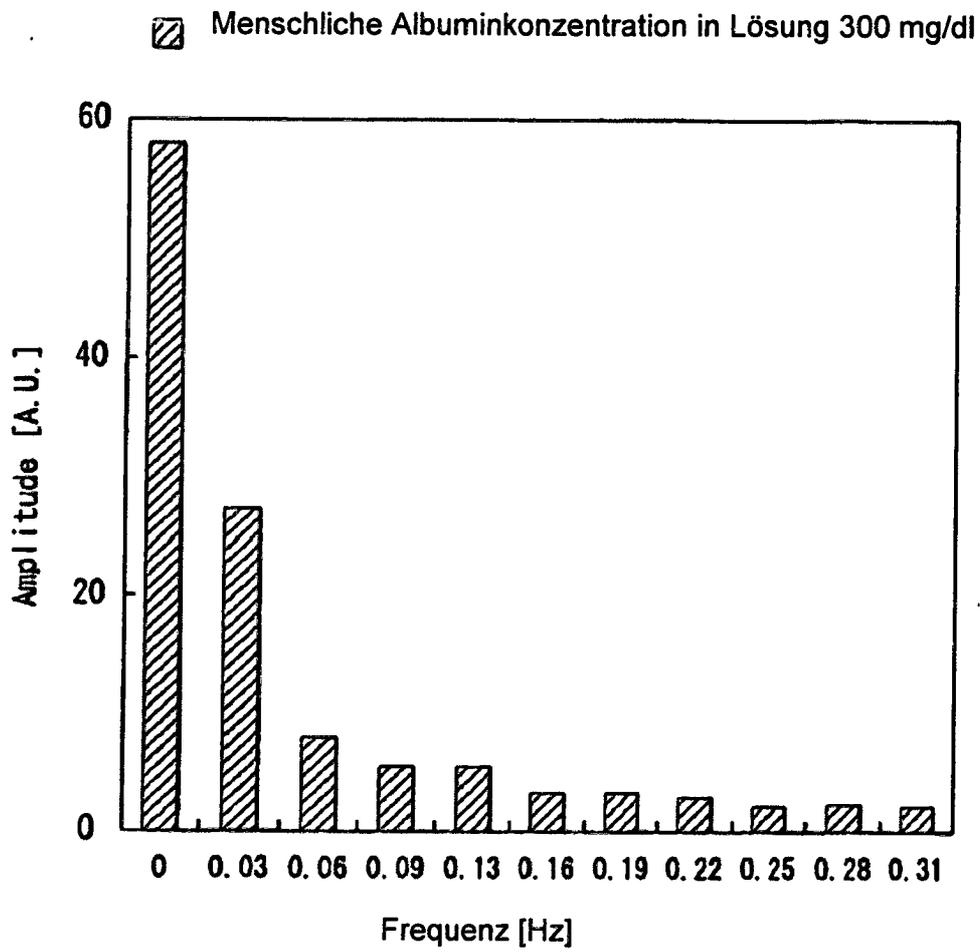


FIG. 14

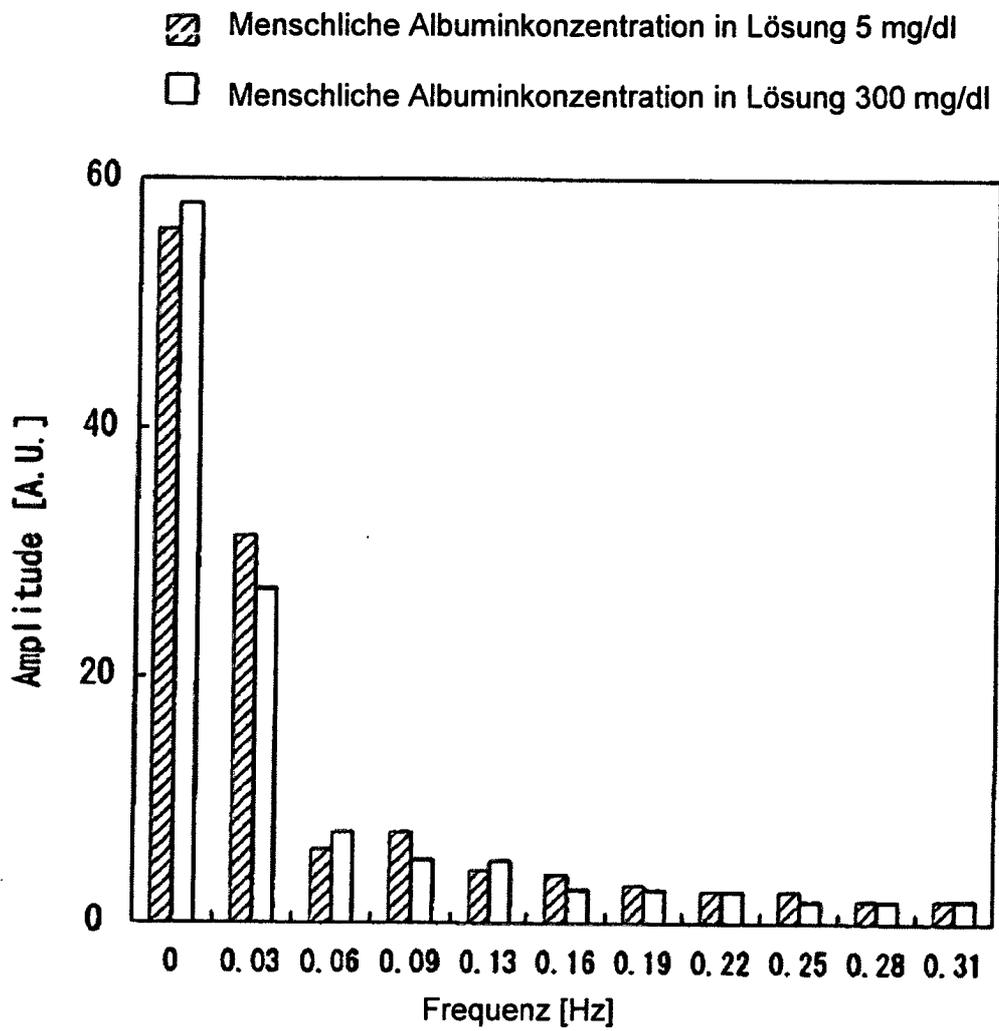


FIG. 15

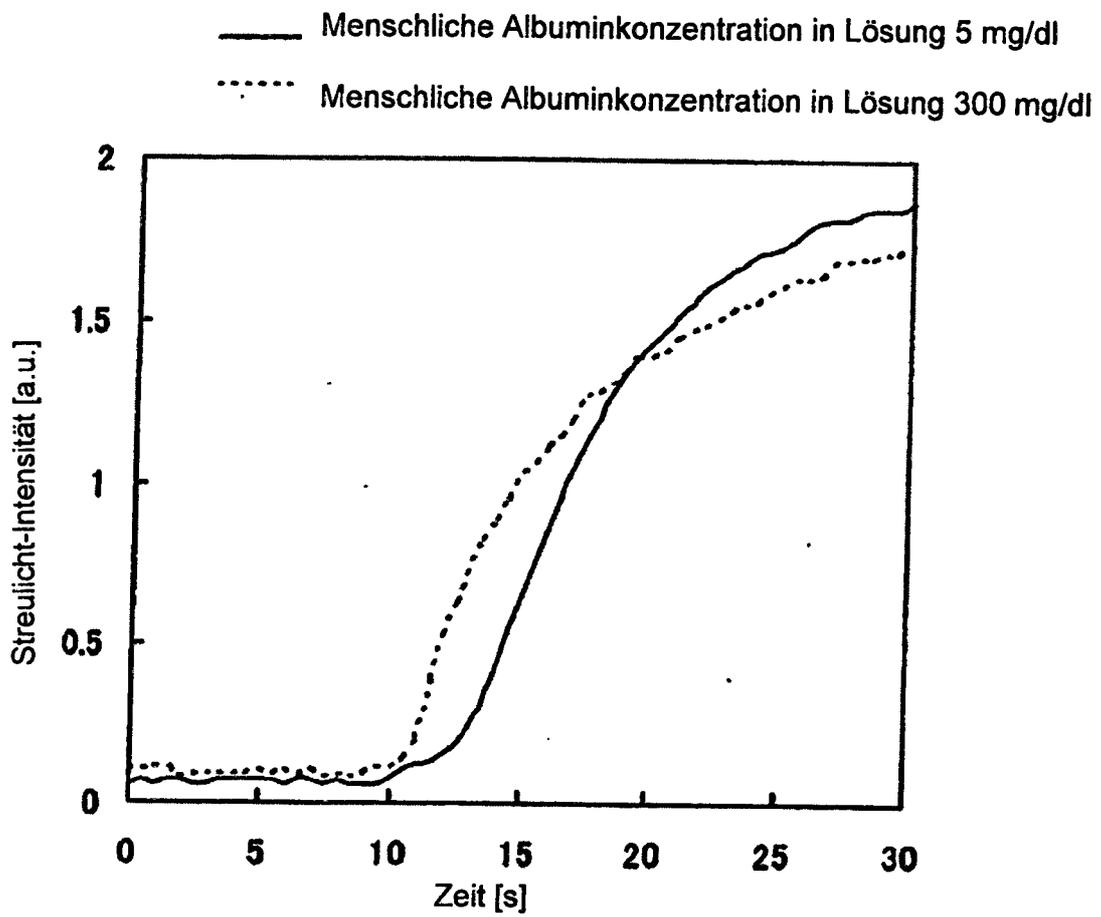


FIG. 16

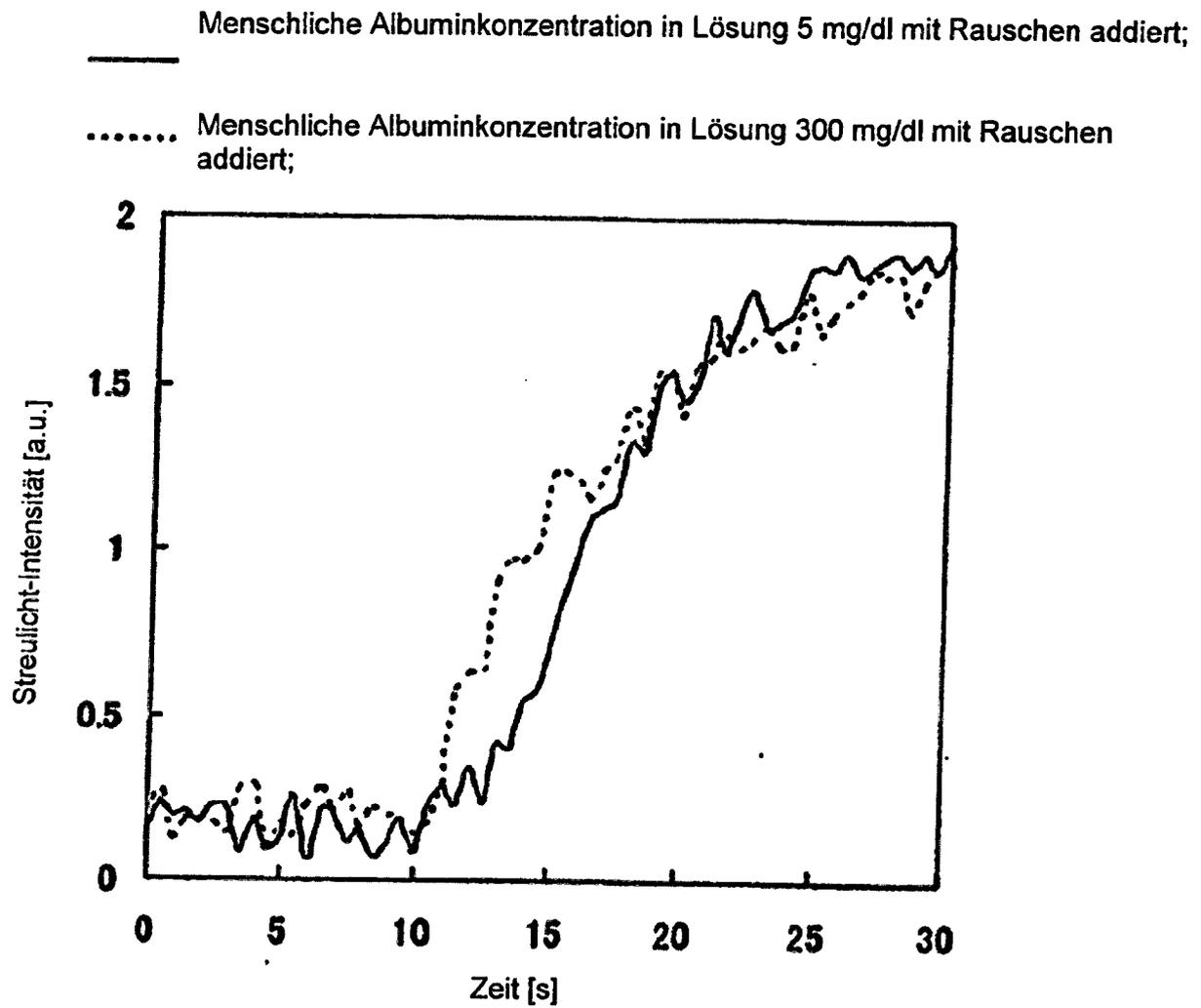


FIG. 17

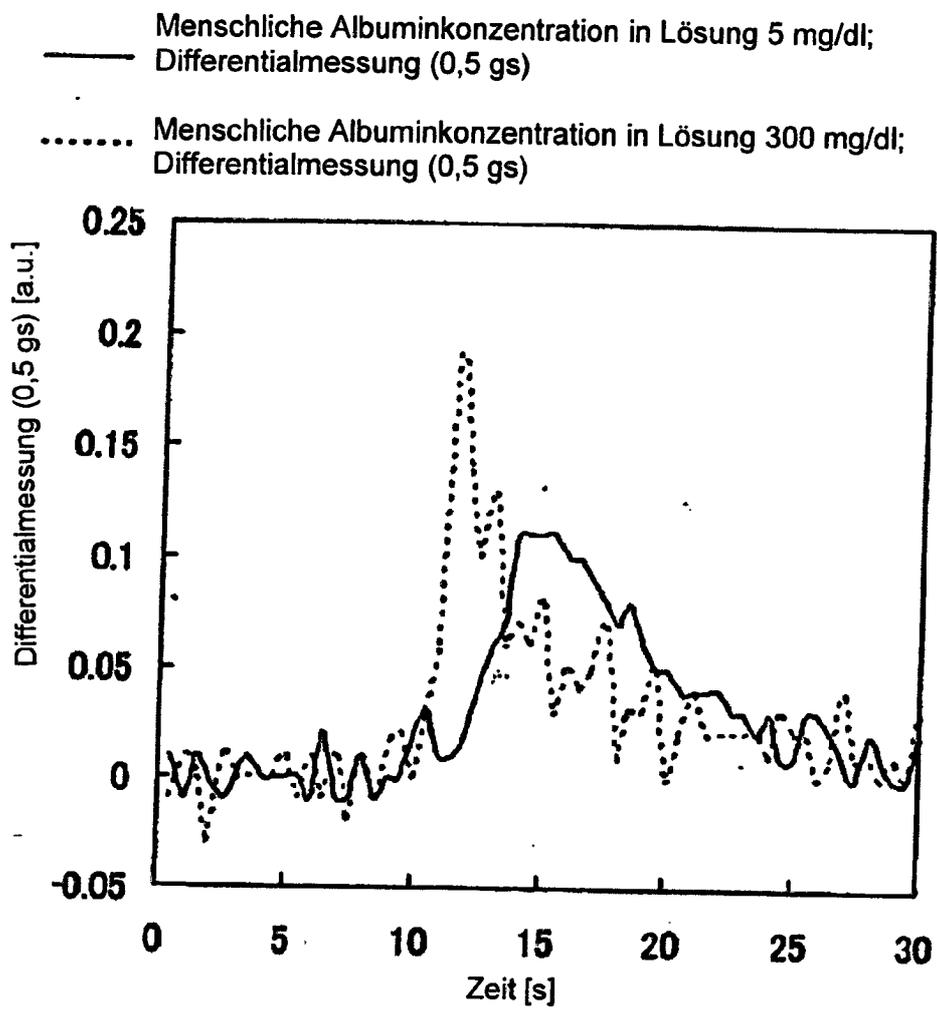


FIG. 18

— Menschliche Albuminkonzentration 5 mg/dl in Lösung mit Rauschen addiert; Differentialmessung (0,5 gs)
..... Menschliche Albuminkonzentration 300 mg/dl in Lösung mit Rauschen addiert; Differentialmessung (0,5 gs)

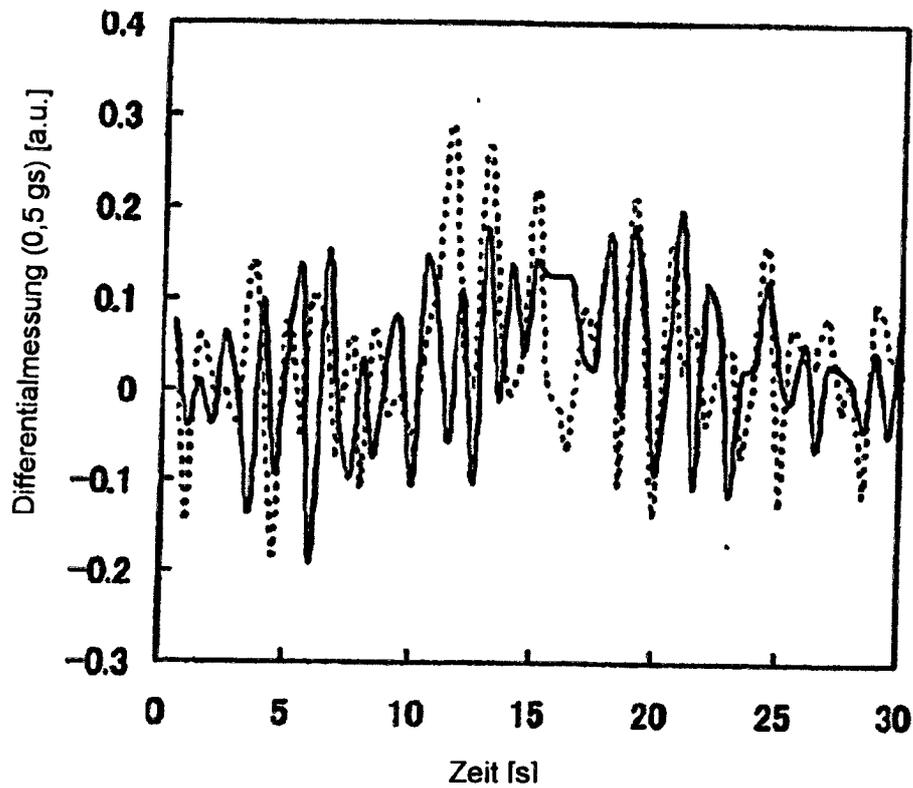


FIG. 19

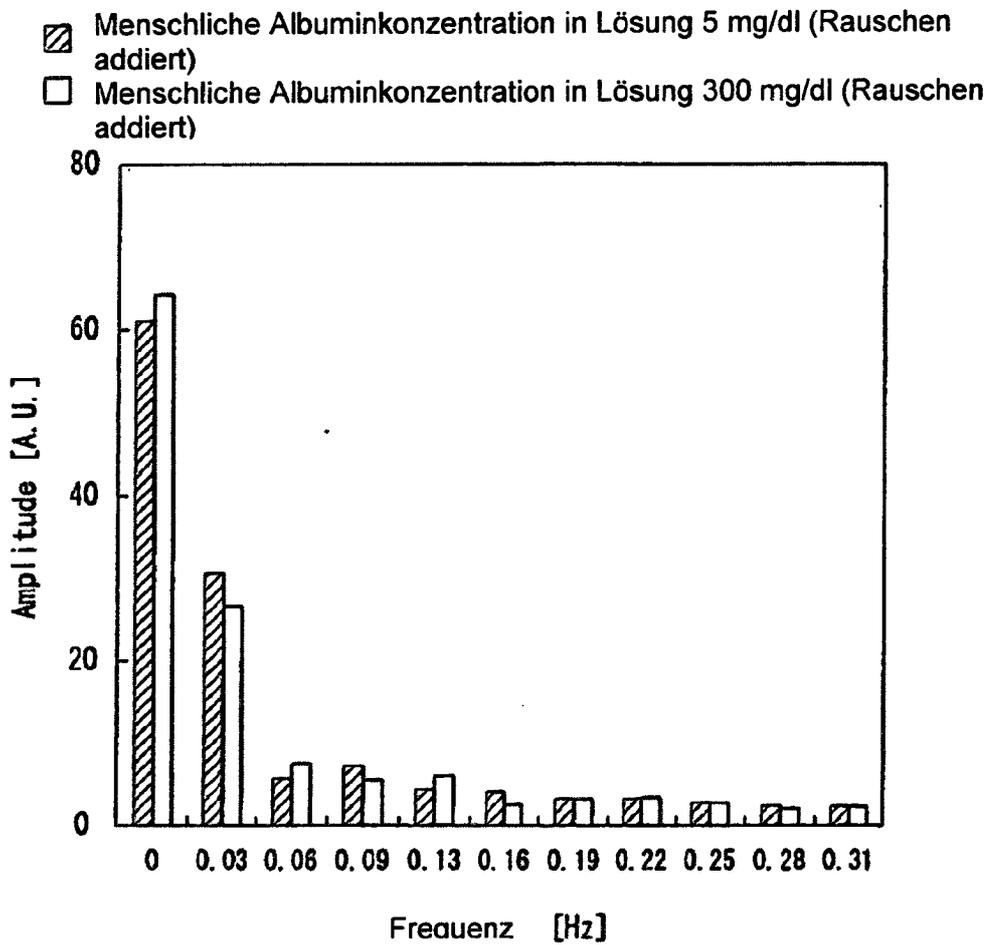


FIG. 20A

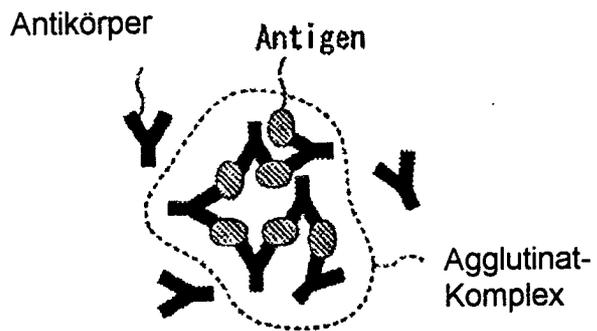


FIG. 20B

