

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-507780

(P2020-507780A)

(43) 公表日 令和2年3月12日(2020.3.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536	D 2 G 0 5 4
GO 1 N 21/76 (2006.01)	GO 1 N 21/76	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	F
CO 9 K 11/06 (2006.01)	CO 9 K 11/06	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 145 頁)

(21) 出願番号 特願2019-547751 (P2019-547751)
 (86) (22) 出願日 平成29年11月21日 (2017.11.21)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年7月18日 (2019.7.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2017/112145
 (87) 国際公開番号 WO2018/095314
 (87) 国際公開日 平成30年5月31日 (2018.5.31)
 (31) 優先権主張番号 201611026623.1
 (32) 優先日 平成28年11月22日 (2016.11.22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国 (CN)
 (31) 優先権主張番号 201611034237.7
 (32) 優先日 平成28年11月22日 (2016.11.22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国 (CN)

(71) 出願人 519181711
 ケムクリン・ダイアグノスティックス・カンパニー・リミテッド
 中華人民共和国、100094 베이ジン、ハイディアン・ディストリクト、ヨンフエン・ベース、フェンシアン・ゾングル 7
 (74) 代理人 110001737
 特許業務法人スズエ国際特許事務所
 (72) 発明者 ヤン、ヤン
 中華人民共和国、201210 シャンハイ、プドン、カイルン・ロード・ナンバー 88、ビルディング 2、サード・フロア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HD-HOOK 効果サンプルと免疫測定を同定する方法、システム、キット及び装置

(57) 【要約】

本発明は、HD - HOOK 効果サンプルを同定する方法、免疫測定における HD - HOOK 効果を同定するためのシステム、キット及び装置、免疫測定方法を同定するためのシステム、キット及び装置に関するものである。校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録し、ピーク校正品の 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分の増幅 A を R 0 とし、測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の増幅 A ' が R 0 を超えているかを比較し、R 0 を超えている場合、サンプルが HD - HOOK 効果を有し、R 0 未満の場合、HD - HOOK 効果を有しないとす。

【選択図】 図 1

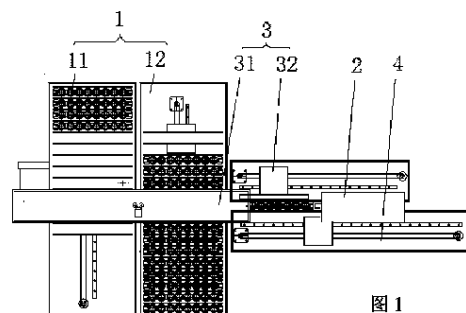


図 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録し、ピーク校正品の 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分の増幅 A を R_0 とし、測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の増幅 A' が R_0 を超えているかを比較し、 R_0 を超えている場合、サンプルが HD - HOOK 効果を有し、 R_0 未満の場合、HD - HOOK 効果を有しないとす、というステップを含むことを特徴とする HD - HOOK 効果サンプルを同定する方法。

【請求項 2】

前記方法は、

(1) 校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1 回目の読み取り：ステップ (1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 RLU_1 とするステップと、

(3) 2 回目の読み取り：ステップ (2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 RLU_2 とするステップと、

(4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU_2 / RLU_1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) ピーク校正品の 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分の増幅 A を R_0 とするステップと、

(6) 測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A' の値を R_0 と比較し、 A' が R_0 以上である場合、このサンプルが HD - HOOK 効果サンプルであると同定するステップと、を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A' の値を R_0 と比較し、 A' が R_0 以上である場合、測定対象サンプルが HD - HOOK 効果サンプルであり、希釈する必要がある、 A' が R_0 未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされ、

前記校正曲線は、校正品の 1 回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザ光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ (2) と (3) において、600 ~ 700 nm の赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は 520 ~ 620 nm とされていることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第 1 の抗体及び第 2 の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第 1 の抗原および第 2 の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7】

化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、
 化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録するための化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、
 測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A' によって $HD - HOOK$ 効果サンプルの有無を特定するためのプロセッサと、を備える
 免疫測定における $HD - HOOK$ 効果を同定するためのシステム。

【請求項 8】

前記システムは、
 化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、
 化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録するための化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、
 測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A' が、ピーク校正品の 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分の増幅 R_0 を超えているかを比較し、 R_0 を超えている場合、サンプルが $HD - HOOK$ 効果を有し、 R_0 未満の場合、 $HD - HOOK$ 効果を有しないとするプロセッサと、を備え、
 化学発光の 2 回目の読み取りは、同一の免疫反応に対して一定の時間が経過した後に再度励起させ読み取ることによって得られるものである、請求項 7 に記載のシステム。

【請求項 9】

前記システムの使用方法は、
 (1) 校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、
 (2) 1 回目の読み取り：ステップ (1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 RLU_1 とするステップと、
 (3) 2 回目の読み取り：ステップ (2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 RLU_2 とするステップと、
 (4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU_2 / RLU_1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、
 (5) ピーク校正品の 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分の増幅 A を R_0 とするステップと、
 (6) 測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A' の値を R_0 と比較し、 A' が R_0 以上である場合、このサンプルが $HD - HOOK$ 効果サンプルであると同定するステップと、を含むことを特徴とする請求項 7 に記載のシステム。

【請求項 10】

測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A' の値を R_0 と比較し、 A' が R_0 以上である場合、測定対象サンプルが $HD - HOOK$ 効果サンプルであり、希釈する必要がある、 A' が R_0 未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされ、
 前記校正曲線は、校正品の 1 回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする請求項 9 に記載のシステム。

【請求項 11】

発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザ光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする請求項 9 に記載のシステム。

【請求項 12】

ステップ(2)と(3)において、600～700nmの赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は520～620nmとされていることを特徴とすることを特徴とする請求項9に記載のシステム。

【請求項13】

前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第1の抗体及び第2の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第1の抗原および第2の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする請求項9に記載のシステム。

【請求項14】

校正品、ピーク校正品、第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を含むキットであって、前記キットの使用方法は、校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅A'によってHD-HOOK効果サンプルの有無を特定することを特徴とするキット。

【請求項15】

前記キットの使用方法は、校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の増幅A'がピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅R0を超えているかを比較し、R0を超えている場合、サンプルがHD-HOOK効果を有し、R0未満の場合、HD-HOOK効果を有しないとする、というステップを含む請求項14に記載のキット。

【請求項16】

前記キットの使用方法は、

(1)校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2)1回目の読み取り:ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3)2回目の読み取り:ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4)サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5)ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅AをR0とするステップと、

(6)測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、このサンプルがHD-HOOK効果サンプルであると判定するステップと、を含むことを特徴とする請求項14に記載のキット。

【請求項17】

測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、測定対象サンプルがHD-HOOK効果サンプルであり、希釈する必要がある、A'がR0未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされ、

前記校正曲線は、校正品の1回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線で

10

20

30

40

50

あることを特徴とする請求項 14 に記載のキット。

【請求項 18】

発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザ光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする請求項 16 に記載のキット。

【請求項 19】

ステップ(2)と(3)において、600~700nmの赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は520~620nmとされていることを特徴とする請求項 16 に記載のキット。

10

【請求項 20】

前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第1の抗体及び第2の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第1の抗原および第2の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする請求項 16 に記載のキット。

【請求項 21】

化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して複数回の読み取りを実行するための読み取りユニットと、

前記読み取りユニットに接続され、前記読み取りユニットの読み取りによって免疫測定にはHD-HOOKのリスクの有無を判定する処理ユニットと、を備える

20

HD-HOOK効果サンプルを同定するための測定装置。

【請求項 22】

インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに移動し読み取りを実行するための移動機構をさらに備えることを特徴とする請求項 21 に記載の免疫測定装置。

【請求項 23】

化学発光免疫反応のために適切な環境温度を提供するためのインキュベータをさらに備えることを特徴とする請求項 21 又は 22 に記載の免疫測定装置。

【請求項 24】

読み取りが完了した後の混合液を前記インキュベータに復帰させ再度インキュベートするための復帰機構をさらに備えることを特徴とする請求項 23 に記載の免疫測定装置。

30

【請求項 25】

前記移動機構は押し出し機構であり、前記復帰機構は押し戻し機構であり、前記混合液はスラットで収容されることを特徴とする請求項 24 に記載の免疫測定装置。

【請求項 26】

前記読み取りユニットは化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して2回の読み取りを実行することに用いられることを特徴とする請求項 21~25のいずれか1項に記載の免疫測定装置。

【請求項 27】

前記インキュベータは第1のインキュベータと第2のインキュベータとを有し、前記押し出し機構は、第1のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を第2のインキュベータに押し出しインキュベートするのに用いられ、かつ前記押し出し機構は第2のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し1回目の読み取りを実行するのに用いられ、

40

前記押し戻し機構は、1回目の読み取りが完了した後の混合液を第2のインキュベータに押し戻し再度インキュベートするのに用いられ

前記押し出し機構は、さらに、第2のインキュベータ内で再度インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し2回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記処理ユニットが2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅Aが標準曲線の最大値を超えていると検出した場合、免疫測定にはHOOKのリスクが存在すると判定すること

50

を特徴とする請求項 25 に記載の免疫測定装置。

【請求項 28】

前記押戻し機構は、

底板と、

前記底板に設けられているガイドレールと、

前記ガイドレールに設けられ、スラットを支持するための移動カップ機構と、

前記移動カップ機構を前記ガイドレールに沿って移動させるための駆動装置と、

前記底板の両端に設けられ、前記移動カップ機構の位置を検出するための光電センサと

、
前記光電センサに接続され、前記光電センサによって発せられた位置信号に基づいて前記移動カップ機構の位置を調整することができる位置調整機構とを備えることを特徴とする請求項 25 に記載の免疫測定装置。

10

【請求項 29】

前記ガイドレールは直線レールまたは可変レールであることを特徴とする請求項 28 に記載の免疫測定装置。

【請求項 30】

前記インキュベータの一方の側に設けられ、測定対象サンプルと試薬とを混合させるためのスラット用試料添加皿と、前記インキュベータの他方の側に設けられ、試薬を収納するための試薬冷蔵領域とをさらに備えることを特徴とする請求項 23 ~ 25 のいずれか 1 項又は請求項 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の免疫測定装置。

20

【請求項 31】

前記スラット用試料添加皿の一方の側に設けられた、ブランクスラットスタッキング及びローディング機構をさらに備え、前記ブランクスラットスタッキング及びローディング機構は、ブランクスラットをスラット用試料添加皿に押し付けるのに用いられることを特徴とする請求項 30 に記載の免疫測定装置。

【請求項 32】

サンプル試験管を支持するためのサンプル試験管載置棚をさらに備えることを特徴とする請求項 31 に記載の免疫測定装置。

【請求項 33】

前記サンプル試験管載置棚におけるブランクスラットスタッキング及びローディング機構に近隣する側に設けられ、予備希釈プレートに対して希釈処理するための希釈プレートシェーカーをさらに備えることを特徴とする請求項 32 に記載の免疫測定装置。

30

【請求項 34】

試料添加針が設けられている機械式アームをさらに備え、

前記機械式アームは、前記サンプル試験管載置棚領域からサンプルを吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第 1 の機械式アームと、前記試薬冷蔵領域から試薬を吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第 2 の機械式アームとを有することを特徴とする請求項 32 に記載の免疫測定装置。

【請求項 35】

第 1 の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第 1 の洗浄機構と、第 2 の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第 2 の洗浄機構とをさらに備えることを特徴とする請求項 34 に記載の免疫測定装置。

40

【請求項 36】

(1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録し、2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅を A とするステップと、(2) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の 2 回の読み取りの差分増幅 A' に基づいて標準曲線を作成し、または、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の 2 回の読み取りの差分増幅 A'' に基づいて標準を作成するステップと、(3) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目

50

の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線および / または標準と比較するステップと、を含む免疫測定方法。

【請求項 37】

測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線と比較することを特徴とする請求項 36 に記載の免疫測定方法。

【請求項 38】

前記既知の一連の標準物質の濃度は、H O O K 効果が生じる濃度よりも低く、および / または前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする請求項 37 に記載の免疫測定方法。

【請求項 39】

前記方法は、(4) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含むことを特徴とする請求項 38 に記載の免疫測定方法。

【請求項 40】

前記方法は、

(a1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(a2) 1 回目の読み取り：ステップ (a1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 1 とするステップと、

(a3) 2 回目の読み取り：ステップ (a2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 2 とするステップと、

(a4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 100$ % で算出するステップと、

(a5) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質（ただし、標準物質の濃度は、H O O K 効果が生じる濃度よりも低い）の 2 回の読み取りの増幅 A' に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(a6) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含むことを特徴とする請求項 39 に記載の免疫測定方法。

【請求項 41】

測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準と比較し、かつ前記標準は臨界値であり、および / または、前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする請求項 36 に記載の免疫測定方法。

【請求項 42】

前記方法は、(4) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップ、をさらに含むことを特徴とする請求項 41 に記載の免疫測定方法。

【請求項 43】

前記方法は、

(c1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(c2) 1 回目の読み取り：ステップ (c1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物

10

20

30

40

50

で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(c3) 2回目の読み取り：ステップ(c2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(c4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(c5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(c6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップと、を含むことを特徴とする請求項42に記載の免疫測定方法。

【請求項44】

前記方法は、(4)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りが前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含むことを特徴とする請求項41に記載の免疫測定方法。

【請求項45】

前記方法は、

(d1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(d2) 1回目の読み取り：ステップ(d1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(d3) 2回目の読み取り：ステップ(d2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(d4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(d5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(d6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含むことを特徴とする請求項44に記載の免疫測定方法。

【請求項46】

前記方法は、(4)サンプルの濃度を特定するステップをさらに含むことを特徴とする請求項37に記載の免疫測定方法。

【請求項47】

前記方法は、

(b1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(b2) 1回目の読み取り：ステップ(b1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(b3) 2回目の読み取り：ステップ(b2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(b4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(b5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅A'に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(b6) Aの値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルのRLU1をそれに対応する標準曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含み

前記校正曲線は、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の1回目の読み取りと既知の一連の標準物質の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする請求項46に記載の免疫測定方法。

【請求項48】

前記発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザ光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする請求項36~47のいずれか1項に記載の免疫測定方法。

【請求項49】

600~700nmの赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は520~620nmとされていることを特徴とする請求項40、43、45及び47のいずれか1項に記載の免疫測定方法。

【請求項50】

前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第1の抗体及び第2の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第1の抗原および第2の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする請求項40、43、45及び47のいずれか1項に記載の免疫測定方法。

【請求項51】

免疫測定を同定するためのシステムであって、
化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、
化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録するとともに、2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅をAとするための化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、
プロセッサと、を備えるシステム。

【請求項52】

前記プロセッサは、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅Aに基づいて標準曲線を作成するのに用いられ、ここで標準物質の濃度はHOK効果が生じる濃度よりも低く、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定することを特徴とする請求項51に記載のシステム。

【請求項53】

前記システムの使用方法は、
(1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

10

20

30

40

50

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質(ただし、標準物質の濃度はHOK効果が生じる濃度よりも低くなっている)の2回の読み取りの増幅Aに基づいて標準曲線を作成するステップと、

(6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップとを含むことを特徴とする請求項52に記載のシステム。

【請求項54】

前記プロセッサは、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較するのに用いられ、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が前記既知の標準物質の濃度よりも高くなっていることを特徴とする請求項51に記載のシステム。

【請求項55】

前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅Aを臨界値とするステップと、

(6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が前記既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップとを含むことを特徴とする請求項54に記載のシステム。

【請求項56】

前記プロセッサは、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較するのに用いられ、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定し、

および/または前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする請求項51に記載のシステム。

10

20

30

40

50

【請求項 57】

前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第1の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅Aを臨界値とするステップと、

(6) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップとを含むことを特徴とする請求項56に記載のシステム。

【請求項 58】

前記プロセッサは、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質の1回目の読み取りと2回の読み取りの増幅Aに基づいてそれぞれ校正曲線と標準曲線を作成し、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの1回目の読み取りと2回の読み取りの増幅Aをそれぞれ校正曲線及び標準曲線と比較して、サンプルの濃度を特定するのに用いられることを特徴とする請求項51に記載のシステム。

【請求項 59】

前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第1の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅Aに基づいて標準曲線を作成するステップと、

(6) Aの値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルのRLU1をそれに対応する校正曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含むことを特徴とする請求項58に記載のシステム。

【請求項 60】

前記発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分

子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザ光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする請求項 5 1 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 6 1】

6 0 0 ~ 7 0 0 n m の赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は 5 2 0 ~ 6 2 0 n m とされていることを特徴とする請求項 5 3、5 5、5 7、5 9 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 6 2】

前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第 1 の抗体及び第 2 の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第 1 の抗原および第 2 の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする請求項 5 3、5 5、5 7、5 9 のいずれか 1 項に記載のシステム。

10

【請求項 6 3】

第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を含むキットであって、前記キットの使用方法は、（1）測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録し、2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅を A とするステップと、（2）測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質の 2 回の読み取りの差分増幅 A' に基づいて標準曲線を作成し、または、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一つの標準物質の 2 回の読み取りの差分増幅 A'' に基づいて標準を作成するステップと、（3）測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線および / または標準と比較するステップと、を含むことを特徴とするキット。

20

【請求項 6 4】

測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線と比較することを特徴とする請求項 6 3 に記載のキット。

【請求項 6 5】

前記既知の一連の標準物質の濃度は、H O O K 効果が生じる濃度よりも低く、および / または前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする請求項 6 4 に記載のキット。

30

【請求項 6 6】

前記キットの使用方法は、（4）測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含むことを特徴とする請求項 6 5 に記載のキット。

【請求項 6 7】

前記キットの使用方法は、
（a 1）測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、
（a 2）1 回目の読み取り：ステップ（a 1）の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 1 とするステップと、
（a 3）2 回目の読み取り：ステップ（a 2）において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 2 とするステップと、
（a 4）サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取

40

50

りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100$ %で算出するステップと、

(a5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質(ただし、標準物質の濃度は、H O O K 効果が生じる濃度よりも低い)の2回の読み取りの増幅 A' に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(a6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップとを含むことを特徴とする請求項66に記載のキット。

【請求項68】

測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準と比較し、かつ前記標準は臨界値であることを特徴とする請求項63に記載のキット。

【請求項69】

前記キットの使用方法は、(4)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップ、をさらに含み、

および/または、前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする請求項68に記載のキット。

【請求項70】

前記キットの使用方法は、

(c1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(c2) 1回目の読み取り: ステップ(c1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 $RLU1$ とするステップと、

(c3) 2回目の読み取り: ステップ(c2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 $RLU2$ とするステップと、

(c4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100$ %で算出するステップと、

(c5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅 A'' を臨界値とするステップと、

(c6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A を臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップと、を含むことを特徴とする請求項69に記載のキット。

【請求項71】

前記キットの使用方法は、(4)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りが前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップをさらに含むことを特徴とする請求項68に記載のキット。

【請求項72】

前記キットの使用方法は、

(d1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(d2) 1回目の読み取り: ステップ(d1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物

10

20

30

40

50

で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(d3) 2回目の読み取り：ステップ(d2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(d4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(d5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(d6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含むことを特徴とする請求項71に記載のキット。

【請求項73】

前記キットの使用方法は、(4)サンプルの濃度を特定するステップをさらに含むことを特徴とする請求項64に記載のキット。

【請求項74】

前記キットの使用方法は、

(b1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(b2) 1回目の読み取り：ステップ(b1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(b3) 2回目の読み取り：ステップ(b2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(b4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(b5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅A'に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(b6) Aの値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルのRLU1をそれに対応する校正曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含み、

前記標準曲線は、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の1回目の読み取りと既知の一連の標準物質の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする請求項73に記載のキット。

【請求項75】

前記発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザー光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする請求項63～74に記載のキット。

【請求項76】

600～700nmの赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は520～620nmとされていることを特徴とする請求項67、70、72、74に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 77】

前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第1の抗体及び第2の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第1の抗原および第2の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする請求項67、70、72、74に記載のキット。

【請求項 78】

化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して複数回の読み取りを実行するための読み取りユニットと、

前記読み取りユニットに接続され、前記読み取りユニットの読み取りによって免疫測定にはH O O Kのリスクの有無を判定する処理ユニットと、を備える免疫測定装置。

10

【請求項 79】

インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに移動し読み取りを実行するための移動機構をさらに備えることを特徴とする請求項78に記載の免疫測定装置。

【請求項 80】

化学発光免疫反応のために適切な環境温度を提供するためのインキュベータをさらに備えることを特徴とする請求項78又は79に記載の免疫測定装置。

【請求項 81】

読み取りが完了した後の混合液を前記インキュベータに復帰させ再度インキュベートするための復帰機構をさらに備えることを特徴とする請求項80に記載の免疫測定装置。

20

【請求項 82】

前記移動機構は押し出し機構であり、前記復帰機構は押し戻し機構であり、前記混合液はスラットで収容されることを特徴とする請求項81に記載の免疫測定装置。

【請求項 83】

前記読み取りユニットは化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して2回の読み取りを実行することに用いられることを特徴とする請求項78～82のいずれか1項に記載の免疫測定装置。

【請求項 84】

前記インキュベータは第1のインキュベータと第2のインキュベータとを有し、前記押し出し機構は、第1のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を第2のインキュベータに押し出しインキュベートするのに用いられ、かつ前記押し出し機構は第2のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し1回目の読み取りを実行するのに用いられ、

30

前記押し戻し機構は、1回目の読み取りが完了した後の混合液を第2のインキュベータに押し戻し再度インキュベートするのに用いられ

前記押し出し機構は、さらに、第2のインキュベータ内で再度インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し2回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記処理ユニットが2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えていると検出した場合、免疫測定にはH O O Kのリスクが存在すると判定する

ことを特徴とする請求項82に記載の免疫測定装置。

40

【請求項 85】

前記押し戻し機構は、

底板と、

前記底板に設けられているガイドレールと、

前記ガイドレールに設けられ、スラットを支持するための移動カップ機構と、

前記移動カップ機構を前記ガイドレールに沿って移動させるための駆動装置と、

前記底板の両端に設けられ、前記移動カップ機構の位置を検出するための光電センサと

、
前記光電センサに接続され、前記光電センサによって発せられた位置信号に基づいて前記移動カップ機構の位置を調整することができる位置調整機構とを備えることを特徴とす

50

る請求項 8 2 に記載の免疫測定装置。

【請求項 8 6】

前記ガイドレールは直線レールまたは可変レールであることを特徴とする請求項 8 5 に記載の免疫測定装置。

【請求項 8 7】

前記インキュベータの一方の側に設けられ、測定対象サンプルと試薬とを混合させるためのスラット用試料添加皿と、前記インキュベータの他方の側に設けられ、試薬を収納するための試薬冷蔵領域とをさらに備えることを特徴とする請求項 8 0 ~ 8 2 のいずれか 1 項又は請求項 8 4 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載の免疫測定装置。

【請求項 8 8】

前記スラット用試料添加皿の一方の側に設けられた、ブランクスラットスタッキング及びローディング機構をさらに備え、前記ブランクスラットスタッキング及びローディング機構は、ブランクスラットをスラット用試料添加皿に押し付けるのに用いられることを特徴とする請求項 8 7 に記載の免疫測定装置。

【請求項 8 9】

サンプル試験管を支持するためのサンプル試験管載置棚をさらに備えることを特徴とする請求項 8 8 に記載の免疫測定装置。

【請求項 9 0】

前記サンプル試験管載置棚におけるブランクスラットスタッキング及びローディング機構に近隣する側に設けられ、予備希釈プレートに対して希釈処理するための希釈プレートシェーカーをさらに備えることを特徴とする請求項 8 9 に記載の免疫測定装置。

【請求項 9 1】

試料添加針が設けられている機械式アームをさらに備え、

前記機械式アームは、前記サンプル試験管載置棚領域からサンプルを吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第 1 の機械式アームと、前記試薬冷蔵領域から試薬を吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第 2 の機械式アームとを有することを特徴とする請求項 8 9 に記載の免疫測定装置。

【請求項 9 2】

第 1 の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第 1 の洗浄機構と、第 2 の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第 2 の洗浄機構とをさらに備えることを特徴とする請求項 9 1 に記載の免疫測定装置。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本願は、2016年11月22日に提出された、発明の名称が「免疫測定方法、免疫測定を同定するためのシステム及びキット」である中国特許出願CN201611026623.1を基礎として優先権を主張するものであり、その記載内容の全てを、ここに援用する。

本願は、2016年11月22日に提出された、発明の名称が「免疫測定方法、免疫測定を同定するためのシステム及びキット」である中国特許出願CN201611034237.7を基礎として優先権を主張するものであり、その記載内容の全てを、ここに援用する。

本願は、2016年11月22日に提出された、発明の名称が「HD-HOOK効果サンプルを同定する方法及び免疫測定におけるHD-HOOK効果を同定するシステム」である中国特許出願CN201611034252.1を基礎として優先権を主張するものであり、その記載内容の全てを、ここに援用する。

本願は、2017年08月05日に提出された、発明の名称が「免疫測定装置」である中国特許出願CN201710695530.6を基礎として優先権を主張するものであり、その記載内容の全てを、ここに援用する。

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0002】

本発明は、光励起化学発光 (Light Initiated Chemiluminescent Assay、LiCA) の技術分野に関し、具体的には、HD-HOOK効果サンプルを同定する方法、免疫測定におけるHD-HOOK効果を同定するためのシステム、キット及び装置、免疫測定方法、免疫測定を同定するためのシステム、キット及び装置に関するものである。

【背景技術】

【0003】

免疫学的検出は抗原抗体の特異的反応原理に基づいて行われるものであり、同位体、酵素、化学発光物質などを利用して被測定物を表示したり信号を増幅させたりすることができるので、よくタンパク質、ホルモンなどの微量生物活性物質を検出するのに用いられる。

10

【0004】

化学発光免疫分析は、近年、発展が迅速な非放射性免疫検出技術であり、その原理が化学発光物質を利用して信号を増幅させると共に、その発光強度によって、免疫結合過程に対して直接測定するものである。この方法は、免疫学的検出の重要な方向の一つとなっている。

【0005】

光励起化学発光法は、化学発光分析技術の常法の一つであり、生物分子間の相互作用の研究に使用することができ、臨床的には、主に疾病の検出に用いられる。この技術は、高分子微粒子技術、有機合成、タンパク質化学及び臨床検出など関連分野の研究が統合されている。それは、感光微粒子と発光微粒子を一定の範囲内で結合させることで、イオン化酸素エネルギーの伝達が発生し、光信号が発せられることによって、測定対象サンプルを検出するものとされている。ここで、感光微粒子の内部に感光化合物が充填されて、発光微粒子の内部に発光化合物とランタノイド族元素が充填されている。赤色レーザ光 (600 ~ 700 nm) の励起で、感光微粒子はエネルギーの高い状態の一重項酸素イオン (4 μ s) を放出し、その伝播距離は約200 nmとされている。感光微粒子と発光微粒子の距離が十分に接近すると、感光微粒子が放出した一重項酸素イオンが発光微粒子に到達することができ、そして一連の化学反応により、520 ~ 620 nmの高いエネルギー準位の光を放出し、機器によって検出される。本反応系では、微粒子の濃度が低く、衝突確率が小さく、バックグラウンド信号が微弱である。感光微粒子と発光微粒子とが免疫反応によって結合された後にはじめて、明らかな光を放出するようになるため、システムの感度が高い。疾病の診断において、通常の検出モードには、抗原または抗体を被覆する発光微粒子、ビオチンまたはジゴキシゲニンによって標識された抗原又は抗体、アビジン又は抗ジゴキシゲニンによって被覆された感光微粒子、中和抗原又は抗体等の3つ~4つの成分が含まれている。以上の各成分は、2つのステップ以上のインキュベート反応によって、測定対象の抗原または抗体に結合され、化学発光量の強弱で測定対象サンプルを定性的または定量的に検出する。従来酵素免疫分析方法と比較して、均一、感度が高く、操作が簡便で自動化しやすい等の特徴を有する。したがって、その応用の見通しは非常に広い。

20

30

40

【0006】

Double-Anti-Sandwich-Immunoassayの検出モードにおいて、検出対象物質の濃度が一定の濃度まで高くなった時、Double-Anti-Sandwich複合体を形成することができないために信号値が低いという現象は、高用量-フック効果 (High Dose-Hook Effect、HD-HOOK効果) と呼ばれる。つまり、高用量-フック効果とは、Double-Site-Sandwich-Immunoassayにおいて、その用量反応曲線における高用量部分の線形性傾向が後に向けて平らに無限延伸するのではなく、フック状のように下方に向けて湾曲されるため、偽陰性の現象が発生してしまう。

【0007】

50

HD - HOOK効果は免疫検出で頻繁に発生するもので、その発生率は陽性サンプルの30%程度を占めている。HD - HOOK効果の存在により、測定対象サンプルに対して、その濃度が検出用キットの線形性範囲を超えたためか、それともそれ自体の濃度がその値であるかを正しく区別できないため、実験上の誤診を招いてしまい、特に偽陰性率が上昇することとなる。

【0008】

具体的には、一方、高濃度のサンプルを検出する際に、高用量 - フック効果により、検出信号が低くなり、サンプルについても濃度が低いと誤って判読されるおそれがある。従来 of 解決策としては、試薬の成分を増やし、測定対象サンプルを希釈したり2段階で検出したりすることである。

10

【0009】

その一方、高用量 - フック効果により、サンプル濃度が一定の値まで高くなると、信号が続けて上昇するわけではなく、検出範囲が制限されている。従来では、主に抗体の最適化または抗体の向上によって検出範囲を広げるとされている。

【0010】

通常の検出フローには、測定対象物および試薬の反応孔への投入、1段目のインキュベーション、汎用液の添加、2段目のインキュベーション及び読み取り、という5つのステップが含まれている。

【0011】

本発明の検出方法は、通常の検出フローに基づいて、反応を中断することなく、反応過程において信号値を複数回読み取り、信号の変化を観測することによってサンプルの真実の濃度を判断するものである。

20

【発明の概要】

【0012】

従来技術に存在する欠陥に関して、本発明は、反応を中断することなく、2回の読み取りによって検出範囲を広げるとともに、測定対象サンプルにHOOK効果が存在するかどうかを正確に判定し、測定対象サンプルにおける測定対象物の濃度を簡便かつ迅速に算出することができる、免疫測定方法を提供することを目的とする。

【0013】

上記目的及び他の関連する目的を達成するために、本発明は以下の技術的手段を採用する。

30

【0014】

本発明の第1の側面は、校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の増幅AをR0とし、測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の増幅A'がR0を超えているかを比較し、R0を超えている場合、サンプルがHD - HOOK効果を有し、R0未満の場合、HD - HOOK効果を有しないとする、というステップを含む、HD - HOOK効果サンプルを同定する方法を提供する。

【0015】

40

なお、測定対象サンプルの差分増幅とピーク校正品の差分増幅を検出する反応条件及び反応時間はいずれも一致している。本発明の一つの好ましい実施の形態によれば、前記方法は、

(1) 校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第1の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

50

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅AをR0とするステップと、

(6) 測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、このサンプルがHD-HOOK効果サンプルであると同定するステップと、を含む。

10

【0016】

本明細書では、用語「ピーク校正品」とは、特定の濃度の測定対象物を含むサンプルを意味し、ここで、Double-Anti-Sandwich-Immunoassayによる測定対象物用量反応曲線における高用量部分の線形性傾向が下方に向かって曲がり始めるときの濃度は、ピーク校正品における測定対象物の濃度となる。

【0017】

本発明の一つの好ましい実施の形態によれば、測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、測定対象サンプルがHD-HOOK効果サンプルであり、希釈する必要がある、A'がR0未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされている。

20

前記校正曲線は、校正品の1回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線である。

【0018】

本発明の一つの好ましい実施の形態によれば、発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザー光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができる。

【0019】

本発明の一つの好ましい実施の形態によれば、ステップ(2)と(3)において、600~700nmの赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は520~620nmとされている。

30

【0020】

本発明の一つの好ましい実施の形態によれば、前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第1の抗体及び第2の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第1の抗原および第2の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいう。

【0021】

本発明の第2の側面は、
化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、
化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録するための化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、

40

測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅A'によってHD-HOOK効果サンプルの有無を特定するためのプロセッサと、を備える
免疫測定におけるHD-HOOK効果を同定するためのシステムを提供する。

【0022】

本発明の一つの好ましい実施の形態によれば、前記システムは、
化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、
化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録するための化学発光免疫反応励起

50

及びカウント装置と、

測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅 A' が、ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅 R_0 を超えているかを比較し、 R_0 を超えている場合、サンプルが $HD-HOOK$ 効果を有し、 R_0 未満の場合、 $HD-HOOK$ 効果を有しないと判断するプロセッサと、を備え、

化学発光の2回目の読み取りは、同一の免疫反応に対して一定の時間が経過した後に再度励起させ読み取ることによって得られるものである。

【0023】

1つの具体的な実施の形態においては、本発明の免疫測定を同定するためのシステムは、例えば溶液の収容容器のような免疫反応装置と、例えば光子カウントモジュールと発光ダイオードのような化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、たとえばコンピュータのような前記読み取りに対して処理やプロットなどをするプロセッサを備える。このような免疫測定を同定するためのシステムは、例えば、本出願人の実用新案 $CN201532646U$ を参照することができ、その記載内容の全てを、ここに援用する。

【0024】

本発明の一つの好ましい実施の形態によれば、前記システムの使用方法は、

(1) 校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り: ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 RLU_1 とするステップと、

(3) 2回目の読み取り: ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 RLU_2 とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU_2 / RLU_1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅 A を R_0 とするステップと、

(6) 測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A' の値を R_0 と比較し、 A' が R_0 以上である場合、このサンプルが $HD-HOOK$ 効果サンプルであると判断するステップと、を含む。

【0025】

本発明によれば、測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A' の値を R_0 と比較し、 A' が R_0 以上である場合、測定対象サンプルが $HD-HOOK$ 効果サンプルであり、希釈する必要があり、 A' が R_0 未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされている。

前記校正曲線は、校正品の1回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線である。

【0026】

本発明の第3の側面は、校正品、ピーク校正品、第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を含むキットであって、前記キットの使用方法は、校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅 A' によって $HD-HOOK$ 効果サンプルの有無を特定することを特徴とするキットを提供する。

【0027】

10

20

30

40

50

本発明の一つの好ましい実施の形態によれば、前記キットの使用方法は、校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の増幅 A' がピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅 R_0 を超えているかを比較し、 R_0 を超えている場合、サンプルがHD-HOOK効果を有し、 R_0 未満の場合、HD-HOOK効果を有しないとする、というステップを含む。

【0028】

本発明の一つの好ましい実施の形態によれば、前記キットの使用方法は、

(1) 校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第1の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 RLU_1 とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 RLU_2 とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU_2 / RLU_1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅 A を R_0 とするステップと、

(6) 測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A' の値を R_0 と比較し、 A' が R_0 以上である場合、このサンプルがHD-HOOK効果サンプルであると同定するステップと、を含む。

【0029】

本発明の一つの好ましい実施の形態によれば、測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A' の値を R_0 と比較し、 A' が R_0 以上である場合、測定対象サンプルがHD-HOOK効果サンプルであり、希釈する必要がある、 A' が R_0 未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされている。

前記校正曲線は、校正品の1回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線である。

【0030】

ここで、上記方法は非疾患診断目的の方法であることに特に留意されたく、前記方法は Double-Antibody Sandwich Immunoassay または Double-Antigen Sandwich Immunoassay の検出過程において簡便かつ迅速にHD-HOOK効果サンプルを選別し、高濃度の抗原（または抗体）サンプルを低濃度の抗原（または抗体）サンプルとして誤認されることを防止するのに用いられるものである。

【0031】

好ましくは、前記抗原とは免疫原性を有する物質をいう。例えば、タンパク質、ポリペプチドが挙げられる。代表的な抗原（これに限定されるものではない）として、サイトカイン、腫瘍マーカー、メタロプロテイン、心血管糖尿病関連タンパク質などが挙げられる。

【0032】

前記抗体とは、有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいう。

【0033】

10

20

30

40

50

本発明の実施例において、前記抗原又は抗体は、B型肝炎表面抗原(HBsAg)、B型肝炎表面抗体(HBsAb)、癌抗原125(CA125)、フェリチン(Ferr)およびCペプチド(CP)から選ばれるものである。

【0034】

本発明の方法によって検出され得るサンプルは特に限定されず、測定すべき目標抗原(または抗体)が含まれる任意のサンプルであってもよく、代表的な例としては、血清サンプル、尿サンプル、唾液サンプルなどが挙げられる。本発明では、血清サンプルが好ましい。

【0035】

好ましくは、前記第1の抗体及び第2の抗体は、前記抗原に特異的に結合可能な抗体である。

【0036】

同一の抗原に対して、対応する第1の抗体及び第2の抗体は同じでも異なってもよく、そして同時に前記抗原に結合することができる。

【0037】

前記第1の抗原および第2の抗原は、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいう。

【0038】

同一の抗体に対して、対応する第1の抗原及び第2の抗原は同じでも異なってもよく、そして同時に前記抗体に結合することができる。

【0039】

好ましくは、前記標識物と標識物特異結合物とは特異的に結合することができる。

【0040】

より好ましくは、前記標識物はビオチンであり、前記標識物特異結合物はストレプトアビジンである。

【0041】

好ましくは、前記発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいう。発光化合物は、Dioxene(ジオキセン)またはthioxene(ジメチルチオフエン)の誘導体等とされてもよく、ランタノイド族元素化合物は、Eu(TTA)₃/TOPOまたはEu(TTA)₃/Phen等とされてもよく、当該微粒子は市販品から購入することができる。発光微粒子の表面官能基は、タンパク質を結合可能な任意の基であり得る。例えば、カルボキシル基、アルデヒド基、アミノ基、エポキシエチル基またはハロゲン化アルキル基などの様々な従来公知の、タンパク質を結合可能な官能基が挙げられる。

【0042】

好ましくは、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザー光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができる。それが発光微粒子に十分に接近すると、一重項酸素イオンが発光微粒子に伝達され、発光微粒子中の発光化合物と反応して紫外線を発生し、紫外線によってさらにランタノイド族元素化合物が励起され特定の波長の光子を発生する。感光化合物としては、フタロシアニン染料などを用いることができ、当該微粒子も市販品から購入することができる。

【0043】

好ましくは、ステップ(2)と(3)において、600~700nmの赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は520~620nmとされている。

【0044】

さらに、赤色レーザー光(600~700nm)で感光微粒子を照射し、感光微粒子に一重項酸素イオンを放出させ、一重項酸素イオンの一部が発光微粒子に受け入れられ、これによって520~620nmの高いエネルギー準位の光が出射される。

【0045】

検出範囲内では、測定すべき目標抗原の濃度は、Double-Antibody S

10

20

30

40

50

andwich複合体の数として表され、そして光子の数に比例する。しかしながら、測定すべき目標抗原の濃度が高すぎると、測定すべき抗原の一部がそれぞれ個別の抗体と結合するので、Double - Antibody Sandwich複合体が減少し、光信号が低くなり、測定すべき目標抗原の真実の濃度が反映されなくなる。

【0046】

同様に、検出範囲内では、測定すべき目標抗体の濃度は、Double - Antigen Sandwich複合体の数として表され、そして光子の数に比例する。しかしながら、測定すべき目標抗体の濃度が高すぎると、測定すべき抗体の一部がそれぞれ個別の抗原と結合するので、Double - Antigen Sandwich複合体が減少し、光信号が低くなり、測定すべき目標抗体の真実の濃度が反映されなくなる。

10

【0047】

本発明の方法は、2回の読み取りによって、2回の読み取りによって得られた信号値の増幅間の関係と比較することによって、検出範囲を広げ、HD - HOOK効果サンプルを区別することで機能する。2回の読み取りの違いは、以下の3つの点によって決められる。

【0048】

第1点では、1回目の読み取りでは、感光微粒子が赤色レーザー光(600~700nm)によって照射された後、一重項酸素イオンを放出する。一重項酸素イオンの一部が発光微粒子に伝達された後、一連の化学反応により、520~620nmの高いエネルギー準位の光を出射するが、一重項酸素イオンの他の一部が抗体(または抗原)に結合されていない測定すべき目標抗原(または抗体)と反応するので、測定すべき目標抗原(または抗体)の濃度を低下させるようになる。低濃度サンプルについては、測定すべき目標抗原(または抗体)の濃度が低下したら、Double - Anti Sandwich複合体が減少し、2回目の読み取りでは信号値が低下する。高濃度のHD - HOOK効果サンプルについては、測定すべき目標抗原(または抗体)の濃度が低下したら、Double - Anti Sandwich複合体が増加し、2回目の読み取りでは信号値が逆に上昇する。

20

【0049】

第2点では、低濃度サンプルについては、感光微粒子が1回目の読み取り中に赤色レーザー光(600~700nm)に照射され、一重項酸素イオンを放出した後、そのエネルギーが損失するので、2回目の読み取りでは信号が低下する。

30

【0050】

第3点では、HD - HOOK効果については、1回目の読み取りでは、抗原抗体反応がまだ平衡に達しておらず、2回の読み取りの間隔時間においても反応が正の方向に向けて進行するので、2回目の読み取りでは信号が上昇する。

【0051】

以上に説明したように、本発明では、反応が平衡に達していないときに1回目の読み取りを行い、感光微粒子が励起光に照射され一重項酸素イオンを放出し、その一部が発光微粒子に伝達され、他の一部が未結合の測定すべき目標抗原または抗体と反応することができ、測定すべき目標抗原または抗体の一部が消耗され、反応平衡を逆の方向に移動させる一方、感光微粒子は1回の励起後に若干消耗され、2回目の読み取りでは、測定すべき目標抗原または抗体の濃度が低いサンプルの信号値が低下するのに対して、濃度が高いサンプルのDouble - Anti Sandwich複合体と感光微粒子との結合は1回目の読み取りではまだまだ平衡に達しておらず、2回目の読み取りでは反応が正の方向に移動するので信号が上昇することになり、測定すべき目標抗原(または抗体)の濃度の上昇に伴い、2回目の光励起による光の信号値および1回目の信号値の上昇幅も上昇する。信号の上昇幅はサンプルの濃度とは正の相関関係があり、2回の信号の増幅を比較すると、信号値が低く増幅が大きいサンプルがHD - HOOK効果サンプルであることを示すことができる。

40

【0052】

50

本発明の第4の側面は、

化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して複数回の読み取りを実行するための読み取りユニットと、

前記読み取りユニットに接続され、前記読み取りユニットの読み取りによって免疫測定にはH D - H O O Kのリスクの有無を判定する処理ユニットと、を備える

H D - H O O K効果サンプルを同定するための測定装置を提供する。

【0053】

本発明のいくつかの実施の形態では、インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに移動し読み取りを実行するための移動機構をさらに備える。

【0054】

本発明の他のいくつかの実施の形態では、前記装置は、化学発光免疫反応のために適切な環境温度を提供するためのインキュベータをさらに備える。

【0055】

本発明のいくつかの実施の形態では、前記装置は、読み取りが完了した後の混合液を前記インキュベータに復帰させ再度インキュベートするための復帰機構をさらに備える。

【0056】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記移動機構は押し機構であり、前記復帰機構は押し機構であり、前記混合液はスラットで収容される。

【0057】

本発明の他のいくつかの具体的な実施の形態では、前記読み取りユニットは化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して2回の読み取りを実行することに用いられる。

【0058】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記インキュベータは第1のインキュベータと第2のインキュベータとを有し、前記押し機構は、第1のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を第2のインキュベータに押し出すのに用いられ、かつ前記押し機構は第2のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し1回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記押し機構は、1回目の読み取りが完了した後の混合液を第2のインキュベータに押し出し再度インキュベートするのに用いられ、

前記押し機構は、さらに、第2のインキュベータ内で再度インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し2回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記処理ユニットが2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えていると検出した場合、免疫測定にはH O O Kのリスクが存在すると判定する。

【0059】

本発明の他のいくつかの具体的な実施の形態では、前記押し機構は、
底板と、

前記底板に設けられているガイドレールと、

前記ガイドレールに設けられ、スラットを支持するための移動カップ機構と、

前記移動カップ機構を前記ガイドレールに沿って移動させるための駆動装置と、

前記底板の両端に設けられ、前記移動カップ機構の位置を検出するための光電センサと

、
前記光電センサに接続され、前記光電センサによって発せられた位置信号に基づいて前記移動カップ機構の位置を調整することができる位置調整機構と、を備える。

【0060】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記ガイドレールは直線レールまたは可変レールである。

【0061】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、前記インキュベータの一方の側に設けられ、測定対象サンプルと試薬とを混合させるためのスラット用試料添加皿と

10

20

30

40

50

、前記インキュベータの他方の側に設けられ、試薬を収納するための試薬冷蔵領域とをさらに備える。

【0062】

本発明の他のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、前記スラット用試料添加皿の一方の側に設けられた、ブランクスラットスタッキング及びローディング機構をさらに備え、前記ブランクスラットスタッキング及びローディング機構は、ブランクスラットをスラット用試料添加皿に押し付けるのに用いられる。

【0063】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、サンプル試験管を支持するためのサンプル試験管載置棚をさらに備える。

【0064】

本発明の他のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、前記サンプル試験管載置棚におけるブランクスラットスタッキング及びローディング機構に近隣する側に設けられ、予備希釈プレートに対して希釈処理するための希釈プレートシェーカーをさらに備える。

【0065】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、試料添加針が設けられている機械式アームをさらに備え、

前記機械式アームは、前記サンプル試験管載置棚領域からサンプルを吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第1の機械式アームと、前記試薬冷蔵領域から試薬を吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第2の機械式アームとを有する。

【0066】

本発明の他のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、第1の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第1の洗浄機構と、第2の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第2の洗浄機構とをさらに備える。

【0067】

具体的には、サンプルがインキュベータに入る前に、以下のステップが行われる必要がある。

1. ブランクスラットがブランクスラットスタッキング及びローディング機構によってスラット用試料添加皿の位置D0に押し付けられる。

2. ブランクスラットがスラット用試料添加皿の位置D0に押し付けられた後、スラット用試料添加皿の位置D1まで時計回りに90度回転させ、この位置で、第1の機械式アームでサンプル試験管載置棚領域からサンプルを吸引してブランクスラットに試料添加する。

3. 試料添加完了後のスラットを、スラット用試料添加皿の位置D2まで時計回りに90度回転させ、この位置では動作なし。

4. スラットを、スラット用試料添加皿の位置D3まで時計回りに90度回転させ、この位置では、第2の機械式アームで試薬冷蔵領域から試薬を吸引して、当該位置にあるスラット内に割り当てる。

【0068】

位置D3にある全てのスラットの試料添加が完了し、そして全てインキュベータに押し込まれた後（その押し出し機構は未図示）、スラット用試料添加皿を位置D3から位置D0まで回転させ（この工程は、位置D1にあるスラットがサンプル割り当てを完了した後に行われる。）、スラット用試料添加皿の1回のサイクルが完了する。スラット用試料添加皿が全負荷で運転するとき、スラット用試料添加皿の位置D0ではブランクスラットがローディングされ、位置D1ではサンプルの割り当てが行われ、位置D2では待機中、位置D3では試薬の割り当てが行われ、そして試薬割り当て後にスラットがインキュベータに押し込まれる。スラット用試料添加皿の回転は、D0～D3の4つの領域内の動作が全て完了するまで待たなければならない。

10

20

30

40

50

【0069】

試料添加完了後のスラットが第1のインキュベータに入った後、スラットが押し出し機構によって第2のインキュベータに送られ、この工程において、測定対象サンプルと試薬が含まれるスラットに標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加える必要もあり、その後サンプルを第2のインキュベータ12に入れ、インキュベートされ、インキュベートされた後に、スラットが押し出し機構によって読み取りユニットに送られ励起光に照射され、出射光量を検出し、1回目の読み取りを記録する。1回目の読み取りが完了した後のスラットが押し出し機構によって第2のインキュベータに押し戻され再度インキュベートされ、再度インキュベートされた後に、前記スラットは再び押し出し機構によって読み取りユニットに送られ励起光に照射され、出射光量を検出し、2回目の読み取りを記録する。2回の読み取りが完了した後に、処理ユニットによって2回の読み取りが処理され、2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えている場合、当該免疫測定にはH O O Kのリスクが存在すると判定する。一つの方法としては、その装置が定性的にH O O Kに関する提示情報を与え、作業者がサンプルを希釈してから再度測定することである。もう一つの方法としては、その装置が直接に定量的な結果を与えることであるが、その結果は線形性範囲よりも遥かに高くなっている。

10

【0070】

従来技術と比べて、この装置は読み取りユニットを設けることにより、読み取りユニットでインキュベートされた後の混合液に対して2回乃至複数回の読み取りを実行し、そして処理ユニットで読み取りユニットによる読み取りを処理することによって、免疫測定にはH O O Kのリスクが存在するかどうかを判定し、H O O K効果に起因する、測定対象サンプルに対してその濃度が検出用キットの線形性範囲を超えたためか、それともそれ自体の濃度がその値であるかを正しく区別できないことを回避し、実験上の誤診を回避することができる。

20

【0071】

本発明の第5の側面は、(1)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅をAとするステップと、(2)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの差分増幅A'に基づいて標準曲線を作成し、および/または、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの差分増幅A''に基づいて標準を作成するステップと、(3)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅Aを前記標準曲線および/または標準と比較するステップと、を含む免疫測定方法を提供する。

30

【0072】

なお、測定対象サンプルの差分増幅と既知の標準物質の差分増幅を検出する反応条件及び反応時間はいずれも一致している。

【0073】

本発明のいくつかの実施の形態では、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅Aを前記標準曲線と比較する。

40

【0074】

本発明のいくつかの実施例では、前記既知の標準物質の濃度は、H O O K効果が生じる濃度よりも低く、かつ前記既知の標準物質は陽性対照である。

【0075】

本発明の他のいくつかの実施例では、前記方法は、(4)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含む。

【0076】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、前記方法は、

50

(a 1) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体 (または抗原) によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体 (または抗原) と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(a 2) 1 回目の読み取り : ステップ (a 1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 1 とするステップと、

(a 3) 2 回目の読み取り : ステップ (a 2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 2 とするステップと、

(a 4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 1 0 0$ % で算出するステップと、

(a 5) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む既知の一連の標準物質 (ただし、標準物質の濃度は、H O O K 効果が生じる濃度よりも低い。) の 2 回の読み取りの増幅 A ' に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(a 6) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含む。

【 0 0 7 7 】

本発明のいくつかの実施の形態では、測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準と比較し、かつ前記標準は臨界値であり、および / または、前記既知の標準物質は陽性対照である。

【 0 0 7 8 】

本発明のいくつかの実施例では、前記方法は、(4) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップ、をさらに含む。

【 0 0 7 9 】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、前記方法は、

(c 1) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体 (または抗原) によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体 (または抗原) と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(c 2) 1 回目の読み取り : ステップ (c 1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 1 とするステップと、

(c 3) 2 回目の読み取り : ステップ (c 2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 2 とするステップと、

(c 4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 1 0 0$ % で算出するステップと、

(c 5) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む既知の一つの標準物質の 2 回の読み取りの増幅 A ' ' を臨界値とするステップと、

(c 6) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A を臨界値と比較して、測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップと、を含む。

【 0 0 8 0 】

本発明のいくつかの実施例では、前記方法は、(4) 測定すべき目標抗原 (または抗体

10

20

30

40

50

)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りが前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含む。

【0081】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、前記方法は、

(d1)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(d2)1回目の読み取り:ステップ(d1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(d3)2回目の読み取り:ステップ(d2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(d4)サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(d5)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(d6)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含む。

【0082】

本発明のいくつかの実施例では、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅Aを前記標準曲線と比較して、かつ、前記方法は、(4)サンプルの濃度を特定するステップをさらに含む。

【0083】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、前記方法は、

(b1)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(b2)1回目の読み取り:ステップ(b1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(b3)2回目の読み取り:ステップ(b2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(b4)サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(b5)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅A'に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(b6)Aの値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルのRLU1をそれに対応する標準曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含む。

【0084】

本発明によれば、前記発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている

高分子微粒子であり、赤色レーザー光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができる。

【0085】

本発明によれば、600～700nmの赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は520～620nmとされている。

【0086】

本発明によれば、前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第1の抗体及び第2の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第1の抗原および第2の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいう。

10

【0087】

本発明の第6の側面は、免疫測定を同定するためのシステムであって、化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録するとともに、2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅をAとするための化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、プロセッサと、を備えるシステムを提供する。

【0088】

1つの具体的な実施の形態においては、本発明の免疫測定を同定するためのシステムは、例えば溶液の収容容器のような免疫反応装置と、例えば光子カウントモジュールと発光ダイオードのような化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、たとえばコンピュータのような前記読み取りに対して処理やプロットなどをするプロセッサを備える。このような免疫測定を同定するためのシステムは、例えば、本出願人の実用新案CN201532646Uを参照することができ、その記載内容の全てを、ここに援用する。

20

【0089】

本発明のいくつかの実施の形態では、前記プロセッサは、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅Aに基づいて標準曲線を作成するのに用いられ、ここで標準物質の濃度はHOK効果が生じる濃度よりも低く、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定する。

30

【0090】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記システムの使用方法は、
（1）測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第1の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、
（2）1回目の読み取り：ステップ（1）の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、
（3）2回目の読み取り：ステップ（2）において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、
（4）サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、
（5）測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質（ただし、標準物質の濃度はHOK効果が生じる濃度よりも低くなっている。）の2回の読み取りの増幅Aに基づいて標準曲線を作成するステップと、
（6）測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含む。

40

50

【0091】

本発明のいくつかの実施の形態では、前記プロセッサは、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較するのに用いられ、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が前記既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとする。

【0092】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第1の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅Aを臨界値とするステップと、

(6) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が前記既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップと、を含む。

【0093】

本発明のいくつかの実施の形態では、前記プロセッサは、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較するのに用いられ、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定する。

【0094】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第1の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅Aを臨界値とするステップと、

(6) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの

10

20

30

40

50

増幅 A を臨界値と比較して、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含む。

【0095】

本発明のいくつかの実施の形態では、前記プロセッサは、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質の 1 回目の読み取りと 2 回の読み取りの増幅 A に基づいてそれぞれ標準曲線を作成し、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 1 回目の読み取りと 2 回の読み取りの増幅 A を標準曲線と比較して、サンプルの濃度を特定するのに用いられる。

10

【0096】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1 回目の読み取り：ステップ (1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1 とするステップと、

(3) 2 回目の読み取り：ステップ (2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2 とするステップと、

20

(4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質の 2 回の読み取りの増幅 A に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(6) A の値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルの RLU1 をそれに対応する標準曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含む、

前記校正曲線は、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質の 1 回目の読み取りと既知の一連の標準物質の濃度によって作成された曲線である。

30

【0097】

本発明によれば、前記発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザ光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができる。

【0098】

本発明によれば、600 ~ 700 nm の赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は 520 ~ 620 nm とされている。

【0099】

本発明によれば、前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第 1 の抗体及び第 2 の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第 1 の抗原および第 2 の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいう。

40

【0100】

本発明の第 7 の側面は、第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を含むキットであって、前記キットの使用方法は、(1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録し、2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅

50

(c1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第1の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(c2) 1回目の読み取り：ステップ(c1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(c3) 2回目の読み取り：ステップ(c2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(c4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(c5) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(c6) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップと、を含む。

【0108】

本発明のいくつかの実施例では、前記キットの使用方法は、(4)測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りが前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含む。

【0109】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、前記キットの使用方法は、

(d1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第1の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(d2) 1回目の読み取り：ステップ(d1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(d3) 2回目の読み取り：ステップ(d2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(d4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(d5) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(d6) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含む。

【0110】

本発明のいくつかの実施例では、前記キットの使用方法は、(4)測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの1回目の読み取りと2回の読み取りの増幅Aを標準曲線と比較して、サンプルの濃度を特定するステップをさらに含む。

【0111】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、前記キットの使用方法は、

10

20

30

40

50

(b1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(b2) 1回目の読み取り:ステップ(b1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(b3) 2回目の読み取り:ステップ(b2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(b4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(b5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅A'に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(b6) Aの値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルのRLU1をそれに対応する標準曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含み、

前記校正曲線は、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の1回目の読み取りと既知の一連の標準物質の濃度によって作成された曲線である。

【0112】

ここで、上記方法は非疾患診断目的の方法であることに特に留意されたく、前記方法はDouble-Antibody Sandwich ImmunoassayまたはDouble-Antigen Sandwich Immunoassayの検出過程において2回の読み取りによって検出範囲を広げるとともに、測定対象サンプルにHOOK効果が存在するかどうかを正確に判定し、測定対象サンプルにおける測定対象物の濃度を簡便かつ迅速に算出することができる。

【0113】

好ましくは、前記抗原とは免疫原性を有する物質をいう。例えば、タンパク質、ポリペプチドが挙げられる。代表的な抗原(これに限定されるものではない)として、サイトカイン、腫瘍マーカー、メタロプロテイン、心血管糖尿病関連タンパク質などが挙げられる。

【0114】

前記抗体とは、有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいう。

【0115】

本発明のいくつかの実施例では、前記抗原又は抗体は、インスリン(INS)、B型肝炎ウイルス表面抗体(HBsAb)、アルファフェトプロテイン(AFP)およびチロトロピン(TSH)などから選ばれるものである。

【0116】

本発明の方法によって検出され得るサンプルは特に限定されず、測定すべき目標抗原(または抗体)が含まれる任意のサンプルであってもよく、代表的な例としては、血清サンプル、尿サンプル、唾液サンプルなどが挙げられる。本発明では、血清サンプルが好ましい。

【0117】

好ましくは、前記第1の抗体及び第2の抗体は、前記抗原に特異的に結合可能な抗体である。

【0118】

同一の抗原に対して、対応する第1の抗体及び第2の抗体は同じでも異なってもよく、そして同時に前記抗原に結合することができる。

【0119】

10

20

30

40

50

前記第1の抗原および第2の抗原は、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいう。

【0120】

同一の抗体に対して、対応する第1の抗原及び第2の抗原は同じでも異なってもよく、そして同時に前記抗体に結合することができる。

【0121】

好ましくは、前記標識物と標識物特異結合物とは特異的に結合することができる。

【0122】

より好ましくは、前記標識物はビオチンであり、前記標識物特異結合物はストレプトアビジンである。

【0123】

好ましくは、前記発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいう。発光化合物は、Dioxene（ジオキセン）またはthioxene（ジメチルチオフエン）の誘導体等とされてもよく、ランタノイド族元素化合物は、Eu(TTA)₃/TPOまたはEu(TTA)₃/Phen等とされてもよく、当該微粒子は市販品から購入することができる。発光微粒子の表面官能基は、タンパク質を結合可能な任意の基であり得る。例えば、カルボキシル基、アルデヒド基、アミノ基、エポキシエチル基またはハロゲン化アルキル基などの様々な従来公知の、タンパク質を結合可能な官能基が挙げられる。

【0124】

好ましくは、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザー光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができる。それが発光微粒子に十分に接近すると、一重項酸素イオンが発光微粒子に伝達され、発光微粒子中の発光化合物と反応して紫外線を発生し、紫外線によってさらにランタノイド族元素化合物が励起され特定の波長の光子を発生する。感光化合物としては、フタロシアニン染料などを用いることができ、当該微粒子も市販品から購入することができる。

【0125】

好ましくは、600～700nmの赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は520～620nmとされている。

【0126】

さらに、赤色レーザー光（600～700nm）で感光微粒子を照射し、感光微粒子に一重項酸素イオンを放出させ、一重項酸素イオンの一部が発光微粒子に受け入れられ、これによって520～620nmの高いエネルギー準位の光が出射される。

【0127】

検出範囲内では、測定すべき目標抗原の濃度は、Double-Antibody Sandwich複合体の数として表され、そして光子の数に比例する。しかしながら、測定すべき目標抗原の濃度が高すぎると、測定すべき抗原の一部がそれぞれ個別の抗体と結合するので、Double-Antibody Sandwich複合体が減少し、光信号が低くなり、測定すべき目標抗原の真実の濃度が反映されなくなる。

【0128】

同様に、検出範囲内では、測定すべき目標抗体の濃度は、Double-Antigen Sandwich複合体の数として表され、そして光子の数に比例する。しかしながら、測定すべき目標抗体の濃度が高すぎると、測定すべき抗体の一部がそれぞれ個別の抗原と結合するので、Double-Antigen Sandwich複合体が減少し、光信号が低くなり、測定すべき目標抗体の真実の濃度が反映されなくなる。

【0129】

本発明の方法は、2回の読み取りによって得られた信号値の増幅間の関係を比較することによって、検出範囲を広げることで機能する。2回の読み取りの違いは、以下の3つの点によって決められる。

【0130】

第1点では、1回目の読み取りでは、感光微粒子が赤色レーザー光（600～700nm

10

20

30

40

50

)によって照射された後、一重項酸素イオンを放出する。一重項酸素イオンの一部が発光微粒子に伝達された後、一連の化学反応により、520～620nmの高いエネルギー準位の光を出射するが、一重項酸素イオンの他の一部が抗体(または抗原)に結合されていない測定すべき目標抗原(または抗体)と反応するので、測定すべき目標抗原(または抗体)の濃度を低下させるようになる。低濃度サンプルについては、測定すべき目標抗原(または抗体)の濃度が低下したら、Double-Anti-Sandwich複合体が減少し、2回目の読み取りでは信号値が低下する。高濃度サンプルについては、測定すべき目標抗原(または抗体)の濃度が低下したら、Double-Anti-Sandwich複合体が増加し、2回目の読み取りでは信号値が逆に上昇する。

【0131】

第2点では、低濃度サンプルについては、感光微粒子が1回目の読み取り中に赤色レーザー光(600～700nm)に照射され、一重項酸素イオンを放出した後、そのエネルギーが損失するので、2回目の読み取りでは信号が低下する。

【0132】

第3点では、HD-HOOK効果については、1回目の読み取りでは、抗原抗体反応がまだ平衡に達しておらず、2回の読み取りの間隔時間においても反応が正の方向に向けて進行するので、2回目の読み取りでは信号が上昇する。

【0133】

以上に説明したように、本発明では、反応が平衡に達していないときに1回目の読み取りを行い、感光微粒子が励起光に照射され一重項酸素イオンを放出し、その一部が発光微粒子に伝達され、他の一部が未結合の測定すべき目標抗原または抗体と反応することができ、測定すべき目標抗原または抗体の一部が消耗され、反応平衡を逆の方向に移動させる一方、感光微粒子は1回の励起後に若干消耗され、2回目の読み取りでは、測定すべき目標抗原または抗体の濃度が低いサンプルの信号値が低下するのに対して、濃度が高いサンプルのDouble-Anti-Sandwich複合体と感光微粒子との結合は1回目の読み取りではまだまだ平衡に達しておらず、2回目の読み取りでは反応が正の方向に移動するので信号が上昇することになり、測定すべき目標抗原(または抗体)の濃度の上昇に伴い、2回目の光励起による光の信号値および1回目の信号値の上昇幅も上昇する。信号の上昇幅はサンプルの濃度とは正の相関関係があり、2回の信号の増幅を比較することによって、検出範囲を広げることができ、検出過程において、その濃度を簡便かつ迅速に算出することができる。

【0134】

従来技術と比較して、本発明の前記方法は、光励起化学発光プラットフォーム(発光酸素チャンネル)の無洗浄および反応の均一性に基づいて、免疫反応の進行を中断することなく1つの反応に対して複数回の信号測定を行うことができ、異なる反応時間での光信号を検出し、2回の信号の大きさを比較することによって、HD-HOOK効果サンプルを区別することができ、前記方法は検出範囲によって制限されず、検出範囲を100倍以上に効果的に広げた。同時に、本発明の方法は、Double-Anti-Sandwich ImmunoassayにおけるHD-HOOK効果サンプルを100%正確に同定することができ、前記方法はDouble-Antibody Sandwich Immunoassayの正確性を顕著に改善し、Double-Antibody Sandwich Immunoassayの偽陰性率を低下させることができる。また、本発明の方法は操作が簡単であり、2回の読み取りによって検出範囲を広げ、検出過程において、測定対象物の濃度を簡便かつ迅速に算出することができる。

【0135】

本発明の第8の側面は、

化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して複数回の読み取りを実行するための読み取りユニットと、

前記読み取りユニットに接続され、前記読み取りユニットの読み取りによって免疫測定にはHOOKのリスクの有無を判定する処理ユニットと、を備える

10

20

30

40

50

免疫測定装置を提供する。

【0136】

本発明のいくつかの実施の形態では、前記装置は、インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに移動し読み取りを実行するための移動機構をさらに備える。

【0137】

本発明の他のいくつかの実施の形態では、前記装置は、化学発光免疫反応のために適切な環境温度を提供するためのインキュベータをさらに備える。

【0138】

本発明のいくつかの実施の形態では、前記装置は、読み取りが完了した後の混合液を前記インキュベータに復帰させ再度インキュベートするための復帰機構をさらに備える。

10

【0139】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記移動機構は押し出し機構であり、前記復帰機構は押し戻し機構であり、前記混合液はスラットで収容される。

【0140】

本発明の他のいくつかの具体的な実施の形態では、前記読み取りユニットは化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して2回の読み取りを実行することに用いられる。

【0141】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記インキュベータは第1のインキュベータと第2のインキュベータとを有し、前記押し出し機構は、第1のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を第2のインキュベータに押し出しインキュベートするのに用いられ、かつ前記押し出し機構は第2のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し1回目の読み取りを実行するのに用いられ、

20

前記押し戻し機構は、1回目の読み取りが完了した後の混合液を第2のインキュベータに押し戻し再度インキュベートするのに用いられ、

前記押し出し機構は、さらに、第2のインキュベータ内で再度インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し2回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記処理ユニットが2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えていると検出した場合、免疫測定にはH O O Kのリスクが存在すると判定する。

【0142】

30

本発明の他のいくつかの具体的な実施の形態では、前記押し戻し機構は、
底板と、

前記底板に設けられているガイドレールと、

前記ガイドレールに設けられ、スラットを支持するための移動カップ機構と、

前記移動カップ機構を前記ガイドレールに沿って移動させるための駆動装置と、

前記底板の両端に設けられ、前記移動カップ機構の位置を検出するための光電センサと

、
前記光電センサに接続され、前記光電センサによって発せられた位置信号に基づいて前記移動カップ機構の位置を調整することができる位置調整機構と、を備える。

【0143】

40

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記ガイドレールは直線レールまたは可変レールである。

【0144】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、前記インキュベータの一方の側に設けられ、測定対象サンプルと試薬とを混合させるためのスラット用試料添加皿と、前記インキュベータの他方の側に設けられ、試薬を収納するための試薬冷蔵領域とをさらに備える。

【0145】

本発明の他のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、前記スラット用試料添加皿の一方の側に設けられた、ブランクスラットスタッキング及びローディング機構をさ

50

らに備え、前記ブランクスラットスタッキング及びローディング機構は、ブランクスラットをスラット用試料添加皿に押し付けるのに用いられる。

【0146】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、サンプル試験管を支持するためのサンプル試験管載置棚をさらに備える。

【0147】

本発明の他のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、前記サンプル試験管載置棚におけるブランクスラットスタッキング及びローディング機構に近隣する側に設けられ、予備希釈プレートに対して希釈処理するための希釈プレートシェーカーをさらに備える。

10

【0148】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、試料添加針が設けられている機械式アームをさらに備え、

前記機械式アームは、前記サンプル試験管載置棚領域からサンプルを吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第1の機械式アームと、前記試薬冷蔵領域から試薬を吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第2の機械式アームとを有する。

【0149】

本発明の他のいくつかの具体的な実施の形態では、前記装置は、第1の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第1の洗浄機構と、第2の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第2の洗浄機構とをさらに備える。

20

【0150】

具体的には、サンプルがインキュベータに入る前に、以下のステップが行われる必要がある。

1. ブランクスラットがブランクスラットスタッキング及びローディング機構によってスラット用試料添加皿の位置D0に押し付けられる。

2. ブランクスラットがスラット用試料添加皿の位置D0に押し付けられた後、スラット用試料添加皿の位置D1まで時計回りに90度回転させ、この位置で、第1の機械式アームでサンプル試験管載置棚領域からサンプルを吸引してブランクスラットに試料添加する。

30

3. 試料添加完了後のスラットを、スラット用試料添加皿の位置D2まで時計回りに90度回転させ、この位置では動作なし。

4. スラットを、スラット用試料添加皿の位置D3まで時計回りに90度回転させ、この位置では、第2の機械式アームで試薬冷蔵領域から試薬を吸引して、当該位置にあるスラット内に割り当てる。

【0151】

位置D3にある全てのスラットの試料添加が完了し、そして全てインキュベータに押し込まれた後(その押し出し機構は未図示)、スラット用試料添加皿を位置D3から位置D0まで回転させ(この工程は、位置D1にあるスラットがサンプル割り当てを完了した後に行われる。)、スラット用試料添加皿の1回のサイクルが完了する。スラット用試料添加皿が全負荷で運転するとき、スラット用試料添加皿の位置D0ではブランクスラットがローディングされ、位置D1ではサンプルの割り当てが行われ、位置D2では待機中、位置D3では試薬の割り当てが行われ、そして試薬割り当て後にスラットがインキュベータに押し込まれる。スラット用試料添加皿の回転は、D0~D3の4つの領域内の動作が全て完了するまで待たなければならない。

40

【0152】

試料添加完了後のスラットが第1のインキュベータに入った後、スラットが押し出し機構によって第2のインキュベータに送られ、この工程において、測定対象サンプルと試薬が含まれるスラットに標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加える必要もあり、その後サンプルを第2のインキュベータ12に入れ、インキュベートされ、インキュベートさ

50

れた後に、スラットが押し出し機構によって読み取りユニットに送られ励起光に照射され、出射光量を検出し、1回目の読み取りを記録する。1回目の読み取りが完了した後のスラットが押し戻し機構によって第2のインキュベータに押し戻され再度インキュベートされ、再度インキュベートされた後に、前記スラットは再び押し出し機構によって読み取りユニットに送られ励起光に照射され、出射光量を検出し、2回目の読み取りを記録する。2回の読み取りが完了した後に、処理ユニットによって2回の読み取りが処理され、2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えている場合、当該免疫測定にはH O O Kのリスクが存在すると判定する。一つの方法としては、その装置が定性的にH O O Kに関する提示情報を与え、作業者がサンプルを希釈してから再度測定することである。もう一つの方法としては、その装置が直接に定量的な結果を与えることであるが、その結果は線形性範囲よりも遥かに高くなっている。

10

【0153】

従来技術と比べて、本発明の利点としては、この装置は読み取りユニットを設けることにより、読み取りユニットでインキュベートされた後の混合液に対して2回乃至複数回の読み取りを実行し、そして処理ユニットで読み取りユニットによる読み取りを処理することによって、免疫測定にはH O O Kのリスクが存在するかどうかを判定し、H O O K効果に起因する、測定対象サンプルに対してその濃度が検出用キットの線形性範囲を超えたためか、それともそれ自体の濃度がその値であるかを正しく区別できないことを回避し、実験上の誤診を回避することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0154】

以下、本発明について、添付の図面を参照しながらより詳細に説明する。

【0155】

【図1】本発明に係るH D - H O O K効果サンプルを同定する測定装置及び免疫測定装置の筐体内部構成を示す図一である。

【図2】本発明に係るH D - H O O K効果サンプルを同定する測定装置及び免疫測定装置の筐体内部構成を示す図二である。

【図3】本発明に係るH D - H O O K効果サンプルを同定する測定装置及び免疫測定装置の押し戻し機構を示す図一である。

【図4】本発明に係るH D - H O O K効果サンプルを同定する測定装置及び免疫測定装置の押し戻し機構を示す図二である。

30

【図5】本発明に係るH D - H O O K効果サンプルを同定する測定装置及び免疫測定装置を示す図一である。

【図6】本発明に係るH D - H O O K効果サンプルを同定する測定装置及び免疫測定装置を示す図二である。

【図7】本発明に係るH D - H O O K効果サンプルを同定する測定装置及び免疫測定装置の一つの完全な測定フローを示すシーケンスチャートである。

【図8】H C G + における従来の方法を用いて得られた信号値とサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図9】H C G + における本発明の方法を用いて得られた信号値及びAのそれぞれとサンプル濃度との関係を示すグラフである。

40

【図10】F e r rにおける従来の方法を用いて得られた信号値とサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図11】F e r rにおける本発明の方法を用いて得られた信号値及びAのそれぞれとサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図12】C ペプチドにおける従来の方法を用いて得られた信号値とサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図13】C ペプチドにおける本発明の方法を用いて得られた信号値及びAのそれぞれとサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図14】H B s A bにおける従来の方法を用いて得られた信号値とサンプル濃度との関

50

係を示すグラフである。

【図15】H B s A bにおける本発明の方法を用いて得られた信号値及びAのそれぞれとサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図16】I N Sにおける従来の方法を用いて得られた信号値とサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図17】I N Sにおける本発明の方法を用いて得られた1回目の読み取り信号及び増幅Aとサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図18】H B s A bにおける従来の方法を用いて得られた信号値とサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図19】H B s A bにおける本発明の方法を用いて得られた1回目の読み取り信号及び増幅Aとサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図20】A F Pにおける従来の方法を用いて得られた信号値とサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図21】A F Pにおける本発明の方法を用いて得られた1回目の読み取り信号及び増幅Aとサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図22】T S Hにおける従来の方法を用いて得られた信号値とサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図23】T S Hにおける本発明の方法を用いて得られた1回目の読み取り信号及び増幅Aとサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図24】F e r rにおける従来の方法を用いて得られた信号値とサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図25】F e r rにおける本発明の方法を用いて得られた1回目の読み取り信号及び増幅Aとサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図26】Cペプチドにおける従来の方法を用いて得られた信号値とサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図27】Cペプチドにおける本発明の方法を用いて得られた1回目の読み取り信号及び増幅Aとサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図28】H B s A bにおける従来の方法を用いて得られた信号値とサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【図29】H B s A bドにおける本発明の方法を用いて得られた1回目の読み取り信号及び増幅Aとサンプル濃度との関係を示すグラフである。

【0156】

図面において、同一の構成要素については、同一の参照番号で示される。図面は実際の比例を反映するわけではない。

【発明を実施するための形態】

【0157】

本発明の具体的な実施の形態についてさらに説明する前に、本発明の保護範囲は下記の特定の具体的な実施の形態に限定されないことを理解されたい。また、本発明の実施例で使用される用語は特定の具体的な実施の形態を説明するために用いられるものであり、本発明の保護範囲を限定するためのものではないことを理解されたい。

【0158】

実施例で数値の範囲が与えられた場合、特に断らない限り、各数値範囲の両端点及び両端点間のいずれかの数値を用いることができることを理解されたい。別途に定義されない限り、本発明で用いられるすべての技術的用語および科学的用語は、当業者によって通常に理解される意味と同義である。実施例で用いられた具体的な方法、デバイス、材料の他に、当業者による従来技術への理解及び本発明の記載に基づいて、実施例に記載された方法、デバイス、材料と類似または同等する従来技術のいずれの方法、デバイス及び材料を利用して本発明を実現することもできる。

【0159】

特に断らない限り、本発明において開示される実験方法、検出方法および調製方法は

10

20

30

40

50

ずれも本技術分野における従来の分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、分析化学、細胞培養、組み換えDNA技術、ならびに関連分野における従来技術を採用するものである。これらの技術は、従来の文献において十分に説明されている。具体的には、SambrookなどのMOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001 ; Ausubelなど, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates ; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego ; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998 ; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, Chromatin (P.M. Wassarman and A.P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999 ; 及びMETHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, Chromatin Protocols (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999などを参照されたい。

10

20

30

40

50

【0160】

本発明者らが鋭意検討した結果、反応を中断することなく2回の読み取りを設け、2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較することによって、測定対象サンプルを希釈してから測定する必要があるか否かを判定することができ、又は、2回の読み取りの増幅Aとサンプル濃度との関係を確立して、2回の読み取りによって検出範囲を広げることによって、検出過程において、その濃度を簡便かつ迅速に算出することができ、又は、2回の読み取りの増幅とサンプルがHD-HOOK効果サンプルであるかどうかとの関係を検討することによって、Double-Anti Sandwich ImmunoassayにおけるHD-HOOK効果による偽陰性を簡便で効果的に排除することができ、そしてDouble-Anti Sandwich Immunoassayの正確性を向上させることができることを見出した。また、本発明者らは、インキュベートされた後の混合液に対して2回又は2回以上の読み取りを実行することができ、上記のHD-HOOK効果サンプルを同定する方法及び免疫測定方法を実施することができる、測定装置をさらに提供した。

【0161】

図1および図2に示すように、本発明に係るHD-HOOK効果サンプルを同定する測定装置及び免疫測定装置の筐体内部構成の概略図を示している。それは、

第1のインキュベータ11および第2のインキュベータ12を有し、化学発光免疫反応のために適切な環境温度を提供するためのインキュベータ1と、

光電子増倍管またはレーザー発振機とされてもよく、化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して2回の読み取りを実行するための読み取りユニット2と、

前記インキュベータ1と前記読み取りユニット2との間に設置され、インキュベータ1を横断する第1の押し機構31と第1の押し機構3の末端に接続され筐体内部に位置する第2の押し機構32とを有する押し機構3と、備える。

【0162】

第1の押し機構31と第2の押し機構32とが連携して、第1のインキュベータ11内でインキュベートされた後のスラットを読み取りユニット2に送り1回目の読み取りを実行するのに用いられ、そして第2のインキュベータ12内でインキュベートされた後のスラットを読み取りユニット2に送り2回目の読み取りを実行するのに用いられるものである。

【0163】

前記スラットは、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプル、第1の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体（または抗原）の混合液である。前記混合液には、さらに標識物特異結合物で標識された感光微粒子が加えられている。

【0164】

前記読み取りユニット2と前記第2のインキュベータ12との間に設置された押戻し機構は、図3に示す押戻し機構は直線レール押戻し機構4とされ、図4に示す押戻し機構は可変レール押戻し機構4とされ、この2種類の押戻し機構はいずれも1回目の読み取り完了後のスラットを第2のインキュベータ12に押戻し再度インキュベートするのに用いられる。

【0165】

1回目の読み取りでは、インキュベートされた後のスラットに励起光を照射して出射光量を検出し、2回目の読み取りでは、再度インキュベートされた後のスラットに励起光を照射して出射光量を検出する。

【0166】

処理ユニット（未図示）は、2回目の読み取りおよび1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えていると、スラットを希釈してから測定する。前記標準曲線は、測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅に基づいて作成されたものであり、前記標準物質の濃度は、H O O K効果が生じる濃度よりも低い。ここで、前記処理ユニットは前記読み取りに対して処理やプロットなどをするコンピュータとされてもよい。

【0167】

インキュベータを第1のインキュベータおよび第2のインキュベータとして設定されたのは、免疫測定装置の機械的実現を容易にするためのものであり、本発明はこれに限定されないを理解されたい。

【0168】

同様に、前記移動機構も機械式アーム掴み取り型とされてもよく、前記復帰機構も機械式アーム掴み取り型とされてもよく、本発明はこれに限定されないを理解されたい。

【0169】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、前記押戻し機構は、
底板41と、
前記底板41に設けられているガイドレールと、
前記ガイドレールに設けられ、スラットを支持するための移動カップ機構43と、
前記移動カップ機構43を前記ガイドレールに沿って移動させるための駆動装置と、
前記底板41の両端に設けられ、センサストッパ片46に接続され、センサストッパ片46によって前記移動カップ機構43の位置を検出する光電センサ45と、
前記光電センサ45に接続され、前記光電センサ45によって発せられた位置信号に基づいて前記移動カップ機構43の位置を調整することができる位置調整機構と、を備え、
前記ガイドレールは、図3に示すように直線レール421とされ、また図4に示すように可変レール422とされてもよい。

前記駆動装置は、具体的には、ステッピングモータ441を有し、前記ステッピングモータ441はモータ固定板442を介して前記ガイドレール2の一端に固定され、前記ステッピングモータ441の出力端にはタイミングプーリ443が設けられており、前記ガイドレール2の他端にはアイドルプーリ444が設けられており、前記タイミングプーリ443と前記アイドルプーリ444にはタイミングベルト445が掛けられている。前記アイドルプーリ444の軸心にはアイドルシャフト446が穿設され、前記アイドルシャフト446がアイドルプレート447に固定されている。

前記移動カップ機構43は、移動カップドラッグ板431と、前記移動カップドラッグ板431に接続される移動カップ接続板432とを有し、前記移動カップ接続板432はタイミングベルト押さえ板448を介して前記タイミングベルト445に接続されている。

10

20

30

40

50

前記位置調整機構は、具体的には、位置調整板 4 6 とコントローラ（未図示）とを有し、前記コントローラは前記位置調整板 4 6 と前記光電センサ 4 5 にそれぞれ接続され、前記コントローラは受信した光電センサ 4 5 からの位置信号によって位置調整板 4 6 を制御して移動カップ機構 4 3 の位置を調整する。一般に、その位置調整機構は微調整に用いられ、移動カップ機構 4 3 が指定位置に到達していないとき又は到達した位置がずれているときに、その位置調整機構はそれを微調整するようにされている。

【0170】

本発明の他のいくつかの具体的な実施例では、図 5 に示すように、その装置は、前記インキュベータ 1 の一方の側に設けられた、回転可能なスラット用試料添加皿 5 をさらに有し、ブランクスラットは前記スラット用試料添加皿 5 で測定対象サンプルと試薬との混合を完了し、前記サンプルは測定すべき目標抗原（または抗体）が含まれ、前記試薬は第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）である。

10

【0171】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、その装置は、前記インキュベータ 1 の他方の側に設けられた、試薬を収納するための試薬冷蔵領域 8 をさらに備える。

【0172】

本発明の他のいくつかの具体的な実施例では、前記スラット用試料添加皿 5 の一方の側に設けられた、ブランクスラットをスラット用試料添加皿 5 に押し付けるためのブランクスラットスタッキング及びローディング機構 6 をさらに備える。

20

【0173】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、サンプル試験管を支持するためのサンプル試験管載置棚 7 をさらに備える。

【0174】

本発明の他のいくつかの具体的な実施例では、試料添加針が設けられている機械式アーム（未図示）をさらに備え、

前記機械式アームは、前記サンプル試験管載置棚領域からサンプルを吸引するための第 1 の機械式アームと、前記試薬冷蔵領域から試薬を吸引するための第 2 の機械式アームとを有する。

【0175】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、第 1 の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第 1 の洗浄機構 9 と、第 2 の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第 2 の洗浄機構 10 とをさらに備える。

30

【0176】

直線レール 4 2 1 とした場合、当該モジュールの長さが長くなり、筐体（すなわち、図 1 および図 2 に示す全体構成）およびポンプ 11 の位置が（図 5 に示すように）比較的コンパクトになり、着脱が複雑になる。可変レール 4 2 2 とすると、一実施形態として、前記可変レール 4 2 2 は曲線状のガイドレールとして設計されてもよく、当該モジュールの幅が広くなり、筐体および第 2 の洗浄機構 10 の位置が（図 6 に示すように）比較的コンパクトになるが、着脱には影響がない。

40

【0177】

具体的には、サンプルがインキュベータ 1 に入る前に、以下のステップが行われる必要がある。

1. ブランクスラットがブランクスラットスタッキング及びローディング機構 6 によってスラット用試料添加皿 5 の位置 D 0 に押し付けられる。

2. ブランクスラットがスラット用試料添加皿 5 に押し付けられた後、スラット用試料添加皿の位置 D 1 まで時計回りに 90 度回転させ、この位置で、第 1 の機械式アームでサンプル試験管載置棚領域 7 からサンプルを吸引してブランクスラットに試料添加する。

3. 試料添加完了後のスラットを、スラット用試料添加皿の位置 D 2 まで時計回りに 90 度回転させ、この位置では動作なし。

50

4. スラットを、スラット用試料添加皿の位置 D 3 まで時計回りに 90 度回転させ、この位置では、第 2 の機械式アームで試薬冷蔵領域 8 から試薬を吸引して、当該位置にあるスラット内に割り当てる。

【0178】

位置 D 3 にある全てのスラットの試料添加が完了し、そして全てインキュベータ 1 に押し込まれた後、スラット用試料添加皿 5 を位置 D 3 から位置 D 0 まで回転させ（この工程は、位置 D 1 にあるスラットがサンプル割り当てを完了した後に行われる。）、スラット用試料添加皿 5 の 1 回のサイクルが完了する。スラット用試料添加皿が全負荷で運転するとき、スラット用試料添加皿 5 の位置 D 0 ではブランクスラットがローディングされ、位置 D 1 ではサンプルの割り当てが行われ、位置 D 2 では待機中、位置 D 3 では試薬の割り
10
当てが行われ、そして試薬割り当て後にスラットがインキュベータ 1 に押し込まれる。スラット用試料添加皿 5 の回転は、D 0 ~ D 3 の 4 つの領域内の動作が全て完了するまで待たなければならない。

【0179】

試料添加完了後のスラットが第 1 のインキュベータ 1 1 に入った後、前記スラットが押し出し機構 3 によって第 2 のインキュベータに送られ、この工程において、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、その後スラットを第 2 のインキュベータ 1 2 に入れインキュベートされ、スラットが押し出し機構 3 によって読み取りユニット 2 に送られ励起光に照射され、出射光量を検出し、1 回目の読み取りを記録する。1 回目の読み取りが完了した後のスラットが直線レール押し戻し機構 4 又は可変レール押し戻し機構 4 によって第 2
20
のインキュベータ 1 2 に押し戻され再度インキュベートされ、再度インキュベートされた後に、前記スラットは再び押し出し機構 3 によって読み取りユニット 2 に送られ励起光に照射され、出射光量を検出し、2 回目の読み取りを記録する。

【0180】

2 回の読み取りが完了した後に、処理ユニット 2 によって 2 回の読み取りが処理され、2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えている場合、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの 1 回目の読み取りが前記既知の標準物質よりも低くなっている場合、一つの方法としては、その装置が定性的に H O O K に関する提示情報を与え、作業者がサンプルを希釈してから再度測定することであり、もう一つの方法としては、その装置が直接に定量的な結果を与えることであるが、その結果は線形性範囲よりも
30
遥かに高くなっている。図 7 は一つの完全な測定フローを示すシーケンスチャートであり、この図は希釈フローなしの測定シーケンスチャートである。図面では、a、b、c、d および e は、それぞれ、第 1 群のスラット、第 2 群のスラット、第 3 群のスラット、第 4 群のスラットおよび第 5 群のスラットを表す。

【0181】

1) 仮に、毎回 8 つのブランクスラットをブランクスラットスタッキング及びローディング機構 6 からスラット用試料添加皿 5 に押し込まれるとすると、この工程は約 20 秒かかり、図 7 では無視される。

2) スラット用試料添加皿 5 の回転時間は無視される。

3) ブランクスラットを位置 D 1 まで回転させると、スラットはその位置 D 1 でサンプルの割り当てが行われ、図 7 の D 1 に示す位置では、仮にサンプルの割り当てが 1 吸引 8 分けを採用して、一つのサンプルを異なる 8 つのスラット内に割り当て、組毎の試料添加動作が 30 秒かかるとすると、8 つのスラットで合計 240 秒かかることになる。
40

4) スラットは位置 D 3 で試薬の割り当てが行われ、図 7 の D 3 に示す位置では、仮に試薬の割り当てが 1 吸引 8 分けを採用して、試薬 R 1 の割り当てが完了した直後に試薬 R 2 の割り当てが行われ、仮にスラット毎に試薬を割り当てる時間が 30 秒かかるとすると、8 つのスラットで合計 480 秒かかることになる。

5) スラットが位置 D 3 から第 1 のインキュベータ 1 1 に送られる時間は無視され、この工程は、第 2 の機械式アームによって試料添加針を洗浄するときに完了させることができる。
50

6) 図7のFは1回目のインキュベーションの時間を示す。

7) 各スラットに感光微粒子を割り当てる時間は図7では無視され、汎用液装填領域12は図5および図6に示す通りである。

8) 図7のFは2回目のインキュベーションの時間を表す。

9) 図7のGは、読み取りユニットで1つのスラットを読み取る時間(機械移動及びスラットの廃棄時間を含む)を示す。

【0182】

上記工程では、試薬割当段階において2種類の試薬R1およびR2が割り当てられたが、3種類の試薬R1、R2およびR3が割り当てられるとされてもよいことを理解されたい。仮に、試薬R1、R2およびR3はいずれもサンプル割り当て完了後に添加されるとすると、例えば、HBeAbの場合には、R3は50 μ lの中和e抗原であり、運転過程はR1およびR2のみの場合と類似し、ただ試薬割当段階ではもう1つの試薬が加えられただけで、R1、R2およびR3の割り当ての順序が任意である。

10

【0183】

同様に、R1、R2およびR3のうちの1種がサンプル割当前に添加されることを理解されたい。例えばCA19-9の場合には、R3は15 μ lのサンプル希釈液であり、位置D1で第2の機械式アームを用いて1種の試薬の割り当てを完了して、そして第1の機械式アームでサンプルの割り当てを完了するとされ、その他の工程はR1およびR2のみの場合と同様である。

【0184】

同様に、R1、R2およびR3のうち、R3は予備希釈液であり、予備希釈プレートが必要とされることを理解されたい。例えば、HCVの場合には、10 μ lのサンプルに100 μ lの希釈液を加え、そして25 μ lの希釈後のサンプルを採取して試験に使用する。ブランクスラットをD1まで回転させた後、第2の機械式アームで希釈液R3を予備希釈プレートに割り当て、第1の機械式アームでサンプルを予備希釈プレートに割り当て、必要があれば繰り返して吸引押出することができ、ここで、希釈液の割り当て工程では、1吸引複数分けの連合試料添加を行うことができ、例えば、5つのアイテムで実施し、1つは予備希釈が必要とされ、他の4つは予備希釈が不要とされるとすると、第1の機械式アームで5部のサンプルを吸引して、1部は予備希釈プレート内に割り当て、他の4部はブランクスラットに割り当てる。その後、予備希釈プレートに対して震盪処理を行い、図5および図6を参照すると、サンプル試験管載置棚7におけるブランクスラットスタッキング及びローディング機構6に隣接する側に希釈プレートシェーカー11が設けられており、震盪処理後に、第1の機械式アームで希釈後のサンプルをスラット内に割り当てる。その後の工程は、R1およびR2のみの場合と一致しているので、ここでは説明を省略する。

20

30

【0185】

本発明で述べたとおり、用語「第1の抗体」および「第2の抗体」は、ある抗原(例えば、腫瘍マーカー)に特異的に結合可能な抗体をいう。同一の抗原(例えば、腫瘍マーカー)に対して、対応する第1の抗体及び第2の抗体は同じでも異なってもよく、そして同時に前記抗原に結合することができる。用語「第1の抗原」および「第2の抗原」は、ある抗体(例えば、B型肝炎表面抗体)に特異的に結合可能な抗原をいう。同一の抗体(例えば、B型肝炎表面抗体)に対して、対応する第1の抗原及び第2の抗原は同じでも異なってもよく、そして同時に前記抗体に結合することができる。

40

【0186】

本発明で述べたとおり、用語「抗原」とは免疫原性を有する物質をいい、例えば、タンパク質、ポリペプチドが挙げられる。代表的な抗原(これに限定されるものではない)として、サイトカイン、腫瘍マーカー、メタロプロテイン、心血管糖尿病関連タンパク質などが挙げられる。

【0187】

本発明で述べたとおり、用語「腫瘍マーカー」とは、腫瘍の発生と増殖中において、腫

50

瘍細胞自体によって生成され、または有機体による腫瘍細胞に対する反応によって生成され、腫瘍の存在および成長を反映するような物質をいう。本分野における代表的な腫瘍マーカー（これに限定されるものではない）としては、アルファフェトプロテイン（AFP）、癌抗原125（CA125）などが挙げられる。

【0188】

Double - Anti Sandwich Immunoassayの基本原理は以下のとおりである。

Double - Antibody Sandwich Immunoassayの基本原理は当業者には周知である。従来のやり方では、第1の抗体を固相担体に固定化した後、第1の抗体を抗原に反応させてから、標識された第2の抗体に反応させ、最後に化学発光またはEnzyme - Linked Immune Sorbent Assayを行い信号を検出するようにされている。

10

【0189】

光励起化学発光法の基本原理は以下のとおりである。

光励起化学発光法の基本原理は当業者には周知である。従来のやり方では、感光微粒子と発光微粒子を一定の範囲内で結合させることで、イオン化酸素エネルギーの伝達が発生し、光信号が発せられることによって、測定対象サンプルを検出するものとされている。ここで、感光微粒子の内部に感光化合物が充填されて、発光微粒子の内部に発光化合物とランタノイド族元素が充填されている。赤色レーザ光（600～700nm）の励起で、感光微粒子はエネルギーの高い状態の一重項酸素イオン（4 μ S）を放出し、その伝播距離は約200nmとされている。感光微粒子と発光微粒子の距離が十分に接近すると、感光微粒子が放出した一重項酸素イオンが発光微粒子に到達することができ、そして一連の化学反応により、520～620nmの高いエネルギー準位の光を放出し、機器によって検出される。

20

【0190】

本発明の1つの好ましい実施例では、第1の抗体が発光微粒子に固定化されたという特徴を十分に利用するとともに、ビオチンで標識された第2の抗体、ストレプトアビジンによって被覆された感光微粒子を採用して、血清サンプル又は抗原標準対照液と第1の抗体に被覆された発光微粒子、ビオチンで標識された第2の抗体を順次または同時に反応容器に添加し、次いでストレプトアビジンで標識された感光微粒子を添加することによって、以下のような反応が発生する。

30

（1）発光微粒子上の第1の抗体が血清サンプル又は抗原標準対照液における対応する抗原と結合して、「抗原 - 第1の抗体 - 発光微粒子」の三元複合体が形成される。

（2）第2の抗体が血清サンプル又は抗原標準対照液における対応する抗原と結合し、最後に「第2の抗体 - 抗原 - 第1の抗体 - 発光微粒子」となるDouble - Anti Sandwich複合体が形成される。

ビオチンとストレプトアビジンが特異的に結合することによって、Double - Anti Sandwich複合体を感光微粒子に結合させる。

【0191】

このとき、感光微粒子と発光微粒子との距離が200nm未満となり、感光微粒子が赤色励起光（600～700nm）で照射された後、放出した一重項酸素イオンが発光微粒子に受け取られる。一連の化学反応により、520～620nmの高いエネルギー準位の光を放出し、化学発光量の強弱で測定対象サンプルを定性的または定量的に検出する。

40

【0192】

本発明の他の好ましい実施例では、第1の抗原が発光微粒子に固定化されたという特徴を十分に利用するとともに、ビオチンで標識された第2の抗原、ストレプトアビジンによって被覆された感光微粒子を採用して、血清サンプル又は抗原標準対照液と第1の抗原に被覆された発光微粒子、ビオチンで標識された第2の抗原を順次または同時に反応容器に添加し、次いでストレプトアビジンで標識された感光微粒子を添加することによって、以下のような反応が発生する。

50

(1) 発光微粒子上の第1の抗原が血清サンプル又は抗原標準対照液における対応する抗体と結合して、「抗体 - 第1の抗原 - 発光微粒子」の三元複合体が形成される。

(2) 第2の抗原が血清サンプル又は抗原標準対照液における対応する抗体と結合し、最後に「第2の抗原 - 抗体 - 第1の抗原 - 発光微粒子」となるDouble - Anti Sandwich複合体が形成される。

ビオチンとストレプトアビジンが特異的に結合することによって、Double - Anti Sandwich複合体を感光微粒子に結合させる。

【0193】

このとき、感光微粒子と発光微粒子との距離が200nm未満となり、感光微粒子が赤色励起光(600~700nm)で照射された後、放出した一重項酸素イオンが発光微粒子に受け取られる。一連の化学反応により、520~620nmの高いエネルギー準位の光を放出し、化学出射光量の強弱で測定対象サンプルを定性的または定量的に検出する。

【0194】

以下、本発明の関連操作の詳細について、さらに説明する。

(1) 第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子を試薬1とし、博陽生物科技有限公司から購入することができる。

(2) 第2の抗体(または抗原)は、本分野で公知されている種々のマーカーおよびその特異的結合物系で標識され得る。第2の抗体(または抗原)がビオチン - アビジン系によって標識されるのが好ましい。ビオチンで標識された第2の抗体(または抗原)を試薬2とし、博陽生物科技有限公司から購入することができる。

(3) ストレプトアビジンによって被覆された感光微粒子を汎用液とし、博陽生物科技有限公司から購入することができる。

(4) 校正品

測定すべき目標抗原(または抗体)で一定の濃度範囲内(ピーク校正品の濃度はHD - HOOK効果濃度に等しい)の既知の標準物質溶液を調製する。校正品、試薬1および試薬2を均一に混合し、インキュベーション反応後にLIC汎用液を添加し、続けてしばらくインキュベートした後に1回目の読み取り(RLU1)を実行し、もうしばらくインキュベートした後に2回目の読み取り(RLU2)を実行し、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を計算し、標準物質のRLU1および2回の読み取りの増幅Aに基づいてそれぞれ標準物質濃度と校正曲線及び標準曲線を作成する。標準物質のRLU1と濃度との校正曲線は、非HD - HOOK効果段階では、RLU1が濃度の上昇とともに増加すると表現され、RLU1の上昇区間とし、濃度がHD - HOOK効果段階まで増加した後、RLU1が濃度の上昇とともに減少すると表現され、RLU1の下降区間とする。標準物質の2回の読み取りの増幅と濃度との標準曲線は、増幅が濃度の上昇とともに増加すると表現され、HD - HOOK効果に影響されない。

既知標準物質溶液の濃度範囲は、必要に応じて、HD - HOOK効果濃度を跨いでもよく、又はHD - HOOK効果濃度未満であってもよい。

(5) サンプルの検出

本発明の方法によって検出可能なサンプルは、特に限定されず、抗原(または抗体)を含む任意のサンプルであればよく、代表的な例としては、血清サンプル、尿サンプル、唾液サンプルなどが挙げられる。血清サンプルが好ましい。

(6) サンプル濃度計算

測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aの値を校正品のAと比較して、測定対象サンプルのAが校正品のAを超えている場合、このサンプルの濃度が校正品の濃度より大きいとされ、それと同時に、このサンプルのRLU1がこの校正品のRLU1より小さくなる場合、このサンプルのRLU1の低さがHD - HOOK効果に起因するものであり、希釈して検出する必要があることが示される。

あるいは、測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aの値を校正品のAと校正品の濃度との標準曲線に代入し、測定対象サンプルの濃度がRLU1の上昇区間にあるかそれとも下降区間にあるかを判断し、そして測定対象サンプルのRLU1を所在区間の校正品の

10

20

30

40

50

R L U 1 と校正品の濃度との校正曲線に代入し測定対象サンプルの濃度を算出する。

あるいは、測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A の値を H D - H O O K 効果の臨界値 R 0 と比較し、A が R 0 未満の場合、このサンプルが H D - H O O K 効果サンプルではなく、測定対象サンプルの R L U 1 を校正品の R L U 1 と校正品の濃度との校正曲線に代入し測定対象サンプルの濃度を算出する。A が R 0 以上の場合、このサンプルが H D - H O O K 効果サンプルであると同定し、希釈して検出する必要がある。

【 0 1 9 5 】

実施例 1 ヒト血清サンプルにおけるヒト絨毛性ゴナドトロピン及び サブユニット (H C G +) の検出

博陽生物科技 (上海) 有限公司製のヒト絨毛性ゴナドトロピン及び サブユニット (H C G +) 検出キット (光励起化学発光法) を採用して、血清サンプルにおけるヒト絨毛性ゴナドトロピン及び サブユニット (H C G +) の含有量を検出する。前記キットは、校正品 1 ~ 校正品 6 (すなわち、既知の一連の標準物質)、試薬 1 (発光抗体、すなわち、抗体によって被覆された発光微粒子)、試薬 2 (ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識された抗体) を含む。

10

【 0 1 9 6 】

[校正品 1 ~ 校正品 6] 従来キットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度は H O O K サンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【 0 1 9 7 】

[使用される他の成分] L i C A 汎用液 (ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)、この製品は博陽生物科技有限公司製の光励起化学発光分析システム用補助試薬である。それは、機器および対応する光励起化学発光法検出キットと一緒に使用され、抗原や抗体の検出に用いられる。

20

【 0 1 9 8 】

R o c h e 検出 (検出限界を超えたサンプルを希釈して検出する) によって得られた 1 8 人の H C G + 濃度被験者の血清サンプルについて、それぞれ従来方法および本発明の方法で検出する。

【 0 1 9 9 】

[従来検出方法] 測定対象サンプル、校正品、試薬 1 (発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された発光微粒子) および試薬 2 (ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル抗体) をキュベットに別々に加えた後、37 °C で 1 5 m i n インキュベートし、汎用液 (ストレプトアビジンで標識された感光微粒子) を加え、37 °C で 1 0 m i n インキュベートし、光子カウンタで読み取り、R L U を読み取り、サンプルの濃度を算出して、その結果を表 1 に示す。

30

【 0 2 0 0 】

[本発明の 2 回読み取り方法] 測定対象サンプル、校正品、試薬 1 (発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された発光微粒子) および試薬 2 (ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル抗体) を 3 7 °C で 1 5 m i n インキュベートし、汎用液 (ストレプトアビジンで標識された感光微粒子) を加え、37 °C で 3 m i n インキュベートし、R L U 1 を読み取り、37 °C で続けて 7 m i n インキュベートし、R L U 2 を読み取り、2 回目の信号値の増幅 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 1 0 0 \%$ を算出して、その結果を表 1 に示す。

40

【 0 2 0 1 】

【表 1】

表 1 従来の検出及び本発明の検出の結果

	サンプル	Roche 検出結果	従来の検出結果		本発明の検出結果			
		濃度 mIU/ml	RLU	濃度 mIU/ml	RLU1	RLU2	増幅 A	濃度 mIU/ml
校正品	校正品 1	/	1983	0	1993	1651	-17.2%	0
	校正品 2	/	11170	100	9873	6124	-38.0%	100
	校正品 3	/	73186	500	56006	39442	-29.6%	500
	校正品 4	/	171343	1000	153737	115945	-24.6%	1000
	校正品 5	/	872648	5000	798510	834788	4.5%	5000
	校正品 6	/	1445378	10000	1351347	1501961	11.1%	10000
測定対象サンプル	サンプル 1	147.7	14571	131.18	14390	9338	-35.1%	151.44
	サンプル 2	543.4	77284	521.85	69597	50276	-27.8%	582.05
	サンプル 3	1595	263783	1467.77	257403	223194	-13.3%	1510.45
	サンプル 4	2640	524358	2858.55	449878	434405	-3.4%	2576.9
	サンプル 5	3392	624970	3434.34	546275	543257	-0.6%	3179.16
	サンプル 6	5423	990911	5860.18	847724	901290	6.3%	5394.53
	サンプル 7	7148	1093690	6683.92	939086	1014240	8.0%	6157.43
	サンプル 8	7333	1112952	6846.58	998022	1090288	9.2%	6670.19
	サンプル 9	9989	1381284	9356.74	1311265	1441974	10.0%	9609.36
	サンプル 10	18179	1763185	>10000.00	1548022	1738768	12.3%	>10000.00
	サンプル 11	27644	2132171	>10000.00	1931997	2200548	13.9%	>10000.00
	サンプル 12	40992	2245202	>10000.00	2012723	2297704	14.2%	>10000.00
	サンプル 13	54531	2346216	>10000.00	2224037	2543796	14.4%	>10000.00
	サンプル 14	85660	2278130	>10000.00	2067277	2366320	14.5%	>10000.00
	サンプル 15	92038	2179811	>10000.00	1994236	2300927	15.4%	>10000.00
	サンプル 16	183338	1754015	>10000.00	1725072	2015247	16.8%	>10000.00
	サンプル 17	207682	1649920	>10000.00	1589155	1868936	17.6%	>10000.00
	サンプル 18	423574	1316175	8713.02	1273437	1518189	19.2%	>10000.00

【備考】HCG+ β の従来検出の検出範囲は0~10000mIU/mlであり、検出上限を超えたサンプルの濃度は10000mIU/mlとして表示される。

【0202】

Roche 検出結果を真実の濃度とする。表 1 および図 8 からわかるように、従来の検出では、濃度が 54531 mIU/ml に上昇するまでは信号値が濃度の上昇と共に増加し、濃度が上昇し続けると、信号値が HCG + 濃度の上昇と共に低下し、すなわち、濃度が 54531 mIU/ml を超えると、HD-HOOK 効果が発生する。従来の検出では、検出範囲が 0~10000 mIU/ml であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は >10000 mIU/ml として表示される。HD-HOOK 効果サンプルの濃度が上昇

10

20

30

40

50

し続けると、信号が低下し続けるので、サンプル18のように超高濃度サンプルが低濃度として報告されることになる。そのため、従来の検出では、測定対象サンプルの検出結果が、真実の濃度であるか、それともHD-HOOK効果の影響で低濃度として報告されたかを識別できなくなる。

【0203】

本発明の方法では、2回の読み取りによってHOOK効果に起因する報告濃度が低いサンプルを同定するようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果であるRLU1、RLU2を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度を判定するための指標の一つとする。表1および図9からわかるように、信号値が54531mIU/mlまでは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅Aは濃度とともに上昇し続けることになる。したがって、測定対象サンプルのAの値と校正品のAの値とを直接に比較すれば、測定対象サンプルの濃度と校正品の濃度との大小関係を判定することができる。サンプル10~18の増幅Aがいずれも校正品6の増幅(11.1%)を超えており、かつAの値が増加し続けるので、サンプル10~18のHCG+濃度はいずれも10000mIU/mlを超え、かつ濃度が上昇し続け、それはRocheの濃度結果と一致することが示されている。サンプル18の信号値が校正品6よりも低くなり、従来の方法では濃度が8713.02mIU/mlとして検出されるが、本発明の方法ではそれがHD-HOOK効果サンプルとして同定することができ、希釈して検出する必要がある。

10

【0204】

実施例2 サンプルにおけるフェリチン(Ferr)の検出

博陽生物科技(上海)有限公司製のフェリチン(Ferr)検出キット(化学発光法)を採用して、サンプルにおけるフェリチン(Ferr)(Fitzgeraldから購入、Catalog No:30-AF10)の含有量を検出する。前記キットは、校正品1~校正品6(すなわち、既知の一連の標準物質)、試薬1(発光抗体、すなわち、抗体によって被覆された発光微粒子)、試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識された抗体)を含む。

20

【0205】

[校正品1~校正品6]従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度はHOOKサンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

30

【0206】

[使用される他の成分]LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)、この製品は博陽生物科技有限公司製の光励起化学発光分析システム用補助試薬である。それは、機器および対応する光励起化学発光法検出キットと一緒に使用され、抗原や抗体の検出に用いられる。

【0207】

高濃度のフェリチン抗原を段階希釈し、異なる濃度のフェリチンを含むサンプルの濃度値を、それぞれ従来の検出方法および本発明の検出方法で測定する。

【0208】

[従来の検出方法]校正品1~校正品6、測定対象サンプル1~15、試薬1(発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル抗体)をキュベットに加えた後、37で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で10minインキュベートし、光子カウンタで読み取り、RLUを読み取り、その結果を表2に示す。

40

【0209】

[本発明の2回読み取り方法]校正品1~校正品6、測定対象サンプル1~15、試薬1(発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル

50

抗体)を37で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で3minインキュベートし、RLU1を読み取り、37で続けて7minインキュベートし、RLU2を読み取り、2回目の信号値の増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を算出して、その結果を表2に示す。

【0210】

【表2】

表2 従来の検出及び本発明の検出の結果

サンプル	実際濃度	従来の検出結果		本発明の検出結果				
	濃度 ng/ml	RLU	濃度 ng/ml	RLU1	RLU2	増幅 A	濃度 ng/ml	
校正品	校正品 1	0	1504	0	1301	982	-24.5%	0
	校正品 2	19.91	9470	19.91	8419	5699	-32.3%	19.91
	校正品 3	101.02	46702	101.02	39701	31854	-19.8%	101.02
	校正品 4	502.74	201992	502.74	177904	152780	-14.1%	502.74
	校正品 5	994.36	382044	994.36	336189	299061	-11.0%	994.36
	校正品 6	2232.94	745316	2232.94	701657	662840	-5.5%	2232.94
測定対象サンプル	サンプル 1	20	10008	21.21	9010	6256	-30.6%	21.53
	サンプル 2	200	83614	184.44	75542	63340	-16.2%	196.81
	サンプル 3	2000	688675	>2000	635950	595131	-6.4%	>2000
	サンプル 4	5100	1131402	>2000	1083169	1077907	-0.5%	>2000
	サンプル 5	10200	1684984	>2000	1448123	1526161	5.4%	>2000
	サンプル 6	15300	1966033	>2000	1776540	1926924	8.5%	>2000
	サンプル 7	20400	2132659	>2000	1907869	2132148	11.8%	>2000
	サンプル 8	25500	2288952	>2000	1999686	2251677	12.6%	>2000
	サンプル 9	51000	2378260	>2000	2113558	2407210	13.9%	>2000
	サンプル 10	102000	2304238	>2000	2094861	2392541	14.2%	>2000
	サンプル 11	153000	2163232	>2000	1903523	2210245	16.1%	>2000
	サンプル 12	204000	1958628	>2000	1740069	2031467	16.7%	>2000
	サンプル 13	255000	1777808	>2000	1615030	1899252	17.6%	>2000
	サンプル 14	510000	1401282	>2000	1162934	1398233	20.2%	>2000
	サンプル 15	2550000	646266	1860.97	538637	668007	24.0%	>2000

【備考】フェリチンの従来検出の検出範囲は0~2000ng/mlであり、検出上限を超えたサンプルの濃度は>2000ng/mlとして表示される。

【0211】

従来の検出では、表2および図10からわかるように、濃度が51000ng/mlに上昇するまでは信号値が濃度の上昇と共に増加し、濃度が上昇し続けると、信号値がFerr濃度の上昇と共に低下し、従来の検出範囲が0~2000ng/mlであり、検出上限を超えたサンプルの濃度は>2000ng/mlとして表示される。HD-HOOK効果サンプルの濃度が上昇し続け、濃度が2550000ng/mlまで上昇し、信号が校正品6の信号以下に低下すると、サンプル15のように超高濃度サンプルが低濃度として報告されることになる。そのため、従来の検出では、測定対象サンプルの検出結果が、真実の濃度であるか、それともHD-HOOK効果の影響で低濃度として報告されたかを識

別できなくなる。

【0212】

本発明の方法では、2回の読み取りによってH O O K効果に起因する報告濃度が低いサンプルを同定するようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果であるR L U 1、R L U 2を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度を判定するための指標の一つとする。表2および図11からわかるように、信号値が51000 ng/mlまでは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅Aは濃度とともに上昇し続けることになる。したがって、測定対象サンプルのAの値と校正品のAの値とを直接に比較すれば、測定対象サンプルの濃度と校正品の濃度との大小関係を判定することができる。サンプル4~15の増幅Aがいずれも校正品6の増幅(-5.5%)を超えているので、サンプル4~15のF e r r濃度はいずれも2000 ng/mlを超えていることが示されている。それは実際の濃度に合致しており、サンプル15の信号値が校正品6よりも低くなり、従来の方法では濃度が1860.97 ng/mlとして検出されるが、本発明の方法では、それは濃度が検出範囲を超えたサンプルとして同定することができ、希釈して検出する必要がある。

10

【0213】

実施例3 サンプルにおけるCペプチド(CP)の検出

博陽生物科技(上海)有限公司製のCペプチド(CP)検出キット(化学発光法)を採用して、サンプルにおけるCペプチド(F i t z g e r a l dから購入、C a t a l o g N o : 30 - A C 96)の含有量を検出する。前記キットは、校正品1~校正品6(すなわち、既知の一連の標準物質)、試薬1(発光抗体、すなわち、抗体によって被覆された発光微粒子)、試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識された抗体)を含む。

20

【0214】

[校正品1~校正品6]従来キットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度はH O O Kサンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【0215】

[使用される他の成分]L i C A汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)、この製品は博陽生物科技有限公司製の光励起化学発光分析システム用補助試薬である。それは、機器および対応する光励起化学発光法検出キットと一緒に使用され、抗原や抗体の検出に用いられる。

30

【0216】

高濃度のCペプチド抗原を段階希釈し、異なる濃度のCペプチドを含むサンプルの濃度値を、それぞれ従来検出方法および本発明の検出方法で測定する。

【0217】

[従来検出方法]校正品1~校正品6、測定対象サンプル1~15、試薬1(発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル抗体)をキュベットに加えた後、37で15minインキュベートし、L i C A汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で10minインキュベートし、光子カウンタで読み取り、R L Uを読み取り、その結果を表3に示す。

40

【0218】

[本発明の2回読み取り方法]校正品1~校正品6、測定対象サンプル1~15、試薬1(発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル抗体)を37で15minインキュベートし、L i C A汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で3minインキュベートし、R L U 1を読み取り、37で続けて7minインキュベートし、R L U 2を読み取り、2回目の信号値の

50

増幅 A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) × 1 0 0 % を算出して、その結果を表 3 に示す。

【 0 2 1 9 】

【 表 3 】

表 3 従来の検出及び本発明の検出の結果

サンプル	実際濃度	従来の検出結果		本発明の検出結果				
	濃度 ng/ml	RLU	濃度 ng/ml	RLU1	RLU2	増幅 A	濃度 ng/ml	
校正品	校正品 1	0	304	0	302	331	9.6%	0
	校正品 2	0.59	2035	0.59	1778	1308	-26.4%	0.59
	校正品 3	0.85	2539	0.85	2625	2016	-23.2%	0.85
	校正品 4	6.02	11619	6.02	9717	8017	-17.5%	6.02
	校正品 5	12.05	23261	12.05	21432	18465	-13.8%	12.05
	校正品 6	33.31	55424	33.31	47809	45456	-4.9%	33.31
測定対象サンプル	サンプル 1	1	2912	1.06	2900	2251	-22.4%	0.93
	サンプル 2	3	6499	3.12	5729	4545	-20.7%	2.37
	サンプル 3	10	20345	10.54	16747	13986	-16.5%	10.13
	サンプル 4	33	56700	>30	44852	42492	-5.3%	>30
	サンプル 5	100	162356	>30	132253	139349	5.4%	>30
	サンプル 6	335	435784	>30	359060	409421	14.0%	>30
	サンプル 7	1000	1458246	>30	1147167	1367003	19.2%	>30
	サンプル 8	3350	2610397	>30	2305534	2785700	20.8%	>30
	サンプル 9	10000	3170807	>30	2669419	3292270	23.3%	>30
	サンプル 10	33500	2998354	>30	2376362	2986650	25.7%	>30
	サンプル 11	100000	2165769	>30	1717649	2233121	30.0%	>30
	サンプル 12	335000	946947	>30	742994	981144	32.1%	>30
	サンプル 13	1000000	363059	>30	297572	398779	34.0%	>30
	サンプル 14	3350000	162871	>30	135756	184090	35.6%	>30
	サンプル 15	10000000	58143	>30	46580	64473	38.4%	>30
	サンプル 16	33500000	15674	8.15	12274	17359	41.4%	>30
	サンプル 17	100000000	2379	0.76	1902	2693	41.6%	>30

【備考】C ペプチドの従来の検出の検出範囲は 0~30ng/ml であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は >30ng/ml として表示される。

【 0 2 2 0 】

従来の検出では、表 3 および図 1 2 からわかるように、濃度が 1 0 0 0 0 n g / m l に上昇するまでは信号値が濃度の上昇と共に増加し、濃度が上昇し続けると、信号値が C ペプチド濃度の上昇と共に低下し、従来の検出範囲が 0 ~ 3 0 n g / m l であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は > 3 0 n g / m l として表示される。濃度が 3 3 5 0 0 0 0 0 n g / m l まで上昇し、信号が校正品 6 の信号以下に低下すると、サンプル 1 6 、 1 7 の

10

20

30

40

50

ように超高濃度サンプルが低濃度として報告されることになる。そのため、従来の検出では、測定対象サンプルの検出結果が、真実の濃度であるか、それともHD - HOOK効果の影響で低濃度として報告されたかを識別できなくなる。

【0221】

本発明の方法では、2回の読み取りによってHOOK効果に起因する報告濃度が低いサンプルを同定するようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果であるRLU1、RLU2を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度を判定するための指標の一つとする。表3および図13からわかるように、信号値が10000ng/mlまでは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅Aは濃度とともに上昇し続けることになる。したがって、測定対象サンプルのAの値と校正品のAの値とを直接に比較すれば、測定対象サンプルの濃度と校正品の濃度との大小関係を判定することができる。サンプル5~17の増幅Aがいずれも校正品6の増幅(-4.9%)を超えているので、サンプル5~17のCペプチド濃度はいずれも30ng/mlを超え、検出上限を超えていることが示されている。それは実際の濃度に合致しており、サンプル16、17の信号値が校正品6よりも低くなり、従来の方法では濃度がそれぞれ、8.15ng/ml、0.76ng/mlとして検出されるが、本発明の方法では、それらは検出上限を超えたサンプルとして同定することができ、希釈して検出する必要がある。

10

【0222】

実施例4 ヒト血清サンプルにおけるB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)の検出
博陽生物科技(上海)有限公司製のB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)検出キット(光励起化学発光法)を採用して、サンプルにおけるHBsAgの濃度を検出する。前記キットは、校正品1~校正品6(すなわち、既知の一連の標準物質)、試薬1(発光抗体、すなわち、抗体によって被覆された発光微粒子)、試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識された抗体)を含む。

20

【0223】

[校正品1~校正品6]従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度はHOOKサンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【0224】

[使用される他の成分]LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)、この製品は博陽生物科技有限公司製の光励起化学発光分析システム用補助試薬である。それは、機器および対応する光励起化学発光法検出キットと一緒に使用され、抗原や抗体の検出に用いられる。

30

【0225】

[まず、本発明の方法で校正品1~校正品6、測定対象の血清サンプル1~15を検出する]測定対象物、試薬1(抗体によって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチンで標識された抗体)をキュベットに加えた後、37で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で3minインキュベートし、RLU1を読み取り、37で続けて7minインキュベートし、RLU2を読み取り、2回目の信号値の増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を算出して、その結果を表4に示す。

40

【0226】

【表 4】

表 4 本発明方法の検出結果

	サンプル	RLU1	RLU2	増幅 A	濃度 IU/ml
校正品	校正品 1	422	480	14%	0
	校正品 2	837	963	15%	0.1
	校正品 3	1810	2178	20%	0.9
	校正品 4	36396	45223	24%	27.56
	校正品 5	200089	250799	25%	156.46
	校正品 6	396371	502928	27%	336.56
測定対象サンプル	サンプル 1	144451	202472	40%	>336.56
	サンプル 2	145010	206857	43%	>336.56
	サンプル 3	232678	318684	37%	>336.56
	サンプル 4	415121	534674	29%	>336.56
	サンプル 5	349098	468840	34%	>336.56
	サンプル 6	83799	123879	48%	>336.56
	サンプル 7	171530	211953	24%	137.07
	サンプル 8	199010	251351	26%	159.34
	サンプル 9	375057	498512	33%	>336.56
	サンプル 10	325790	409503	26%	250.82
	サンプル 11	225486	282838	25%	188.59
	サンプル 12	97703	141949	45%	>336.56
	サンプル 13	103552	150462	45%	>336.56
	サンプル 14	193000	263358	36%	>336.56
	サンプル 15	280822	370651	32%	>336.56

【0227】

本発明の方法によって得られた15個の血清サンプルの濃度は表4に示す通りである。まず、校正品6の増幅と比較するによって検出上限(336.56 IU/mL)を超えたサンプルを識別し、すなわち、Aの値が27%を超えると、HOOK効果サンプルであると判定し、希釈してから検出することを提案する。一方、Aが27%未満であると、検出

10

20

30

40

50

範囲内のサンプルであると判定し、そのまま校正曲線でサンプル濃度を算出することができる。

【0228】

サンプルを段階希釈した後に濃度の変化を検出することで上記結論の信頼性を検証する。サンプル1～サンプル15に対していずれも2倍希釈と4倍希釈を行うとともに、従来の検出方法で未希釈の原倍サンプル、2倍希釈サンプルと4倍希釈サンプルを検出して、希釈後の濃度の変化を観測することによってそのサンプルにはHOOK効果が存在するかどうかを判定し、すなわち、希釈後にサンプル濃度が逆に上昇する場合はHOOK効果サンプルであると判定する。非HOOK効果サンプルは希釈後に濃度が低下することになる。その結果を表5に示す。

【0229】

【表5】

表5 希釈検証結果

希釈 検証	検出濃度			濃度 IU/mL
	原倍サン プル	2倍希釈サン プル	4倍希釈サン プル	
サンプル1	128.79	262.17	474.22	HOOK
サンプル2	135.81	249.87	417.08	HOOK
サンプル3	228.96	388.23	642.69	HOOK
サンプル4	369.11	222.22	124.14	369.11
サンプル5	353.47	618.94	886.34	HOOK
サンプル6	74.52	132.14	226.20	HOOK
サンプル7	134.44	60.89	31.22	134.44
サンプル8	154.76	72.45	36.50	154.76
サンプル9	331.50	546.11	881.46	HOOK
サンプル10	260.78	104.97	49.26	260.78
サンプル11	174.00	97.86	51.41	174.00
サンプル12	82.80	176.16	328.03	HOOK
サンプル13	94.92	192.47	367.37	HOOK
サンプル14	158.96	277.50	434.39	HOOK
サンプル15	269.64	480.82	814.12	HOOK

【0230】

表5から、血清サンプル1、2、3、5、6、9、12、13、14、15が希釈され

10

20

30

40

50

た後に検出濃度が上昇し、それらはHD - HOOK効果サンプルであることが証明され、濃度が336.56 IU/mLを超えていることがわかる。血清サンプル4、7、8、10、11の濃度は希釈後に低下し、それらはHD - HOOK効果サンプルではないことが証明され、本発明方法の結果と完全に同一であった。

【0231】

実施例5 ヒト血清サンプルにおけるCA125の検出

博陽生物科技(上海)有限公司製の炭水化物抗原125(CA125)検出キット(光励起化学発光法)を採用して、サンプルにおけるCA125の濃度を検出する。前記キットは、校正品1~校正品6(すなわち、既知の一連の標準物質)、試薬1(発光抗体、すなわち、抗体によって被覆された発光微粒子)、試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識された抗体)を含む。

10

【0232】

[校正品1~校正品6]従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度はHOOKサンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【0233】

[使用される他の成分]LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)、この製品は博陽生物科技有限公司製の光励起化学発光分析システム用補助試薬である。それは、機器および対応する光励起化学発光法検出キットと一緒に使用され、抗原や抗体の検出に用いられる。

20

【0234】

[まず、本発明の方法で校正品1~校正品6、測定対象の血清サンプル1~18を検出する]測定対象物、試薬1(抗体によって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチンで標識された抗体)をキュベットに加えた後、37で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で3minインキュベートし、RLU1を読み取り、37で続けて7minインキュベートし、RLU2を読み取り、2回目の信号値の増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を算出して、その結果を表6に示す。

【0235】

【表 6】

表 6 本発明方法の検出結果

	サンプル	RLU1	RLU2	増幅 A	濃度 U/ml
校正品	校正品 1	999	744	-25.5%	0
	校正品 2	10857	8248	-24.0%	9.17
	校正品 3	21563	17508	-18.8%	19.11
	校正品 4	102708	88869	-13.5%	87.53
	校正品 5	271593	259355	-4.5%	251.58
	校正品 6	794718	853603	7.4%	1043.74
測定対象サンプル	サンプル 1	9665	7217	-25.3%	8.06
	サンプル 2	16130	12287	-23.8%	14.09
	サンプル 3	51059	42166	-17.4%	44.79
	サンプル 4	71055	59021	-16.9%	61.36
	サンプル 5	92952	80019	-13.9%	79.39
	サンプル 6	196716	178735	-9.1%	173.32
	サンプル 7	225436	213141	-5.5%	202.34
	サンプル 8	290252	281001	-3.2%	272.3
	サンプル 9	340529	345889	1.6%	330.44
	サンプル 10	465955	478028	2.6%	492.14
	サンプル 11	513321	530012	3.3%	560.23
	サンプル 12	711508	760017	6.8%	889.7
	サンプル 13	908842	973276	7.1%	>1000.00
	サンプル 14	1845773	2103378	14.0%	>1000.00
	サンプル 15	2390350	2772269	16.0%	>1000.00
	サンプル 16	688606	859340	24.8%	>1000.00
	サンプル 17	560058	709209	26.6%	>1000.00
	サンプル 18	453979	584179	28.7%	>1000.00

【0236】

本発明の方法によって得られた18個の血清サンプルの濃度は表6に示す通りである。まず、校正品6の増幅と比較するによって検出上限を超えたサンプルを識別し、すなわち、Aの値が7.4%を超えると、検出上限を超えたサンプルであると判定し、希釈してか

10

20

30

40

50

ら検出することを提案する。一方、Aが7.4%未満であると、非H O O K効果サンプルであると判定し、そのまま校正曲線でサンプル濃度を算出することができる。

【0237】

サンプルを段階希釈した後に濃度の変化を検出することで上記結論の信頼性を検証する。サンプル1～サンプル18に対していずれも2倍希釈と4倍希釈を行うとともに、従来の検出方法で未希釈の原倍サンプル、2倍希釈サンプルと4倍希釈サンプルを検出して、希釈後の濃度の変化を観測することによってそのサンプルにはH O O K効果が存在するかどうかを判定し、すなわち、希釈後にサンプル濃度が逆に上昇する場合はH O O K効果サンプルであると判定する。非H O O K効果サンプルは希釈後に濃度が低下することになる。その結果を表7に示す。

【0238】

【表 7】

表 7 希釈検証結果

希釈 検証	検出濃度			濃度 U/mL
	原倍 サンプル	2倍希釈 サンプル	4倍希釈 サンプル	
サンプル 1	8.02	4.36	2.26	8.02
サンプル 2	13.42	7.21	3.32	13.42
サンプル 3	47.14	25.17	11.8	47.14
サンプル 4	66.49	30.09	16.19	66.49
サンプル 5	80.84	44.42	20.86	80.84
サンプル 6	167.73	81.77	41.22	167.73
サンプル 7	192.31	101.89	49.65	192.31
サンプル 8	300.92	154.39	78.77	300.92
サンプル 9	352.65	170.05	87.05	352.65
サンプル 10	528.74	260.36	127.31	528.74
サンプル 11	612.44	299.05	141.28	612.44
サンプル 12	901.35	447.07	213.5	901.35
サンプル 13	>1000.00	559.3	258.1	>1000.00
サンプル 14	>1000.00	>1000.00	551.3	>1000.00
サンプル 15	>1000.00	>1000.00	771.9	>1000.00
サンプル 16	830.97	992.82	>1000.00	HOOK
サンプル 17	734.25	934.91	>1000.00	HOOK
サンプル 18	550.42	778.12	>1000.00	HOOK

【 0 2 3 9 】

表 7 から、血清サンプル 16、17、18 が希釈された後に検出濃度が上昇し、それらは HD - HOOK 効果サンプルであることが証明され、血清サンプル 1 ~ 15 の濃度は希釈後に低下し、それらは HD - HOOK 効果サンプルではないことが証明される。本発明方法の結果と完全に同一であった。サンプルが希釈されていない場合、従来の方法で原倍のサンプルを検出すると、HD - HOOK 効果のために血清サンプル 16、17 および 1

10

20

30

40

50

8 は低濃度サンプルとして誤って判断されることになる。

【0240】

実施例6 サンプルにおけるB型肝炎ウイルス表面抗体(HBsAb)の検出

博陽生物科技(上海)有限公司製のB型肝炎ウイルス表面抗体(HBsAb)検出キット(光励起化学発光法)を採用して、サンプルにおけるB型肝炎ウイルス表面抗体(北京中科京達生物技術有限公司から購入、Clone No: M2201)の含有量を検出する。前記キットは、校正品1~校正品6(すなわち、既知の一連の標準物質)、試薬1(発光抗体、すなわち、抗体によって被覆された発光微粒子)、試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識された抗体)を含む。

【0241】

[校正品1~校正品6]従来キットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度はHOOKサンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【0242】

[使用される他の成分]LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)、この製品は博陽生物科技有限公司製の光励起化学発光分析システム用補助試薬である。それは、機器および対応する光励起化学発光法検出キットと一緒に使用され、抗原や抗体の検出に用いられる。

【0243】

高濃度のHBsAbを段階希釈し、異なる濃度のHBsAbを含むサンプルの濃度値を、それぞれ従来検出方法および本発明の検出方法で測定する。

【0244】

[従来検出方法]校正品1~校正品6、測定対象サンプル1~14、試薬1(HBsAgによって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチンで標識されたHBsAg)をキュベットに加えた後、37で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で10minインキュベートし、光子カウンタで読み取り、RLUを読み取り、その結果を表8に示す。

【0245】

[本発明の2回読み取り方法]校正品1~校正品6、測定対象サンプル1~14、試薬1(HBsAgによって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチンで標識されたHBsAg)を37で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で3minインキュベートし、RLU1を読み取り、37で続けて7minインキュベートし、RLU2を読み取り、2回目の信号値の増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を算出して、その結果を表8に示す。

【0246】

10

20

30

【表 8】

表 8 従来の検出及び本発明の検出の結果

	サンプル	実際濃度	従来の検出結果		本発明の検出結果			
		濃度 mIU/ml	RLU	濃度 mIU/ml	RLU1	RLU2	増幅 A	濃度 mIU/ml
校正品	校正品 1	0	524	0	498	523	5.0%	0
	校正品 2	10.23	3548	10.23	3188	4049	27.0%	10.23
	校正品 3	71.95	21493	71.95	17403	22854	31.3%	71.95
	校正品 4	213.65	64993	213.65	50526	67526	33.6%	213.65
	校正品 5	584.26	181544	584.26	133863	180954	35.2%	584.26
	校正品 6	1026.18	342125	1026.18	255651	347371	35.9%	1026.18
測定対象サンプル	サンプル 1	1	703	0.6	652	737	13.0%	0.58
	サンプル 2	3	1257	2.48	1182	1424	20.5%	2.58
	サンプル 3	10	3443	9.87	2876	3592	24.9%	9.02
	サンプル 4	33	9387	30.24	7743	10124	30.8%	28.78
	サンプル 5	100	31033	103.93	25555	33721	32.0%	107.83
	サンプル 6	335	101781	332.87	79257	106917	34.9%	341.56
	サンプル 7	1,000	341483	>1000	259926	352344	35.6%	>1000
	サンプル 8	3,350	757906	>1000	570542	781231	36.9%	>1000
	サンプル 9	10,000	1050237	>1000	775542	1066620	37.5%	>1000
	サンプル 10	33,500	985422	>1000	753452	1039798	38.0%	>1000
	サンプル 11	100,000	576535	>1000	415949	577782	38.9%	>1000
	サンプル 12	335,000	258461	802.57	184878	259170	40.2%	>1000
	サンプル 13	1,000,000	107739	352.22	75811	109111	43.9%	>1000
	サンプル 14	3,350,000	44514	147.9	33501	48374	44.4%	>1000

【備考】HBsAb の従来検出の検出範囲は 0~1000mIU/ml であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は >1000mIU/ml として表示される。

【0247】

従来の検出では、表 8 および図 14 からわかるように、濃度が 10000 mIU/ml に上昇するまでは信号値が濃度の上昇と共に増加し、濃度が上昇し続けると、信号値が HBsAb 濃度の上昇と共に低下し、従来の検出範囲が 0~1000 mIU/ml であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は >1000 mIU/ml として表示される。濃度が 335000 mIU/ml 及びそれ以上に上昇し、信号が校正品 6 の信号以下に低下すると、サンプル 12、13、14 のように超高濃度サンプルが低濃度として報告されることになる。そのため、従来の検出では、測定対象サンプルの検出結果が、真実の濃度であるか、それとも HD-HOOK 効果の影響で低濃度として報告されたかを識別できなくなる。

【0248】

本発明の方法では、2 回の読み取りによって HOOK 効果に起因する報告濃度が低いサ

10

20

30

40

50

ンプルを同定するようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果である R L U 1、R L U 2 を順番に検出し、2 回目の読み取りの増幅 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度を判定するための指標の一つとする。表 8 および図 15 からわかるように、信号値が 10000 m I U / m l までは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅 A は濃度とともに上昇し続けることになる。したがって、測定対象サンプルの A の値と校正品の A の値とを直接に比較すれば、測定対象サンプルの濃度と校正品の濃度との大小関係を判定することができる。サンプル 8 ~ 14 の増幅 A がいずれも校正品 6 の増幅 (35.9%) を超えているので、サンプル 8 ~ 14 の H B s A b 濃度はいずれも 10000 m I U / m l を超え、検出上限を超えていることが示されている。それは実際の濃度に合致しており、サンプル 12、13、14 の信号値が校正品 6 よりも低くなり、従来の方法では濃度が 802.57 m I U / m l、352.22 m I U / m l、147.9 m I U / m l として検出されるが、本発明の方法では、それらは濃度が検出範囲を超えたサンプルとして同定することができ、希釈して検出する必要がある。

10

【0249】

実施例 7 定性的キット A n t i - H C V における本発明方法の適用

博陽生物科技(上海)有限公司製の C 型肝炎ウイルス抗体検出キット(化学発光法)を採用して、サンプルにおける A n t i - H C V の含有量を検出する。前記キットは、参考品、陰性対照、陽性対照、試薬 1 (発光 H C V 抗原、すなわち、H C V 抗原によって被覆された発光微粒子)及び試薬 2 (ビオチン標識 H C V 抗原、すなわち、ビオチンで標識された H C V 抗原)を含む。

20

【0250】

[参考品、陰性対照、陽性対照]参考品は参考として測定対象サンプルの陰性、陽性を判定するための濃度既知の標準品であり、陰性対照、陽性対照は、試験の有効性を判定するための濃度既知の標準品である。高濃度の A n t i - H C V を段階希釈し、異なる濃度の A n t i - H C V を含むサンプルの信号値を、それぞれ従来を検出方法および本発明の検出方法で測定する。

【0251】

[従来を検出方法]段階希釈された一連の A n t i - H C V サンプル、試薬 1 (発光 H C V 抗原、すなわち、H C V 抗原によって被覆された発光微粒子)および試薬 2 (ビオチン標識 H C V 抗原、すなわち、ビオチンで標識された H C V 抗原)をキュベットに加えた後、37 で 15 m i n インキュベートし、L i C A 汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37 で 10 m i n インキュベートし、光子カウンタで読み取り、R L U を読み取り、その結果を表 9 に示す。

30

【0252】

[本発明の 2 回読み取り方法]段階希釈された一連の A n t i - H C V サンプル、試薬 1 (発光 H C V 抗原、すなわち、H C V 抗原によって被覆された発光微粒子)および試薬 2 (ビオチン標識 H C V 抗原、すなわち、ビオチンで標識された H C V 抗原)を 37 で 15 m i n インキュベートし、L i C A 汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37 で 3 m i n インキュベートし、R L U 1 を読み取り、37 で続けて 7 m i n インキュベートし、R L U 2 を読み取り、2 回目の信号値の増幅 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 100\%$ を算出して、その結果を表 9 に示す。

40

【0253】

【表 9】

表 9 従来の検出及び本発明の検出の結果

サンプル		従来の検出結果			本発明の検出結果				
		RLU	S/CO	結果判定	RLU1	RLU2	増幅 A	S/CO	結果判定
参考品	Cut off	8666	/	/	7597	5497	-28%	/	/
	陰性対照	2114	0.2	-	1849	1209	-35%	0.2	-
	陽性対照	73593	8.5	+	66895	49895	-25%	8.8	+
サンプル	希釈倍数								
サンプル 1	33500000	7219	0.8	-	6323	4518	-29%	0.8	-
サンプル 2	10000000	26240	3.0	+	24509	17799	-27%	3.2	+
サンプル 3	3350000	87461	10.1	+	83267	63218	-24%	11.0	+
サンプル 4	1000000	394790	45.6	+	353729	286326	-19%	46.6	+
サンプル 5	335000	100762 3	116.3	+	941139	788127	-16%	123.9	+
サンプル 6	100000	143376 4	165.4	+	1241174	1119498	-10%	163.4	+
サンプル 7	33500	178210 8	205.6	+	1643897	1562180	-5%	216.4	+
サンプル 8	10000	181873 2	209.9	+	1717605	1690209	-2%	226.1	+
サンプル 9	3350	154327 5	178.1	+	1418948	1490332	5%	186.8	+
サンプル 10	1000	112484 9	129.8	+	1039330	1282719	23%	136.8	+
サンプル 11	335	417289	48.2	+	382049	518552	36%	50.3	+
サンプル 12	100	181511	20.9	+	172745	241657	40%	22.7	+
サンプル 13	33	44905	5.2	+	42530	61166	44%	5.6	+
サンプル 14	10	5429	0.6	-	5176	7630	47%	0.7	+

10

20

30

40

50

【 0 2 5 4 】

表 9 に示すように、抗原の希釈倍数を 10,000 倍に減少させた後、信号値は濃度の上昇と共に低下し、HOOK 効果が生じ、濃度が一定の値（例えばサンプル 12）まで上昇し続けると、RLU は参考値 cut off 以下に低下し、従来の検出方法では、その結果が陰性であると誤って判定されてしまう。本発明の方法では、まず、2 回の信号の増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を観察し、測定対象サンプルの A の値と陽性対照の A の値（-25%）とを比較し、測定対象サンプルと陽性対照との大小関係を判定し、上記の表に示すように、サンプル 12 の A の値（47%）は陽性対照の A の値（-25%）よりもはるかに高くなり、このサンプルの濃度が陽性対照を超えていることが示され、陽性サンプルであり、その信号の不十分は HOOK 効果に起因するもので、希釈して検証する必要がある。

【0255】

実施例8 サンプルにおけるインスリン（INS）の検出

博陽生物科技（上海）有限公司製のインスリン（INS）検出キット（化学発光法）を採用して、サンプルにおけるインスリン（Fitzgeraldから購入、Catalog No: 30R-2704）の含有量を検出する。

【0256】

高濃度のインスリン抗原を段階希釈し、異なる濃度のインスリンを含むサンプルの信号値を、それぞれ従来の検出方法および本発明の検出方法で測定する。

【0257】

[従来の検出方法] 濃度既知の測定対象サンプル、試薬1（発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された発光微粒子）および試薬2（ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル抗体）をキュベットに加えた後、37℃で15minインキュベートし、LiCA汎用液（ストレプトアビジンで標識された感光微粒子）を加え、37℃で10minインキュベートし、光子カウンタで読み取り、RLUを読み取り、その結果を表10に示す。

10

【0258】

[本発明の2回読み取り方法] 濃度既知の測定対象サンプル、試薬1（発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された発光微粒子）および試薬2（ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル抗体）を37℃で15minインキュベートし、LiCA汎用液（ストレプトアビジンで標識された感光微粒子）を加え、37℃で3minインキュベートし、RLU1を読み取り、37℃で続けて7minインキュベートし、RLU2を読み取り、2回目の信号値の増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を算出して、その結果を表10に示す。

20

【0259】

【表10】

表10 従来の検出及び本発明の検出の結果

濃度 (μ IU/ml)	従来の検出結果	本発明の検出結果		
	RLU	RLU1	RLU2	増幅A
3	3031	3132	2058	-34%
10	11328	9809	6631	-32%
33	33433	30397	21212	-30%
100	152385	117194	86069	-27%
335	732465	503568	449149	-11%
1,000	1797417	1342726	1446642	8%
3,350	2441794	1857062	2100576	13%
10,000	2470762	1880534	2247857	20%
33,500	2033507	1482999	1958095	32%
100,000	1209233	786883	1228586	56%
335,000	464717	273591	483967	77%
1,000,000	100765	58998	115157	95%

30

40

【0260】

表10および図16から、濃度が 3μ IU/mlから 10000μ IU/mlになるまで信号値が濃度の上昇と共に増加し、濃度が上昇し続けると、信号値がインスリン濃度の上昇と共に低下し、すなわち、濃度が $10,000 \mu$ IU/mlを超えると、HD-HOOK効果が発生し、従来の検出では、抗原濃度がこの検出範囲を超えたサンプルの報告濃

50

度は低濃度となる（報告濃度はいずれも10,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ 未満である）。

【0261】

本発明の方法では、2回の読み取りによって検出範囲を広げるようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果であるRLU1、RLU2を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度区間を判定するための指標の一つとする。表10および図17からわかるように、信号値が10,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ までは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅Aは濃度とともに上昇し続けることになる。

【0262】

インスリン校正品の濃度は3 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ から1,000,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ までの範囲をカバーしており、本発明の方法を利用してそれぞれRLU1とAの校正曲線及び標準曲線（図17参照）を作成する。濃度の上昇とともにAが上昇し続け、RLU1は3 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ から10,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ までの上昇区間および10,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ から1,000,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ までの下降区間に分けられる。本発明の方法を利用して測定対象サンプルのRLU1、RLU2およびAを検出する。まず、Aの値によって測定対象物質の濃度が3 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ から10,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ の上昇区間にあるか、それとも10,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ から1,000,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ までの下降区間にあるかを特定し、次いで測定対象物質のRLU1を対応する校正曲線に代入して正確な濃度を算出する。

【0263】

表10から、インスリン濃度が10,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ のとき、信号のピークがあり、それに対応するAは20%となる。測定対象物の $A < 20\%$ の場合、その測定対象サンプルがHD-HOOKサンプルではなく、そのRLU1を濃度が10,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ 未満の校正曲線に代入して濃度を算出し、 $A \geq 20\%$ の場合、その測定対象サンプルがHD-HOOKサンプルであり、そのRLU1を濃度が10,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ を超える校正曲線に代入して濃度を算出し、これによって検出上限を10,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ から1,000,000 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ に広げた。

【0264】

実施例9 サンプルにおけるB型肝炎ウイルス表面抗体(HBsAb)の検出

博陽生物科技(上海)有限公司製のB型肝炎ウイルス表面抗体検出キット(光励起化学発光法)を採用して、サンプルにおけるB型肝炎ウイルス表面抗体(北京中科京達生物技术有限公司から購入、Clone No: M2201)の濃度を検出する。

【0265】

高濃度のHBsAbを段階希釈し、異なる濃度のHBsAbを含むサンプルの信号値を、それぞれ従来の検出方法および本発明の検出方法で測定する。

【0266】

[従来の検出方法] 段階希釈されたHBsAbサンプル、試薬1(HBsAgによって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチンで標識されたHBsAg)をキュベットに加えた後、37℃で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37℃で10minインキュベートし、光子カウンタでRLUを読み取る。

【0267】

[本発明の2回読み取り方法] 段階希釈されたHBsAbサンプル、試薬1(HBsAgによって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチンで標識されたHBsAg)をキュベットに加えた後、37℃で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37℃で3minインキュベートし、RLU1を読み取り、37℃で続けて7minインキュベートし、RLU2を読み取り、2回目の信号値の増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を算出して、その結果を表11に示す。

【0268】

【表 1 1】

表 11 従来の検出及び本発明の検出の結果

濃度 (mIU/ml)	従来の検出結果		本発明の検出結果	
	RLU	RLU1	RLU2	増幅 A
1	703	652	737	13.0%
3	1257	1182	1424	20.5%
10	3443	2876	3592	24.9%
33	9387	7743	10124	30.8%
100	31033	25555	33721	32.0%
335	101781	79257	106917	34.9%
1,000	341483	259926	352344	35.6%
3,350	757906	570542	781231	36.9%
10,000	1050237	775542	1066620	37.5%
33,500	985422	753452	1039798	38.0%
100,000	576535	415949	577782	38.9%
335,000	258461	184878	259170	40.2%
1,000,000	107739	75811	109111	43.9%
3,350,000	44514	33501	48374	44.4%

10

20

【0269】

表 1 1 および図 1 8 から、濃度が 1 mIU/ml から 10000 mIU/ml になるまで信号値が濃度の上昇と共に増加し、濃度が上昇し続けると、信号値が H B s A b 濃度の上昇と共に低下し、すなわち、濃度が 10,000 mIU/ml を超えると、H D - H O O K 効果が発生し、従来の検出では、抗原濃度がこの検出範囲を超えたサンプルの報告濃度は低濃度となる（報告濃度はいずれも 10,000 mIU/ml 未満である）。

30

【0270】

本発明の方法では、2 回の読み取りによって検出範囲を広げるようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果である R L U 1、R L U 2 を順番に検出し、2 回目の読み取りの増幅 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度区間を判定するための指標の一つとする。表 1 1 および図 1 9 からわかるように、信号値が 10,000 mIU/ml までは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅 A は濃度とともに上昇し続けることになる。

40

【0271】

H B s A b 校正品の濃度は 1 mIU/ml から 3,350,000 mIU/ml までの範囲をカバーしており、本発明の方法を利用してそれぞれ R L U 1 と A の校正曲線及び標準曲線（図 1 9 参照）を作成する。濃度の上昇とともに A が上昇し続け、R L U 1 は 1 mIU/ml から 10,000 mIU/ml までの上昇区間および 10,000 mIU/ml から 3,350,000 mIU/ml までの下降区間に分けられる。本発明の方法を利用して測定対象サンプルの R L U 1、R L U 2 および A を検出する。まず、A の値によって測定対象物質の濃度が 1 mIU/ml から 10,000 mIU/ml までの上昇区間にあるか、それとも 10,000 mIU/ml から 3,350,000 mIU/ml までの下降区間にあるかを特定し、次いで測定対象物質の R L U 1 を対応する校正曲線に代入して正確な濃度を算出する。

【0272】

表 1 1 から、H B s A b 濃度が 10,000 mIU/ml のとき、信号のピークがあり、それに対応する A は 37.5% となる。測定対象物の $A < 37.5\%$ の場合、その測定

50

対象サンプルがHD-HOOKサンプルではなく、そのRLU1を濃度が10,000mIU/ml未満の校正曲線に代入して濃度を算出し、A 37.5%の場合、その測定対象サンプルがHD-HOOKサンプルであり、そのRLU1を濃度が10,000mIU/mlを超える校正曲線に代入して濃度を算出し、これによって検出上限を10,000mIU/mlから3,350,000mIU/mlに広げた。

【0273】

実施例10 サンプルにおけるアルファフェトプロテイン(AFP)の検出

博陽生物科技(上海)有限公司製のアルファフェトプロテイン検出キット(光励起化学発光法)を採用して、サンプルにおけるAFP(Fitzgeraldから購入、Catalog No: 30-1370)の含有量を検出する。

10

【0274】

高濃度のAFP抗原を段階希釈し、異なる濃度のAFPを含むサンプルの信号値を、それぞれ従来の検出方法および本発明の検出方法で測定する。前記従来の検出方法および本発明の検出方法は実施例8を参照する。その検出結果を以下に示す。

【0275】

【表12】

表12 従来の検出及び本発明の検出の結果

濃度 (ng/ml)	従来の検出結果		本発明の検出結果	
	RLU	RLU1	RLU2	増幅
5	6236	5240	3196	-39%
20	28026	21592	13538	-37%
100	192398	134766	103650	-23%
500	1075656	814013	829990	2%
1,000	1729407	1342554	1508052	12%
10,000	2817087	2132217	2513551	18%
35,000	1874558	1443089	1761348	22%
70,000	1280414	988315	1235805	25%
100,000	1019883	766931	976572	27%
350,000	327178	236131	306697	30%
700,000	139241	97740	129928	33%
1,000,000	58911	40668	54969	35%

20

30

【0276】

表12および図20から、濃度が5ng/mlから10000ng/mlになるまで信号値が濃度の上昇と共に増加し、濃度が上昇し続けると、信号値がAFP濃度の上昇と共に低下し、すなわち、濃度が10,000ng/mlを超えると、HD-HOOK効果が発生し、従来の検出では、抗原濃度がこの検出範囲を超えたサンプルの報告濃度は低濃度となる(報告濃度はいずれも10,000ng/ml未満である)。

40

【0277】

本発明の方法では、2回の読み取りによって検出範囲を広げるようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果であるRLU1、RLU2を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度区間を判定するための指標の一つとする。表12および図21からわかるように、信号値が10,000ng/mlまでは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに

50

に低下するが、増幅 A は濃度とともに上昇し続けることになる。

【0278】

A F P 校正品の濃度は 5 ng/ml から $1,000,000 \text{ ng/ml}$ までの範囲をカバーしており、本発明の方法を利用してそれぞれ R L U 1 と A の校正曲線及び標準曲線（図 21 参照）を作成する。濃度の上昇とともに A が上昇し続け、R L U 1 は 5 ng/ml から $10,000 \text{ ng/ml}$ までの上昇区間および $10,000 \text{ ng/ml}$ から $1,000,000 \text{ ng/ml}$ までの下降区間に分けられる。本発明の方法を利用して測定対象サンプルの R L U 1、R L U 2 および A を検出する。まず、A の値によって測定対象物質の濃度が 5 ng/ml から $10,000 \text{ ng/ml}$ までの上昇区間にあるか、それとも $10,000 \text{ ng/ml}$ から $1,000,000 \text{ ng/ml}$ までの下降区間にあるかを特定し、次いで測定対象物質の R L U 1 を対応する校正曲線に代入して正確な濃度を算出する。

10

【0279】

表 12 から、A F P 濃度が $10,000 \text{ ng/ml}$ のとき、信号のピークがあり、それに対応する A は 18% となる。測定対象物の $A < 18\%$ の場合、その測定対象サンプルが H D - H O O K サンプルではなく、その R L U 1 を濃度が $10,000 \text{ ng/ml}$ 未満の校正曲線に代入して濃度を算出し、 $A \geq 18\%$ の場合、その測定対象サンプルが H D - H O O K サンプルであり、その R L U 1 を濃度が $10,000 \text{ ng/ml}$ を超える校正曲線に代入して濃度を算出し、これによって検出上限を $10,000 \text{ ng/ml}$ から $1,000,000 \text{ ng/ml}$ に広げた。

【0280】

20

実施例 11 サンプルにおけるチロトロピン (T S H) の検出

博陽生物科技 (上海) 有限公司製のチロトロピン検出キット (光励起化学発光法) を採用して、サンプルにおけるチロトロピン (F i t z g e r a l d から購入、C a t a l o g N o : 3 0 R - A T 0 0 9) の含有量を検出する。

【0281】

高濃度の T S H 抗原を段階希釈し、異なる濃度の T S H を含むサンプルの信号値を、それぞれ従来の検出方法および本発明の検出方法で測定する。前記従来の検出方法および本発明の検出方法は実施例 8 を参照する。その検出結果を以下に示す。

【0282】

【表 13】

表 13 従来の検出及び本発明の検出の結果

濃度 (μ IU/ml)	従来の検出結果		本発明の検出結果	
	RLU	RLU1	RLU2	増幅 A
1	1103	945	907	-4.0%
3	2575	2164	2094	-3.2%
10	7819	6599	6531	-1.0%
33	21753	18402	18769	2.0%
100	72245	56936	58935	3.5%
335	211059	165014	179901	9.0%
1.000	544987	431178	483676	12.2%
3.350	927996	766522	887819	15.8%
10.000	1105743	935888	1095402	17.0%
33.500	1076776	908019	1069339	17.8%
100.000	947465	759085	899887	18.5%
335.000	584210	471532	563676	19.5%
1.000.000	303719	249043	301106	20.9%

10

20

【0283】

表 13 および図 22 から、濃度が 1μ IU/ml から 10000μ IU/ml になるまで信号値が濃度の上昇と共に増加し、濃度が上昇し続けると、信号値が TSH 濃度の上昇と共に低下し、すなわち、濃度が $10,000 \mu$ IU/ml を超えると、HD-HOOK 効果が発生し、従来の検出では、抗原濃度がこの検出範囲を超えたサンプルの報告濃度は低濃度となる（報告濃度はいずれも $10,000 \mu$ IU/ml 未満である）。

30

【0284】

本発明の方法では、2回の読み取りによって検出範囲を広げるようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果である RLU1、RLU2 を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度区間を判定するための指標の一つとする。表 13 および図 23 からわかるように、信号値が $10,000 \mu$ IU/ml までは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅 A は濃度とともに上昇し続けることになる。

40

【0285】

TSH 校正品の濃度は 1μ IU/ml から $1,000,000 \mu$ IU/ml までの範囲をカバーしており、本発明の方法を利用してそれぞれ RLU1 と A の校正曲線及び標準曲線（図 23 参照）を作成する。濃度の上昇とともに A が上昇し続け、RLU1 は 1μ IU/ml から $10,000 \mu$ IU/ml までの上昇区間および $10,000 \mu$ IU/ml から $1,000,000 \mu$ IU/ml までの下降区間に分けられる。本発明の方法を利用して測定対象サンプルの RLU1、RLU2 および A を検出する。まず、A の値によって測定対象物質の濃度が 3μ IU/ml から $10,000 \mu$ IU/ml までの上昇区間にあるか、それとも $10,000 \mu$ IU/ml から $1,000,000 \mu$ IU/ml までの下降区間にあるかを特定し、次いで測定対象物質の RLU1 を対応する校正曲線に代入して正確な濃度を算出する。

50

【0286】

表13から、TSH濃度が10,000 μ IU/mlのとき、信号のピークがあり、それに対応するAは17.0%となる。測定対象物のA<17.0%の場合、その測定対象サンプルがHD-HOOKサンプルではなく、そのRLU1を濃度が10,000 μ IU/ml未満の校正曲線に代入して濃度を算出し、A=17.0%の場合、その測定対象サンプルがHD-HOOKサンプルであり、そのRLU1を濃度が10,000 μ IU/mlを超える校正曲線に代入して濃度を算出し、これによって検出上限を10,000 μ IU/mlから1,000,000 μ IU/mlに広げた。

【0287】

実施例12 ヒト血清サンプルにおけるB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)の検出

10

本発明による免疫測定法に係るキットを採用して、サンプルにおけるHBsAgの濃度を検出する。前記キットは、校正品1~校正品6、ピーク校正品、試薬1(発光抗体、すなわち、抗体によって被覆された発光微粒子)、試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識された抗体)を含む。

【0288】

[校正品1~校正品6]従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度はHOOKサンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【0289】

[ピーク校正品の選定]既知のHOOKサンプルを段階希釈し、従来の方法でその信号値を検出し、信号値が最も高いサンプルをピーク校正品として選定する。すなわち、ピーク校正品の濃度未満のサンプルではHOOK効果が発生することなく、ピーク校正品の濃度を超えると、HOOK効果が発生することになる。そのAの値をR0と表記し、測定対象物がHOOK効果サンプルであるか否かを判定するための臨界値とする。

20

【0290】

[使用される他の成分]LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)、この製品は博陽生物科技有限公司製の光励起化学発光分析システム用補助試薬である。それは、機器および対応する光励起化学発光法検出キットと一緒に使用され、抗原や抗体の検出に用いられる。

30

【0291】

[まず、本発明の方法で校正品1~校正品6、ピーク校正品、測定対象の血清サンプル1~15を検出する]測定対象物、試薬1(抗体によって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチンで標識された抗体)をキュベットに加えた後、37 $^{\circ}$ Cで15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37 $^{\circ}$ Cで3minインキュベートし、RLU1を読み取り、37 $^{\circ}$ Cで続けて7minインキュベートし、RLU2を読み取り、2回目の信号値の増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を算出して、その結果を表14に示す。

【0292】

【表 1 4】

表 14 本発明方法の検出結果

	サンプル	RLU (1)	RLU (2)	増幅 A	濃度 IU/ml
校正品	校正品 1	422	480	14%	0.00
	校正品 2	837	963	15%	0.10
	校正品 3	1810	2178	20%	0.90
	校正品 4	36396	45223	24%	27.56
	校正品 5	200089	250799	25%	156.46
	校正品 6	396371	502928	27%	336.56
	ピーク校正品	1067534	1393208	31%	
測定対象サンプル	サンプル 1	144451	202472	40%	HOOK
	サンプル 2	145010	206857	43%	HOOK
	サンプル 3	232678	318684	37%	HOOK
	サンプル 4	415121	534674	29%	368.29
	サンプル 5	349098	468840	34%	HOOK
	サンプル 6	83799	123879	48%	HOOK
	サンプル 7	171530	211953	24%	137.07
	サンプル 8	199010	251351	26%	159.34
	サンプル 9	375057	498512	33%	HOOK
	サンプル 10	325790	409503	26%	250.82
	サンプル 11	225486	282838	25%	188.59
	サンプル 12	97703	141949	45%	HOOK
	サンプル 13	103552	150462	45%	HOOK
	サンプル 14	193000	263358	36%	HOOK
	サンプル 15	280822	370651	32%	HOOK

【0293】

本発明の方法によって得られた15個の血清サンプルの濃度は表14に示す通りである。まず、ピーク校正品の増幅R0と比較するによってHOOK効果サンプルを識別し、すなわち、Aの値が31%を超えると、HOOK効果サンプルであると判定し、希釈してから検出することを提案する。一方、Aが31%未満であると、非HOOK効果サンプルであると判定し、そのまま校正曲線でサンプル濃度を算出することができる。

【0294】

サンプルを段階希釈した後に濃度の変化を検出することで上記結論の信頼性を検証する。サンプル1~サンプル15に対していずれも2倍希釈と4倍希釈を行うとともに、従来の検出方法で未希釈の原倍サンプル、2倍希釈サンプルと4倍希釈サンプルを検出して、希釈後の濃度の変化を観測することによってそのサンプルにはHOOK効果が存在するかどうかを判定し、すなわち、希釈後にサンプル濃度が逆に上昇する場合はHOOK効果サンプルであると判定する。非HOOK効果サンプルは希釈後に濃度が低下することになる。その結果を表15に示す。

【0295】

【表 15】

表 15 希釈検証結果

希釈 検証	検出濃度			濃度 IU/mL
	原倍 サンプル	2 倍希釈 サンプル	4 倍希釈 サンプル	
サンプル 1	128.79	262.17	474.22	HOOK
サンプル 2	135.81	249.87	417.08	HOOK
サンプル 3	228.96	388.23	642.69	HOOK
サンプル 4	369.11	222.22	124.14	369.11
サンプル 5	353.47	618.94	886.34	HOOK
サンプル 6	74.52	132.14	226.20	HOOK
サンプル 7	134.44	60.89	31.22	134.44
サンプル 8	154.76	72.45	36.50	154.76
サンプル 9	331.50	546.11	881.46	HOOK
サンプル 10	260.78	104.97	49.26	260.78
サンプル 11	174.00	97.86	51.41	174.00
サンプル 12	82.80	176.16	328.03	HOOK
サンプル 13	94.92	192.47	367.37	HOOK
サンプル 14	158.96	277.50	434.39	HOOK
サンプル 15	269.64	480.82	814.12	HOOK

10

20

【0296】

表 15 から、血清サンプル 1、2、3、5、6、9、12、13、14、15 が希釈された後に検出濃度が上昇し、それらは HD - HOOK 効果サンプルであることが証明され、血清サンプル 4、7、8、10、11 の濃度は希釈後に低下し、それらは HD - HOOK 効果サンプルではないことが証明される。本発明方法の結果と完全に同一であった。

30

【0297】

実施例 13 ヒト血清サンプルにおける CA 125 の検出

本発明による免疫測定法に係るキットを採用して、サンプルにおける CA 125 の濃度を検出する。前記キットは、校正品 1 ~ 校正品 6、ピーク校正品、試薬 1 (発光抗体、すなわち、抗体によって被覆された発光微粒子)、試薬 2 (ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識された抗体)を含む。

【0298】

[校正品 1 ~ 校正品 6] 従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度は HD - HOOK サンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

40

【0299】

[ピーク校正品の選定] 既知の HOOK サンプルを段階希釈し、従来の方法でその信号値を検出し、信号値が最も高いサンプルをピーク校正品として選定する。すなわち、ピーク校正品の濃度未満のサンプルでは HOOK 効果が発生することなく、ピーク校正品の濃度を超えると、HOOK 効果が発生することになる。その A の値を R0 と表記し、測定対象物が HOOK 効果サンプルであるか否かを判定するための臨界値とする。

【0300】

[まず、本発明の方法で校正品 1 ~ 校正品 6、ピーク校正品、測定対象の血清サンプル 1 ~ 18 を検出する] 測定対象物、試薬 1 (抗体によって被覆された発光微粒子) および

50

試薬 2 (ビオチンで標識された抗体) をキュベットに加えた後、37 で 15 min インキュベートし、LiCA 汎用液 (ストレプトアビジンで標識された感光微粒子) を加え、37 で 3 min インキュベートし、RLU 1 を読み取り、37 で続けて 7 min インキュベートし、RLU 2 を読み取り、2 回目の信号値の増幅 $A = (RLU 2 / RLU 1 - 1) \times 100 \%$ を算出して、その結果を表 16 に示す。

【 0 3 0 1 】

【 表 1 6 】

表 16 本発明方法の検出結果

	サンプル	RLU (1)	RLU (2)	増幅 A	濃度 U/ml
校正品	校正品 1	999	744	-25.5%	0
	校正品 2	10857	8248	-24.0%	9.17
	校正品 3	21563	17508	-18.8%	19.11
	校正品 4	102708	88869	-13.5%	87.53
	校正品 5	271593	259355	-4.5%	251.58
	校正品 6	794718	853603	7.4%	1043.74
	ピーク校正品	2537830	3012939	18.7%	
測定対象サンプル	サンプル 1	9665	7217	-25.3%	8.06
	サンプル 2	16130	12287	-23.8%	14.09
	サンプル 3	51059	42166	-17.4%	44.79
	サンプル 4	71055	59021	-16.9%	61.36
	サンプル 5	92952	80019	-13.9%	79.39
	サンプル 6	196716	178735	-9.1%	173.32
	サンプル 7	225436	213141	-5.5%	202.34
	サンプル 8	290252	281001	-3.2%	272.3
	サンプル 9	340529	345889	1.6%	330.44
	サンプル 10	465955	478028	2.6%	492.14
	サンプル 11	513321	530012	3.3%	560.23
	サンプル 12	711508	760017	6.8%	889.7
	サンプル 13	908842	973276	7.1%	>1000.00
	サンプル 14	1845773	2103378	14.0%	>1000.00
	サンプル 15	2390350	2772269	16.0%	>1000.00
	サンプル 16	688606	859340	24.8%	HOOK
	サンプル 17	560058	709209	26.6%	HOOK
	サンプル 18	453979	584179	28.7%	HOOK

10

20

30

40

【 0 3 0 2 】

50

本発明の方法によって得られた18個の血清サンプルの濃度は表16に示す通りである。まず、ピーク校正品の増幅R0と比較するによってH00K効果サンプルを識別し、すなわち、Aの値が18.7%を超えると、H00K効果サンプルであると判定し、希釈してから検出することを提案する。一方、Aが18.7%未満であると、非H00K効果サンプルであると判定し、そのまま校正曲線でサンプル濃度を算出することができる。

【0303】

サンプルを段階希釈した後に濃度の変化を検出することで上記結論の信頼性を検証する。サンプル1~サンプル18に対していずれも2倍希釈と4倍希釈を行うとともに、従来の検出方法で未希釈の原倍サンプル、2倍希釈サンプルと4倍希釈サンプルを検出して、希釈後の濃度の変化を観測することによってそのサンプルにはH00K効果が存在するかどうかを判定し、すなわち、希釈後にサンプル濃度が逆に上昇する場合はH00K効果サンプルであると判定する。非H00K効果サンプルは希釈後に濃度が低下することになる。その結果を表17に示す。

【0304】

【表17】

表17 希釈検証結果

希釈 検証	検出濃度			濃度 U/mL
	原倍 サンプル	2倍希釈 サンプル	4倍希釈 サンプル	
サンプル1	8.02	4.36	2.26	8.02
サンプル2	13.42	7.21	3.32	13.42
サンプル3	47.14	25.17	11.8	47.14
サンプル4	66.49	30.09	16.19	66.49
サンプル5	80.84	44.42	20.86	80.84
サンプル6	167.73	81.77	41.22	167.73
サンプル7	192.31	101.89	49.65	192.31
サンプル8	300.92	154.39	78.77	300.92
サンプル9	352.65	170.05	87.05	352.65
サンプル10	528.74	260.36	127.31	528.74
サンプル11	612.44	299.05	141.28	612.44
サンプル12	901.35	447.07	213.5	901.35
サンプル13	>1000.00	559.3	258.1	>1000.00
サンプル14	>1000.00	>1000.00	551.3	>1000.00
サンプル15	>1000.00	>1000.00	771.9	>1000.00
サンプル16	830.97	992.82	>1000.00	H00K
サンプル17	734.25	934.91	>1000.00	H00K
サンプル18	550.42	778.12	>1000.00	H00K

【0305】

表17から、血清サンプル16、17、18が希釈された後に検出濃度が上昇し、それらはHD-HOOK効果サンプルであることが証明され、血清サンプル1~15の濃度は希釈後に低下し、それらはHD-HOOK効果サンプルではないことが証明される。本発明方法の結果と完全に同一であった。

【0306】

実施例14 サンプルにおけるフェリチン(Ferr)の検出

本発明による免疫測定法に係るキットを採用して、サンプルにおけるフェリチン(Fitzgeraldから購入、Catalog No: 30-AF10)の含有量を検出する。前記キットは、校正品1~校正品6、ピーク校正品、試薬1(発光抗体、すなわち、抗体によって被覆された発光微粒子)、試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識された抗体)を含む。

10

【0307】

[校正品1~校正品6]従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度はHOOKサンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【0308】

[ピーク校正品の選定]既知のHOOKサンプルを段階希釈し、従来の方法でその信号値を検出し、信号値が最も高いサンプル、本実験ではすなわちサンプル9をピーク校正品として選定する。ピーク校正品の濃度未満のサンプルではHOOK効果が発生することなく、ピーク校正品の濃度を超えると、HOOK効果が発生することになる。そのAの値をR0と表記し、測定対象物がHOOK効果サンプルであるか否かを判定するための臨界値とする。

20

【0309】

高濃度のフェリチン抗原を段階希釈し、異なる濃度のフェリチンを含むサンプルの濃度値を、それぞれ従来の検出方法および本発明の検出方法で測定する。

【0310】

[従来の検出方法]校正品1~校正品6、ピーク校正品、測定対象サンプル1~15、試薬1(発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル抗体)をキュベットに加えた後、37で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で10minインキュベートし、光子カウンタで読み取り、RLUを読み取り、その結果を下記の表に示す。

30

【0311】

[本発明の2回読み取り方法]校正品1~校正品6、ピーク校正品、測定対象サンプル1~15、試薬1(発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル抗体)を37で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で3minインキュベートし、RLU1を読み取り、37で続けて7minインキュベートし、RLU2を読み取り、2回目の信号値の増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を算出して、その結果を表18に示す。

40

【0312】

【表 18】

表 18 従来の検出及び本発明の検出の結果

	サンプル	実際濃度	従来の検出結果		本発明の検出結果			
		濃度 ng/ml	RLU	濃度 ng/ml	RLU (1)	RLU (2)	増幅 A	濃度 ng/ml
校正品	校正品 1	0	1504	0	1301	982	-24.5%	0
	校正品 2	19.91	9470	19.91	8419	5699	-32.3%	19.91
	校正品 3	101.02	46702	101.02	39701	31854	-19.8%	101.02
	校正品 4	502.74	201992	502.74	177904	152780	-14.1%	502.74
	校正品 5	994.36	382044	994.36	336189	299061	-11.0%	994.36
	校正品 6	2232.94	745316	2232.94	701657	662840	-5.5%	2232.94
	ピーク校正品 (サンプル 9)	51000	2378260	51000	2113558	2407210	13.9%	51000
測定対象サンプル	サンプル 1	20	10008	21.21	9010	6256	-30.6%	21.53
	サンプル 2	200	83614	184.44	75542	63340	-16.2%	196.81
	サンプル 3	2000	688675	>2000	635950	595131	-6.4%	>2000
	サンプル 4	5100	1131402	>2000	1083169	1077907	-0.5%	>2000
	サンプル 5	10200	1684984	>2000	1448123	1526161	5.4%	>2000
	サンプル 6	15300	1966033	>2000	1776540	1926924	8.5%	>2000
	サンプル 7	20400	2132659	>2000	1907869	2132148	11.8%	>2000
	サンプル 8	25500	2288952	>2000	1999686	2251677	12.6%	>2000
	サンプル 9	51000	2378260	>2000	2113558	2407210	13.9%	>2000
	サンプル 10	102000	2304238	>2000	2094861	2392541	14.2%	HOOK
	サンプル 11	153000	2163232	>2000	1903523	2210245	16.1%	HOOK
	サンプル 12	204000	1958628	>2000	1740069	2031467	16.7%	HOOK
	サンプル 13	255000	1777808	>2000	1615030	1899252	17.6%	HOOK
	サンプル 14	510000	1401282	>2000	1162934	1398233	20.2%	HOOK
	サンプル 15	2550000	646266	1860.97	538637	668007	24.0%	HOOK

【備考】フェリチンの従来検出の検出範囲は 0~2000ng/ml であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は >2000ng/ml として表示される。

【0313】

表 18 および図 24 からわかるように、従来の方法で高濃度の抗原を段階希釈したサンプルを検出する場合、濃度が 51000 ng/ml に上昇するまでは信号値が濃度の上昇と共に増加し、濃度が上昇し続けると、信号値が Ferr 濃度の上昇と共に低下し、すなわち、濃度が 51000 ng/ml を超えると、HD-HOOK 効果が発生する。すなわち、濃度が 51000 ng/ml であるサンプル 9 がピーク校正品となり、RO が 13.9% である。

【0314】

従来の検出では、検出範囲が 0~2000 ng/ml であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は >2000 ng/ml として表示される。HD-HOOK 効果サンプルの濃度

10

20

30

40

50

が上昇し続けると、信号が低下し続けるので、サンプル15のように超高濃度サンプルが低濃度として報告されることになる。そのため、従来の検出では、測定対象サンプルの検出結果が、真実の濃度であるか、それともHD-HOOK効果の影響で低濃度として報告されたかを識別できなくなる。

【0315】

本発明の方法では、2回の読み取りによってHOOK効果サンプルを同定するようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果であるRLU1、RLU2を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度を判定するための指標の一つとする。表18および図25からわかるように、信号値が51000 ng/mlまでは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅Aは濃度とともに上昇し続けることになる。したがって、測定対象サンプルのAの値と校正品のAの値とを直接に比較すれば、測定対象サンプルの濃度と校正品の濃度の大小関係を判定することができる。サンプル10~15の増幅Aがいずれもピーク校正品の増幅R0(13.9%)を超えているので、サンプル10~15のFerr濃度はいずれも51000 ng/mlを超え、HD-HOOKサンプルであることが示されている。それは実際の濃度に合致しており、サンプル15の信号値が校正品6よりも低くなり、従来の方法では濃度が1860.97 ng/mlとして検出されるが、本発明の方法では、それはHD-HOOKサンプルであると同定することができ、希釈して検出する必要がある。

10

【0316】

実施例15 サンプルにおけるCペプチド(CP)の検出

本発明による免疫測定法に係るキットを採用して、サンプルにおけるCペプチド(Fitzgeraldから購入、Catalog No: 30-AC96)の含有量を検出する。前記キットは、校正品1~校正品6、ピーク校正品、試薬1(発光抗体、すなわち、抗体によって被覆された発光微粒子)、試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識された抗体)を含む。

20

【0317】

[校正品1~校正品6]従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度はHOOKサンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

30

【0318】

[ピーク校正品の選定]既知のHOOKサンプルを段階希釈し、従来の方法でその信号値を検出し、信号値が最も高いサンプル、本実験ではすなわちサンプル9をピーク校正品として選定する。ピーク校正品の濃度未満のサンプルではHOOK効果が発生することなく、ピーク校正品の濃度を超えると、HOOK効果が発生することになる。そのAの値をR0と表記し、測定対象物がHOOK効果サンプルであるか否かを判定するための臨界値とする。

【0319】

高濃度のCペプチド抗原を段階希釈し、異なる濃度のCペプチドを含むサンプルの濃度を、それぞれ従来の検出方法および本発明の検出方法で測定する。

40

【0320】

[従来の検出方法]校正品1~校正品6、ピーク校正品、測定対象サンプル1~15、試薬1(発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル抗体)をキュベットに加えた後、37で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で10minインキュベートし、光子カウンタで読み取り、RLUを読み取り、その結果を表19に示す。

【0321】

[本発明の2回読み取り方法]校正品1~校正品6、ピーク校正品、測定対象サンプル1~15、試薬1(発光抗体、すなわち、マウスモノクローナル抗体によって被覆された

50

発光微粒子)および試薬2(ビオチン標識抗体、すなわち、ビオチンで標識されたマウスモノクローナル抗体)を37℃で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37℃で3minインキュベートし、RLU1を読み取り、37℃で続けて7minインキュベートし、RLU2を読み取り、2回目の信号値の増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を算出して、その結果を表19に示す。

【0322】

【表19】

表19 従来の検出及び本発明の検出の結果

サンプル	実際濃度	従来の検出結果		本発明の検出結果				
	濃度 ng/ml	RLU	濃度 ng/ml	RLU (1)	RLU (2)	増幅 A	濃度 ng/ml	
校正品	校正品 1	0	304	0	302	331	9.6%	0
	校正品 2	0.59	2035	0.59	1778	1308	-26.4%	0.59
	校正品 3	0.85	2539	0.85	2625	2016	-23.2%	0.85
	校正品 4	6.02	11619	6.02	9717	8017	-17.5%	6.02
	校正品 5	12.05	23261	12.05	21432	18465	-13.8%	12.05
	校正品 6	33.31	55424	33.31	47809	45456	-4.9%	33.31
	ピーク校正品 (サンプル 9)	10000	3170807	>30	2669419	3292270	23.3%	>30
測定対象サンプル	サンプル 1	1	2912	1.06	2900	2251	-22.4%	0.93
	サンプル 2	3	6499	3.12	5729	4545	-20.7%	2.37
	サンプル 3	10	20345	10.54	16747	13986	-16.5%	10.13
	サンプル 4	33	56700	>30	44852	42492	-5.3%	>30
	サンプル 5	100	162356	>30	132253	139349	5.4%	>30
	サンプル 6	335	435784	>30	359060	409421	14.0%	>30
	サンプル 7	1000	1458246	>30	1147167	1367003	19.2%	>30
	サンプル 8	3350	2610397	>30	2305534	2785700	20.8%	>30
	サンプル 9	10000	3170807	>30	2669419	3292270	23.3%	>30
	サンプル 10	33500	2998354	>30	2376362	2986650	25.7%	HOOK
	サンプル 11	100000	2165769	>30	1717649	2233121	30.0%	HOOK
	サンプル 12	335000	946947	>30	742994	981144	32.1%	HOOK
	サンプル 13	1000000	363059	>30	297572	398779	34.0%	HOOK
	サンプル 14	3350000	162871	>30	135756	184090	35.6%	HOOK
	サンプル 15	10000000	58143	>30	46580	64473	38.4%	HOOK
	サンプル 16	33500000	15674	8.15	12274	17359	41.4%	HOOK
	サンプル 17	100000000	2379	0.76	1902	2693	41.6%	HOOK

【備考】Cペプチドの従来検出の検出範囲は0~30ng/mlであり、検出上限を超えたサンプルの濃度は>30ng/mlとして表示される。

【0323】

表19および図26からわかるように、従来の方法で高濃度の抗原を段階希釈したサン

10

20

30

40

50

ブルを検出する場合、濃度が10000 ng/mlに上昇するまでは信号値が濃度の上昇と共に増加し、濃度が上昇し続けると、信号値がCペプチド濃度の上昇と共に低下し、すなわち、濃度が10000 ng/mlを超えると、HD-HOOK効果が発生する。すなわち、濃度が10000 ng/mlであるサンプル9がピーク校正品となり、R0が23.3%である。

【0324】

従来の検出では、検出範囲が0~30 ng/mlであり、検出上限を超えたサンプルの濃度は>30 ng/mlとして表示される。HD-HOOK効果サンプルの濃度が上昇し続けると、信号が低下し続けるので、サンプル16、17のように超高濃度サンプルが低濃度として報告されることになる。そのため、従来の検出では、測定対象サンプルの検出結果が、真実の濃度であるか、それともHD-HOOK効果の影響で低濃度として報告されたかを識別できなくなる。

10

【0325】

実施例16 サンプルにおけるB型肝炎ウイルス表面抗体(HBsAb)の検出

本発明による免疫測定法に係るキットを採用して、サンプルにおけるB型肝炎ウイルス表面抗体(北京中科京達生物技術有限公司から購入、Clone No: M2201)の濃度を検出する。前記キットは、校正品1~校正品6、ピーク校正品、試薬1(発光抗原、すなわち、抗原によって被覆された発光微粒子)、試薬2(ビオチン標識抗原、すなわち、ビオチンで標識された抗原)を含む。

【0326】

[校正品1~校正品6]従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度はHOOKサンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

20

【0327】

[ピーク校正品の選定]既知のHOOKサンプルを段階希釈し、従来の方法でその信号値を検出し、信号値が最も高いサンプル、本実験ではすなわちサンプル9をピーク校正品として選定する。ピーク校正品の濃度未満のサンプルではHOOK効果が発生することなく、ピーク校正品の濃度を超えると、HOOK効果が発生することになる。そのAの値をR0と表記し、測定対象物がHOOK効果サンプルであるか否かを判定するための臨界値とする。

30

【0328】

高濃度のHBsAbを段階希釈し、異なる濃度のHBsAbを含むサンプルの濃度値を、それぞれ従来の検出方法および本発明の検出方法で測定する。

【0329】

[従来の検出方法]校正品1~校正品6、ピーク校正品、測定対象サンプル1~14、試薬1(HBsAgによって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチンで標識されたHBsAg)をキュベットに加えた後、37で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で10minインキュベートし、光子カウンタで読み取り、RLUを読み取り、その結果を表20に示す。

40

【0330】

[本発明の2回読み取り方法]校正品1~校正品6、ピーク校正品、測定対象サンプル1~14、試薬1(HBsAgによって被覆された発光微粒子)および試薬2(ビオチンで標識されたHBsAg)を37で15minインキュベートし、LiCA汎用液(ストレプトアビジンで標識された感光微粒子)を加え、37で3minインキュベートし、RLU1を読み取り、37で続けて7minインキュベートし、RLU2を読み取り、2回目の信号値の増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を算出して、その結果を表20に示す。

【0331】

【表 20】

表 20 従来の検出及び本発明の検出の結果

	サンプル	実際濃度	従来の検出結果		本発明の検出結果			
		濃度 mIU/ml	RLU	濃度 mIU/ml	RLU1	RLU2	増幅 A	濃度 mIU/ml
校正品	校正品 1	0	524	0	498	523	5.0%	0
	校正品 2	10.23	3548	10.23	3188	4049	27.0%	10.23
	校正品 3	71.95	21493	71.95	17403	22854	31.3%	71.95
	校正品 4	213.65	64993	213.65	50526	67526	33.6%	213.65
	校正品 5	584.26	181544	584.26	133863	180954	35.2%	584.26
	校正品 6	1026.18	342125	1026.18	255651	347371	35.9%	1026.18
	ピーク校正品 (サンプル 9)	10,000	1050237	>1000	775542	1066620	37.5%	>1000
測定対象サンプル	サンプル 1	1	703	0.6	652	737	13.0%	0.58
	サンプル 2	3	1257	2.48	1182	1424	20.5%	2.58
	サンプル 3	10	3443	9.87	2876	3592	24.9%	9.02
	サンプル 4	33	9387	30.24	7743	10124	30.8%	28.78
	サンプル 5	100	31033	103.93	25555	33721	32.0%	107.83
	サンプル 6	335	101781	332.87	79257	106917	34.9%	341.56
	サンプル 7	1,000	341483	>1000	259926	352344	35.6%	>1000
	サンプル 8	3,350	757906	>1000	570542	781231	36.9%	>1000
	サンプル 9	10,000	1050237	>1000	775542	1066620	37.5%	>1000
	サンプル 10	33,500	985422	>1000	753452	1039798	38.0%	HOOK
	サンプル 11	100,000	576535	>1000	415949	577782	38.9%	HOOK
	サンプル 12	335,000	258461	802.57	184878	259170	40.2%	HOOK
	サンプル 13	1,000,000	107739	352.22	75811	109111	43.9%	HOOK
	サンプル 14	3,350,000	44514	147.9	33501	48374	44.4%	HOOK

【備考】HBsAb の従来検出の検出範囲は 0~1000mIU/ml であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は >1000mIU/ml として表示される。

【0332】

表 20 および図 28 からわかるように、従来の方法で高濃度の HBsAb を段階希釈したサンプルを検出する場合、濃度が 10000 mIU/ml に上昇するまでは信号値が濃度の上昇と共に増加し、濃度が上昇し続けると、信号値が HBsAb 濃度の上昇と共に低下し、すなわち、濃度が 10000 mIU/ml を超えると、HD-HOOK 効果が発生する。すなわち、濃度が 10000 mIU/ml であるサンプル 9 がピーク校正品となり、R0 が 37.5% である。

【0333】

従来の検出では、検出範囲が 0~1000 mIU/ml であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は >1000 mIU/ml として表示される。HD-HOOK 効果サンプルの

10

20

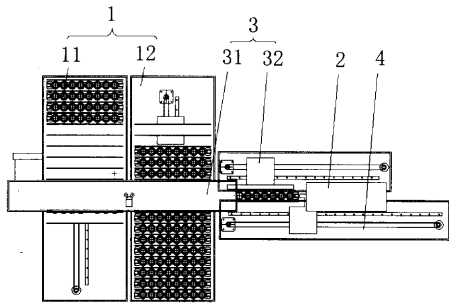
30

40

50

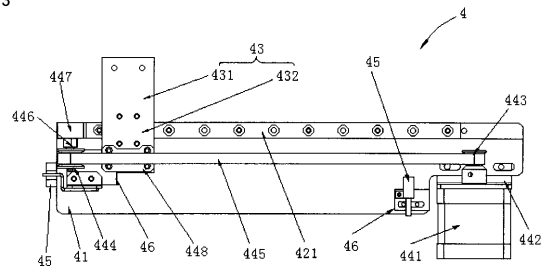
【図1】

図1



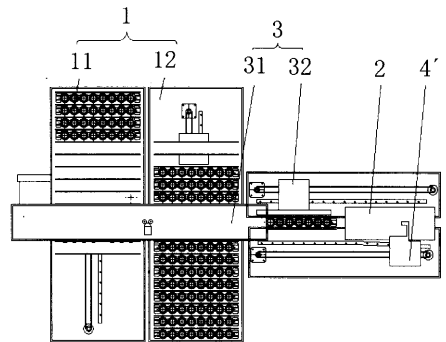
【図3】

図3



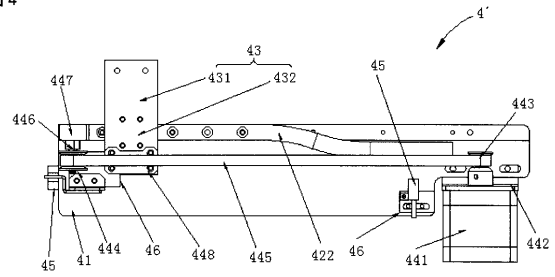
【図2】

図2



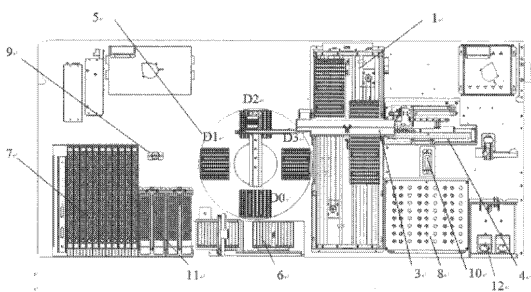
【図4】

図4



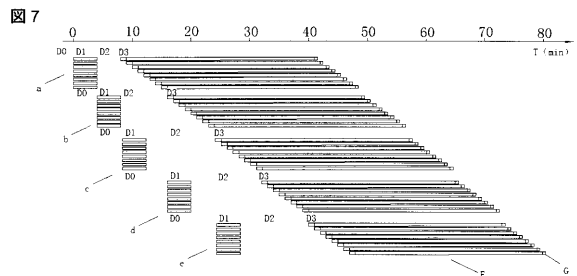
【図5】

図5



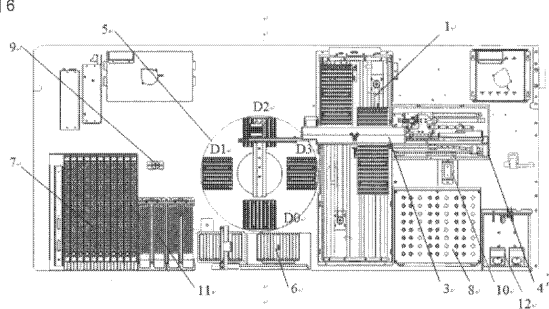
【図7】

図7



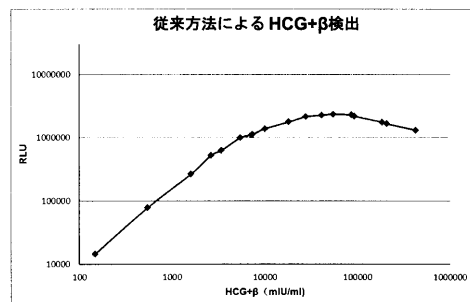
【図6】

図6

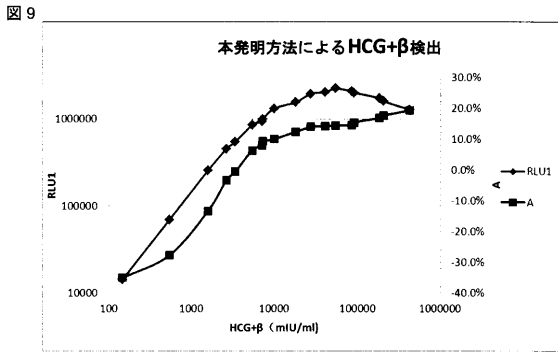


【図8】

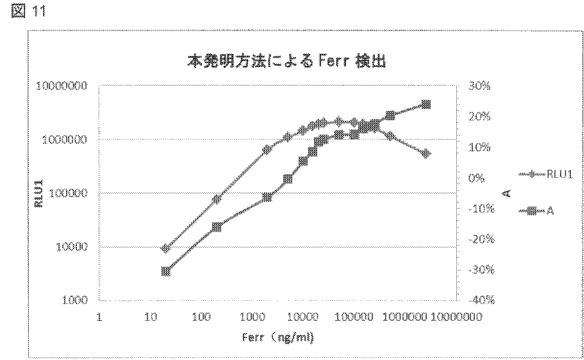
図8



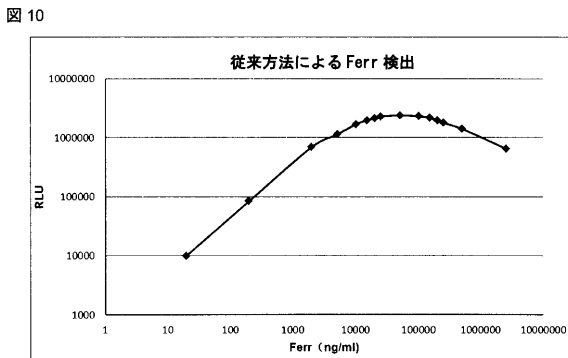
【 図 9 】



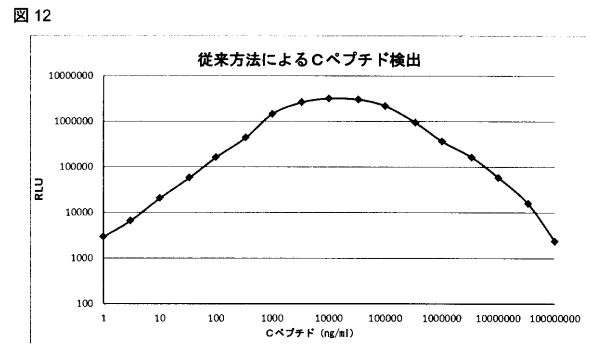
【 図 1 1 】



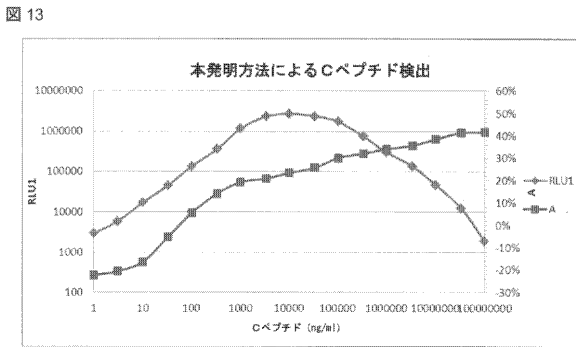
【 図 1 0 】



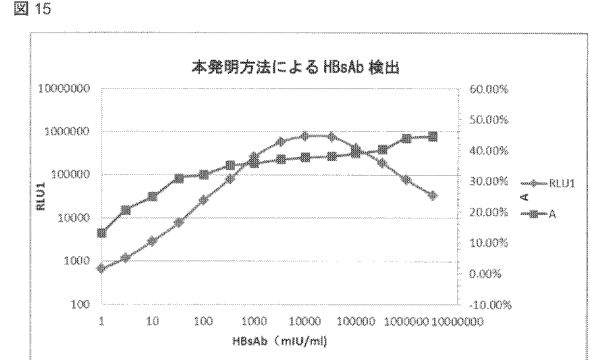
【 図 1 2 】



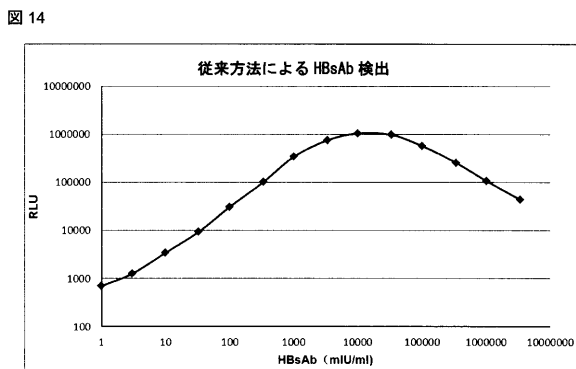
【 図 1 3 】



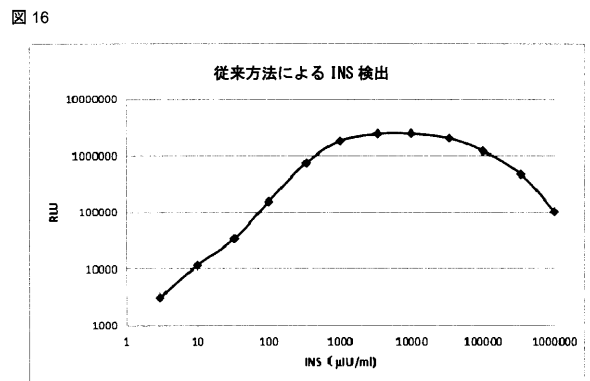
【 図 1 5 】



【 図 1 4 】

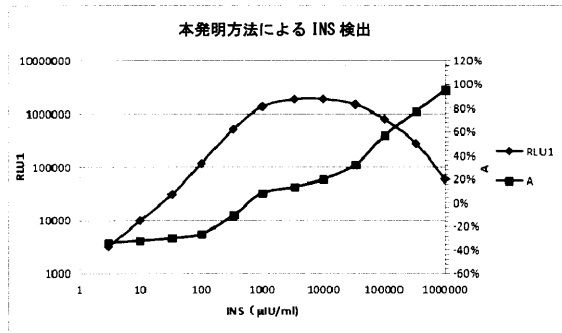


【 図 1 6 】



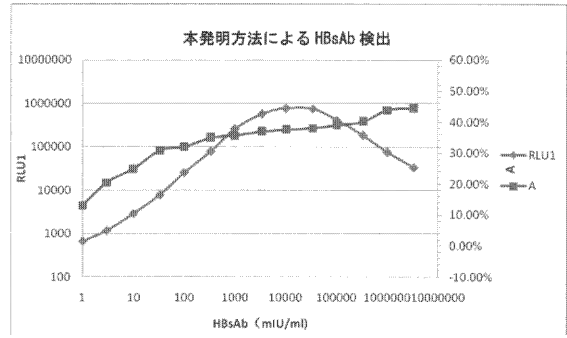
【 図 17 】

図 17



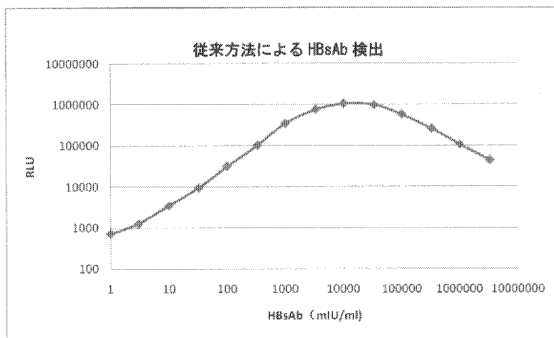
【 図 19 】

図 19



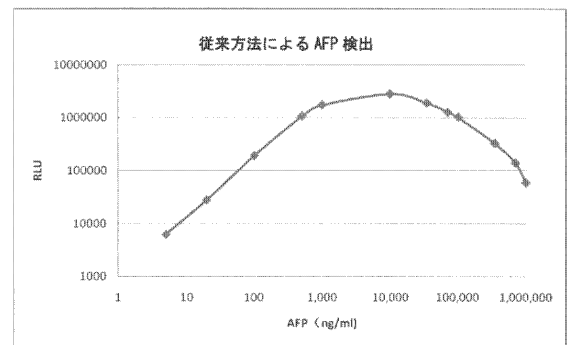
【 図 18 】

図 18



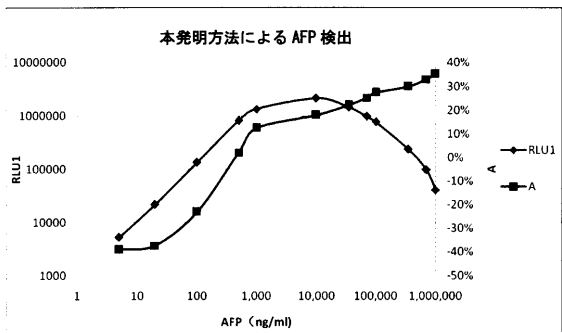
【 図 20 】

図 20



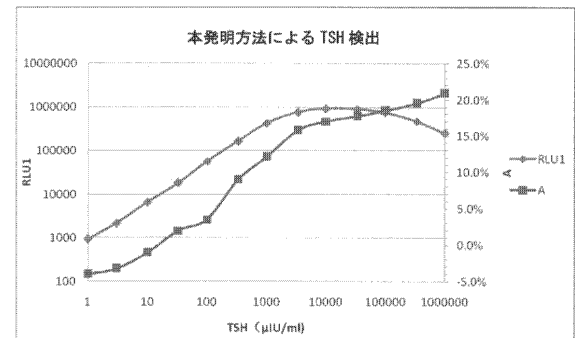
【 図 21 】

図 21



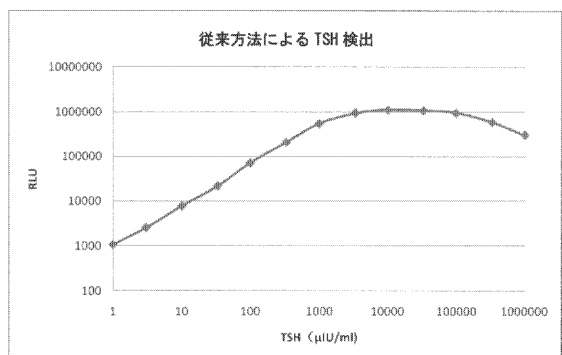
【 図 23 】

図 23



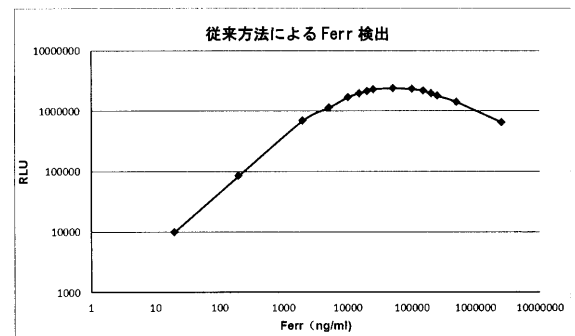
【 図 22 】

図 22



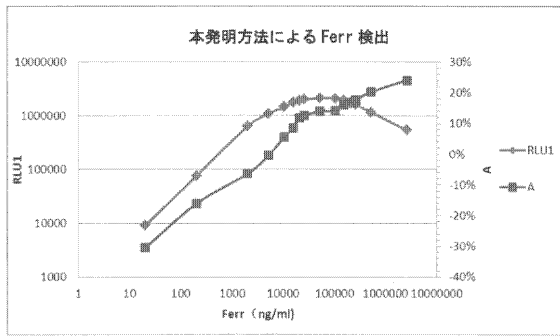
【 図 24 】

図 24



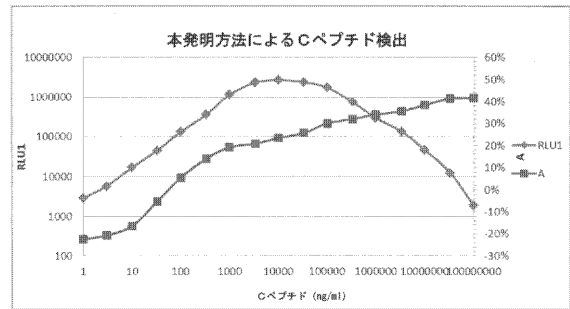
【 図 2 5 】

図 25



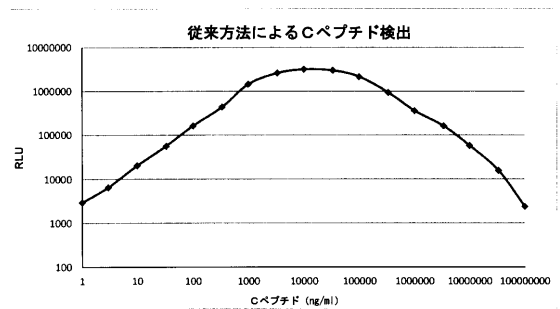
【 図 2 7 】

図 27



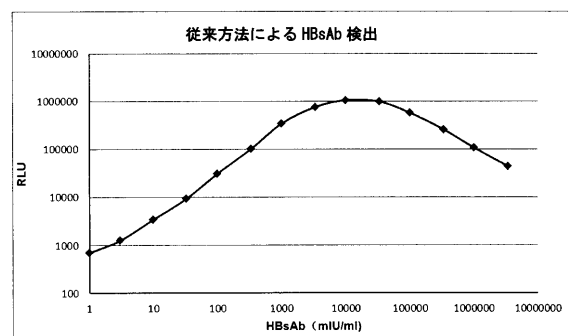
【 図 2 6 】

図 26



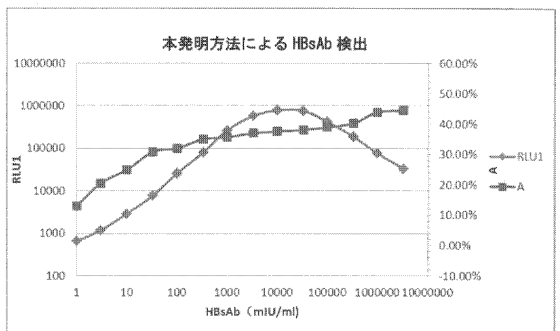
【 図 2 8 】

図 28



【 図 2 9 】

図 29



【手続補正書】

【提出日】令和1年7月29日(2019.7.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅AをR0とし、測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の増幅A'がR0を超えているかを比較し、R0を超えている場合、サンプルがHD-HOOK効果を有し、R0未満の場合、HD-HOOK効果を有しないとす、というステップを含むことを特徴とするHD-HOOK効果サンプルを同定する方法。

【請求項2】

前記方法は、

(1)校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2)1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3)2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4)サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5)ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅AをR0とするステップと、

(6)測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、このサンプルがHD-HOOK効果サンプルであると同定するステップと、を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、測定対象サンプルがHD-HOOK効果サンプルであり、希釈する必要がある、A'がR0未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされ、

前記校正曲線は、校正品の1回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、

化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録するための化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、

測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅A'によってHD-HOOK効果サンプルの有無を特定するためのプロセッサと、を備える

免疫測定におけるHD-HOOK効果を同定するためのシステム。

【請求項5】

前記システムは、

化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、

化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録するための化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、

測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅 A' が、ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅 R_0 を超えているかを比較し、 R_0 を超えている場合、サンプルがHD-HOOK効果を有し、 R_0 未満の場合、HD-HOOK効果を有しないとするプロセッサと、を備え、

化学発光の2回目の読み取りは、同一の免疫反応に対して一定の時間が経過した後に再度励起させ読み取ることによって得られるものである、請求項4に記載のシステム。

【請求項6】

前記システムの使用方法は、

(1) 校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅 A を R_0 とするステップと、

(6) 測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A' の値を R_0 と比較し、 A' が R_0 以上である場合、このサンプルがHD-HOOK効果サンプルであると同定するステップと、を含むことを特徴とする請求項4に記載のシステム。

【請求項7】

測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A' の値を R_0 と比較し、 A' が R_0 以上である場合、測定対象サンプルがHD-HOOK効果サンプルであり、希釈する必要がある、 A' が R_0 未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされ、

前記校正曲線は、校正品の1回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする請求項6に記載のシステム。

【請求項8】

校正品、ピーク校正品、第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を含むキットであって、前記キットの使用方法は、校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅 A' によってHD-HOOK効果サンプルの有無を特定することを特徴とするキット。

【請求項9】

前記キットの使用方法は、校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の増幅 A' がピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅 R_0 を超えているかを比較し、 R_0 を超えている場合、サンプルがHD-HOOK効果を有し、 R_0 未満の場合、HD-HOOK効果を有しないとする、というステップを含む請求項8に記載のキット。

【請求項 10】

前記キットの使用方法は、

(1) 校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅AをR0とするステップと、

(6) 測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、このサンプルがHD-HOOK効果サンプルであると同定するステップと、を含むことを特徴とする請求項8に記載のキット。

【請求項 11】

測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、測定対象サンプルがHD-HOOK効果サンプルであり、希釈する必要がある、A'がR0未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされ、

前記校正曲線は、校正品の1回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする請求項8に記載のキット。

【請求項 12】

化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して複数回の読み取りを実行するための読み取りユニットと、

前記読み取りユニットに接続され、前記読み取りユニットの読み取りによって免疫測定にはHD-HOOKのリスクの有無を判定する処理ユニットと、を備える

HD-HOOK効果サンプルを同定するための免疫測定装置。

【請求項 13】

インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに移動し読み取りを実行するための移動機構、及び/又は、

化学発光免疫反応のために適切な環境温度を提供するためのインキュベータ、及び/又は、

読み取りが完了した後の混合液を前記インキュベータに復帰させ再度インキュベートするための復帰機構をさらに備えることを特徴とする請求項12に記載の免疫測定装置。

【請求項 14】

前記移動機構は押出し機構であり、前記復帰機構は押戻し機構であり、前記混合液はスラットで収容されることを特徴とする請求項13に記載の免疫測定装置。

【請求項 15】

前記読み取りユニットは化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して2回の読み取りを実行することに用いられることを特徴とする請求項12~14のいずれか1項に記載の免疫測定装置。

【請求項 16】

(1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅をAとするステップと、(2) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの差分増幅A'に基づいて標準曲

線を作成し、及び/または、測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの差分増幅 A' に基づいて標準を作成するステップと、(3)測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線および/または標準と比較するステップと、を含む免疫測定方法。

【請求項17】

測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線と比較することを特徴とする請求項16に記載の免疫測定方法。

【請求項18】

前記既知の一連の標準物質の濃度は、 $HD - HOOK$ 効果が生じる濃度よりも低く、および/または前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする請求項17に記載の免疫測定方法。

【請求項19】

前記方法は、(4)測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含むことを特徴とする請求項18に記載の免疫測定方法。

【請求項20】

前記方法は、

(a1)測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(a2)1回目の読み取り：ステップ(a1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 $RLU1$ とするステップと、

(a3)2回目の読み取り：ステップ(a2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 $RLU2$ とするステップと、

(a4)サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(a5)測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質(ただし、標準物質の濃度は、 $HD - HOOK$ 効果が生じる濃度よりも低い)の2回の読み取りの増幅 A' に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(a6)測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含むことを特徴とする請求項19に記載の免疫測定方法。

【請求項21】

測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準と比較し、かつ前記標準は臨界値であり、および/または、前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする請求項16に記載の免疫測定方法。

【請求項22】

前記方法は、(4)測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップ、をさらに含むことを特徴とする請求項21に記載の免疫測定方法。

【請求項23】

前記方法は、

(c1)測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗

原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(c2) 1回目の読み取り：ステップ(c1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(c3) 2回目の読み取り：ステップ(c2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(c4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(c5) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(c6) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとすることを特徴とする請求項2.2に記載の免疫測定方法。

【請求項2.4】

前記方法は、(4) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りが前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含むことを特徴とする請求項2.1に記載の免疫測定方法。

【請求項2.5】

前記方法は、

(d1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(d2) 1回目の読み取り：ステップ(d1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(d3) 2回目の読み取り：ステップ(d2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(d4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(d5) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(d6) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含むことを特徴とする請求項2.4に記載の免疫測定方法。

【請求項2.6】

前記方法は、(4) サンプルの濃度を特定するステップをさらに含むことを特徴とする請求項1.7に記載の免疫測定方法。

【請求項2.7】

前記方法は、

(b1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(b2) 1回目の読み取り：ステップ(b1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(b3) 2回目の読み取り：ステップ(b2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(b4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(b5) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅A'に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(b6) Aの値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルのRLU1をそれに対応する標準曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含み

前記校正曲線は、測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質の1回目の読み取りと既知の一連の標準物質の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする請求項26に記載の免疫測定方法。

【請求項28】

免疫測定を同定するためのシステムであって、

化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、

化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録するとともに、2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅をAとするための化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、

プロセッサと、を備えるシステム。

【請求項29】

前記プロセッサは、測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅Aに基づいて標準曲線を作成するのに用いられ、ここで標準物質の濃度はHD-HOOK効果が生じる濃度よりも低く、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定することを特徴とする請求項28に記載のシステム。

【請求項30】

前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質(ただし、標準物質の濃度はHD-HOOK効果が生じる濃度よりも低くなっている)の2回の読み取りの増幅Aに基づいて標準曲線を作成するステップと、

(6) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップとを含むことを特徴とする請求項29に記載のシステム。

【請求項31】

前記プロセッサは、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較するのに用いられ、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が前記既知の標準物質の濃度よりも高くなっていることを特徴とする請求項28に記載のシステム。

【請求項32】

前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅Aを臨界値とするステップと、

(6) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が前記既知の標準物質の濃度よりも高くなっていることを特徴とする請求項31に記載のシステム。

【請求項33】

前記プロセッサは、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較するのに用いられ、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定し、

および/または前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする請求項28に記載のシステム。

【請求項34】

前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取り

によって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅 A を臨界値とするステップと、

(6) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A を臨界値と比較して、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップとを含むことを特徴とする請求項33に記載のシステム。

【請求項35】

前記プロセッサは、測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質の1回目の読み取りと2回の読み取りの増幅 A に基づいてそれぞれ校正曲線と標準曲線を作成し、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの1回目の読み取りと2回の読み取りの増幅 A をそれぞれ校正曲線及び標準曲線と比較して、サンプルの濃度を特定するのに用いられることを特徴とする請求項28に記載のシステム。

【請求項36】

前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 $RLU1$ とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、 $RLU2$ とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅 A に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(6) A の値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルの $RLU1$ をそれに対応する校正曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含むことを特徴とする請求項35に記載のシステム。

【請求項37】

第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を含むキットであって、前記キットの使用方法は、(1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅を A とするステップと、(2) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの差分増幅 A' に基づいて標準曲線を作成し、及び/または、測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの差分増幅 A'' に基づいて標準曲線を作成するステップと、(3) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線および/または標準と比較するステップと、を含むことを特徴とするキット。

【請求項38】

測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の

読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線と比較することを特徴とする請求項 3 7 に記載のキット。

【請求項 3 9】

前記既知の一連の標準物質の濃度は、H D - H O O K 効果が生じる濃度よりも低く、および / または前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする請求項 3 8 に記載のキット。

【請求項 4 0】

前記キットの使用方法は、(4) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含むことを特徴とする請求項 3 9 に記載のキット。

【請求項 4 1】

前記キットの使用方法は、

(a 1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(a 2) 1 回目の読み取り：ステップ (a 1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 1 とするステップと、

(a 3) 2 回目の読み取り：ステップ (a 2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 2 とするステップと、

(a 4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 1 0 0$ % で算出するステップと、

(a 5) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質 (ただし、標準物質の濃度は、H D - H O O K 効果が生じる濃度よりも低い) の 2 回の読み取りの増幅 A ' に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(a 6) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップとを含むことを特徴とする請求項 4 0 に記載のキット。

【請求項 4 2】

測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準と比較し、かつ前記標準は臨界値であることを特徴とする請求項 3 9 に記載のキット。

【請求項 4 3】

前記キットの使用方法は、(4) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップ、をさらに含み、

および / または、前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする請求項 4 2 に記載のキット。

【請求項 4 4】

前記キットの使用方法は、

(c 1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(c 2) 1 回目の読み取り：ステップ (c 1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 1 とするステップと、

(c 3) 2 回目の読み取り：ステップ (c 2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光

子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(c4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(c5) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(c6) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップと、を含むことを特徴とする請求項43に記載のキット。

【請求項45】

前記キットの使用方法は、(4) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りが前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップをさらに含むことを特徴とする請求項42に記載のキット。

【請求項46】

前記キットの使用方法は、

(d1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(d2) 1回目の読み取り：ステップ(d1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(d3) 2回目の読み取り：ステップ(d2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(d4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(d5) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(d6) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含むことを特徴とする請求項45に記載のキット。

【請求項47】

前記キットの使用方法は、(4) サンプルの濃度を特定するステップをさらに含むことを特徴とする請求項38に記載のキット。

【請求項48】

前記キットの使用方法は、

(b1) 測定すべき目標抗原または抗体を含む測定対象サンプルを第1の抗体または抗原によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体または抗原と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(b2) 1回目の読み取り：ステップ(b1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(b3) 2回目の読み取り：ステップ(b2)において1回目の読み取りを行った後の

反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(b4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(b5) 測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅A'に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(b6) Aの値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルのRLU1をそれに対応する校正曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含み、

前記標準曲線は、測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質の1回目の読み取りと既知の一連の標準物質の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする請求項47に記載のキット。

【請求項49】

化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して複数回の読み取りを実行するための読み取りユニットと、

前記読み取りユニットに接続され、前記読み取りユニットの読み取りによって免疫測定にはHD-HOOKのリスクの有無を判定する処理ユニットと、を備える免疫測定装置。

【請求項50】

インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに移動し読み取りを実行するための移動機構、及び/又は、

化学発光免疫反応のために適切な環境温度を提供するためのインキュベータ、及び/又は、

読み取りが完了した後の混合液を前記インキュベータに復帰させ再度インキュベートするための復帰機構をさらに備えることを特徴とする請求項49に記載の免疫測定装置。

【請求項51】

前記移動機構は押し出し機構であり、前記復帰機構は押し戻し機構であり、前記混合液はスラットで収容されることを特徴とする請求項50に記載の免疫測定装置。

【請求項52】

前記読み取りユニットは化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して2回の読み取りを実行することに用いられることを特徴とする請求項49～51のいずれか1項に記載の免疫測定装置。

【請求項53】

前記インキュベータは第1のインキュベータと第2のインキュベータとを有し、前記押し出し機構は、第1のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を第2のインキュベータに押し出しインキュベートするのに用いられ、かつ前記押し出し機構は第2のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し1回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記押し戻し機構は、1回目の読み取りが完了した後の混合液を第2のインキュベータに押し戻し再度インキュベートするのに用いられ

前記押し出し機構は、さらに、第2のインキュベータ内で再度インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し2回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記処理ユニットが2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えていると検出した場合、免疫測定にはHD-HOOKのリスクが存在すると判定することを特徴とする請求項51に記載の免疫測定装置。

【請求項54】

前記押し戻し機構は、

底板と、

前記底板に設けられているガイドレールと、

前記ガイドレールに設けられ、スラットを支持するための移動カップ機構と、

前記移動カップ機構を前記ガイドレールに沿って移動させるための駆動装置と、
前記底板の両端に設けられ、前記移動カップ機構の位置を検出するための光電センサと

、
前記光電センサに接続され、前記光電センサによって発せられた位置信号に基づいて前記移動カップ機構の位置を調整することができる位置調整機構とを備えることを特徴とする請求項 5 1 に記載の免疫測定装置。

【請求項 5 5】

前記ガイドレールは直線レールまたは可変レールであることを特徴とする請求項 5 4 に記載の免疫測定装置。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 2】

従来技術に存在する欠陥に関して、本発明は、反応を中断することなく、2回の読み取りによって検出範囲を広げるとともに、測定対象サンプルに HD - HOOK 効果が存在するかどうかを正確に判定し、測定対象サンプルにおける測定対象物の濃度を簡便かつ迅速に算出することができる、免疫測定方法を提供することを目的とする。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 8】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記インキュベータは第1のインキュベータと第2のインキュベータとを有し、前記押し出し機構は、第1のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を第2のインキュベータに押し出しインキュベートするのに用いられ、かつ前記押し出し機構は第2のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し1回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記押し戻し機構は、1回目の読み取りが完了した後の混合液を第2のインキュベータに押し戻し再度インキュベートするのに用いられ、

前記押し出し機構は、さらに、第2のインキュベータ内で再度インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し2回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記処理ユニットが2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えていると検出した場合、免疫測定には HD - HOOK のリスクが存在すると判定する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 9】

試料添加完了後のスラットが第1のインキュベータに入った後、スラットが押し出し機構によって第2のインキュベータに送られ、この工程において、測定対象サンプルと試薬が含まれるスラットに標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加える必要もあり、その後サンプルを第2のインキュベータ 1 2 に入れ、インキュベートされ、インキュベートさ

れた後に、スラットが押し出し機構によって読み取りユニットに送られ励起光に照射され、出射光量を検出し、1回目の読み取りを記録する。1回目の読み取りが完了した後のスラットが押し戻し機構によって第2のインキュベータに押し戻され再度インキュベートされ、再度インキュベートされた後に、前記スラットは再び押し出し機構によって読み取りユニットに送られ励起光に照射され、出射光量を検出し、2回目の読み取りを記録する。2回の読み取りが完了した後に、処理ユニットによって2回の読み取りが処理され、2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えている場合、当該免疫測定にはHD - HOOKのリスクが存在すると判定する。一つの方法としては、その装置が定性的にHD - HOOKに関する提示情報を与え、作業者がサンプルを希釈してから再度測定することである。もう一つの方法としては、その装置が直接に定量的な結果を与えることであるが、その結果は線形性範囲よりも遥かに高くなっている。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0070

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0070】

従来技術と比べて、この装置は読み取りユニットを設けることにより、読み取りユニットでインキュベートされた後の混合液に対して2回乃至複数回の読み取りを実行し、そして処理ユニットで読み取りユニットによる読み取りを処理することによって、免疫測定にはHD - HOOKのリスクが存在するかどうかを判定し、HD - HOOK効果に起因する、測定対象サンプルに対してその濃度が検出用キットの線形性範囲を超えたためか、それともそれ自体の濃度がその値であるかを正しく区別できないことを回避し、実験上の誤診を回避することができる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0074

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0074】

本発明のいくつかの実施例では、前記既知の標準物質の濃度は、HD - HOOK効果が生じる濃度よりも低く、かつ前記既知の標準物質は陽性対照である。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0076

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0076】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、前記方法は、

(a1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(a2) 1回目の読み取り: ステップ(a1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(a3) 2回目の読み取り: ステップ(a2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光

子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(a4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(a5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質(ただし、標準物質の濃度は、HD-HOOK効果が生じる濃度よりも低い。)の2回の読み取りの増幅A'に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(a6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含む。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0089

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0089】

本発明のいくつかの実施の形態では、前記プロセッサは、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅Aに基づいて標準曲線を作成するのに用いられ、ここで標準物質の濃度はHD-HOOK効果が生じる濃度よりも低く、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定する。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0090

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0090】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り: ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り: ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質(ただし、標準物質の濃度はHD-HOOK効果が生じる濃度よりも低くなっている。)の2回の読み取りの増幅Aに基づいて標準曲線を作成するステップと、

(6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含む。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0102

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0102】

本発明のいくつかの実施例では、前記既知の標準物質の濃度は、HD - HOOK効果が生じる濃度よりも低く、かつ前記既知の標準物質は陽性対照である。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0104

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0104】

本発明のいくつかの具体的な実施例では、前記キットの使用方法は、

(a1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第1の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(a2) 1回目の読み取り：ステップ(a1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(a3) 2回目の読み取り：ステップ(a2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(a4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(a5) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質（ただし、標準物質の濃度は、HD - HOOK効果が生じる濃度よりも低い。）の2回の読み取りの増幅A'に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(a6) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含む。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0112

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0112】

ここで、上記方法は非疾患診断目的の方法であることに特に留意されたく、前記方法は Double - Antibody Sandwich Immunoassay または Double - Antigen Sandwich Immunoassay の検出過程において2回の読み取りによって検出範囲を広げるとともに、測定対象サンプルに HD - HOOK 効果が存在するかどうかを正確に判定し、測定対象サンプルにおける測定対象物の濃度を簡便かつ迅速に算出することができる。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0135

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0135】

本発明の第8の側面は、
化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して複数回の読み取りを実行するための読み取りユニットと、
前記読み取りユニットに接続され、前記読み取りユニットの読み取りによって免疫測定にはHD - HOOKのリスクの有無を判定する処理ユニットと、を備える
免疫測定装置を提供する。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0141

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0141】

本発明のいくつかの具体的な実施の形態では、前記インキュベータは第1のインキュベータと第2のインキュベータとを有し、前記押し出し機構は、第1のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を第2のインキュベータに押し出しインキュベートするのに用いられ、かつ前記押し出し機構は第2のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し1回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記押し出し機構は、1回目の読み取りが完了した後の混合液を第2のインキュベータに押し出し再度インキュベートするのに用いられ、

前記押し出し機構は、さらに、第2のインキュベータ内で再度インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し2回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記処理ユニットが2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えていると検出した場合、免疫測定にはHD - HOOKのリスクが存在すると判定する。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0152

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0152】

試料添加完了後のスラットが第1のインキュベータに入った後、スラットが押し出し機構によって第2のインキュベータに送られ、この工程において、測定対象サンプルと試薬が含まれるスラットに標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加える必要もあり、その後サンプルを第2のインキュベータ12に入れ、インキュベートされ、インキュベートされた後に、スラットが押し出し機構によって読み取りユニットに送られ励起光に照射され、出射光量を検出し、1回目の読み取りを記録する。1回目の読み取りが完了した後のスラットが押し出し機構によって第2のインキュベータに押し戻され再度インキュベートされ、再度インキュベートされた後に、前記スラットは再び押し出し機構によって読み取りユニットに送られ励起光に照射され、出射光量を検出し、2回目の読み取りを記録する。2回の読み取りが完了した後に、処理ユニットによって2回の読み取りが処理され、2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えている場合、当該免疫測定にはHD - HOOKのリスクが存在すると判定する。一つの方法としては、その装置が定性的にHD - HOOKに関する提示情報を与え、作業者がサンプルを希釈してから再度測定することである。もう一つの方法としては、その装置が直接に定量的な結果を与えることであるが、その結果は線形性範囲よりも遥かに高くなっている。

【手続補正 16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0153

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0153】

従来技術と比べて、本発明の利点としては、この装置は読み取りユニットを設けることにより、読み取りユニットでインキュベートされた後の混合液に対して2回乃至複数回の読み取りを実行し、そして処理ユニットで読み取りユニットによる読み取りを処理することによって、免疫測定にはHD - HOOKのリスクが存在するかどうかを判定し、HD - HOOK効果に起因する、測定対象サンプルに対してその濃度が検出用キットの線形性範囲を超えたためか、それともそれ自体の濃度がその値であるかを正しく区別できないことを回避し、実験上の誤診を回避することができる。

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0166

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0166】

処理ユニット（未図示）は、2回目の読み取りおよび1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えていると、スラットを希釈してから測定する。前記標準曲線は、測定すべき目標抗原または抗体を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅に基づいて作成されたものであり、前記標準物質の濃度は、HD - HOOK効果が生じる濃度よりも低い。ここで、前記処理ユニットは前記読み取りに対して処理やプロットなどをするコンピュータとされてもよい。

【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0180

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0180】

2回の読み取りが完了した後に、処理ユニット2によって2回の読み取りが処理され、2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えている場合、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りが前記既知の標準物質よりも低くなっている場合、一つの方法としては、その装置が定性的にHD - HOOKに関する提示情報を与え、作業者がサンプルを希釈してから再度測定することであり、もう一つの方法としては、その装置が直接的に定量的な結果を与えることであるが、その結果は線形性範囲よりも遥かに高くなっている。図7は一つの完全な測定フローを示すシーケンスチャートであり、この図は希釈フローなしの測定シーケンスチャートである。図面では、a、b、c、dおよびeは、それぞれ、第1群のスラット、第2群のスラット、第3群のスラット、第4群のスラットおよび第5群のスラットを表す。

【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0196

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 1 9 6 】

[校正品 1 ~ 校正品 6] 従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度は HD - HOOK サンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【 手続補正 2 0 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 2 0 3

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 2 0 3 】

本発明の方法では、2回の読み取りによって HD - HOOK 効果に起因する報告濃度が低いサンプルを同定するようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果である RLU_1 、 RLU_2 を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU_2 / RLU_1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度を判定するための指標の一つとする。表 1 および図 9 からわかるように、信号値が 54531 mIU/ml までは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅 A は濃度とともに上昇し続けることになる。したがって、測定対象サンプルの A の値と校正品の A の値とを直接に比較すれば、測定対象サンプルの濃度と校正品の濃度との大小関係を判定することができる。サンプル 10 ~ 18 の増幅 A がいずれも校正品 6 の増幅 (11.1%) を超えており、かつ A の値が増加し続けるので、サンプル 10 ~ 18 の HCG+ 濃度はいずれも 10000 mIU/ml を超え、かつ濃度が上昇し続け、それは Roche の濃度結果と一致することが示されている。サンプル 18 の信号値が校正品 6 よりも低くなり、従来の方法では濃度が 8713.02 mIU/ml として検出されるが、本発明の方法ではそれが HD - HOOK 効果サンプルとして同定することができ、希釈して検出する必要がある。

【 手続補正 2 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 2 0 5

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 2 0 5 】

[校正品 1 ~ 校正品 6] 従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度は HD - HOOK サンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【 手続補正 2 2 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 2 1 2

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 2 1 2 】

本発明の方法では、2回の読み取りによって HD - HOOK 効果に起因する報告濃度が低いサンプルを同定するようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果である RLU_1 、 RLU_2 を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU_2 / RLU_1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度を判定するための指標の一つとする。表 2 および図 11 からわかるように、信号値が 51000 ng/ml までは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅 A は濃度とともに上昇し続けることになる。したがって、測定対象サンプルの A の値と校正品の A の値とを直接に比較すれば、測定対象サンプルの濃度と校正品の濃度との大小関係を判定することができる。

サンプル 4 ~ 15 の増幅 A がいずれも校正品 6 の増幅 (- 5 . 5 %) を超えているので、サンプル 4 ~ 15 の Ferr 濃度はいずれも 2000 ng / ml を超えていることが示されている。それは実際の濃度に合致しており、サンプル 15 の信号値が校正品 6 よりも低くなり、従来の方法では濃度が 1860 . 97 ng / ml として検出されるが、本発明の方法では、それは濃度が検出範囲を超えたサンプルとして同定することができ、希釈して検出する必要がある。

【手続補正 23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0214

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0214】

[校正品 1 ~ 校正品 6] 従来キットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度は HD - HOOK サンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【手続補正 24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0221

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0221】

本発明の方法では、2回の読み取りによって HD - HOOK 効果に起因する報告濃度が低いサンプルを同定するようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果である RLU1、RLU2 を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度を判定するための指標の一つとする。表3および図13からわかるように、信号値が 10000 ng / ml までは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅 A は濃度とともに上昇し続けることになる。したがって、測定対象サンプルの A の値と校正品の A の値とを直接に比較すれば、測定対象サンプルの濃度と校正品の濃度との大小関係を判定することができる。サンプル 5 ~ 17 の増幅 A がいずれも校正品 6 の増幅 (- 4 . 9 %) を超えているので、サンプル 5 ~ 17 の C ペプチド濃度はいずれも 30 ng / ml を超え、検出上限を超えていることが示されている。それは実際の濃度に合致しており、サンプル 16、17 の信号値が校正品 6 よりも低くなり、従来の方法では濃度がそれぞれ、8 . 15 ng / ml、0 . 76 ng / ml として検出されるが、本発明の方法では、それらは検出上限を超えたサンプルとして同定することができ、希釈して検出する必要がある。

【手続補正 25】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0223

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0223】

[校正品 1 ~ 校正品 6] 従来キットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度は HD - HOOK サンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【手続補正 26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0227

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0227】

本発明の方法によって得られた15個の血清サンプルの濃度は表4に示す通りである。まず、校正品6の増幅と比較するによって検出上限(336.56 IU/mL)を超えたサンプルを識別し、すなわち、Aの値が27%を超えると、HD-HOOK効果サンプルであると判定し、希釈してから検出することを提案する。一方、Aが27%未満であると、検出範囲内のサンプルであると判定し、そのまま校正曲線でサンプル濃度を算出することができる。

【手続補正27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0228

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0228】

サンプルを段階希釈した後に濃度の変化を検出することで上記結論の信頼性を検証する。サンプル1~サンプル15に対していずれも2倍希釈と4倍希釈を行うとともに、従来の検出方法で未希釈の原倍サンプル、2倍希釈サンプルと4倍希釈サンプルを検出して、希釈後の濃度の変化を観測することによってそのサンプルにはHD-HOOK効果が存在するか否かを判定し、すなわち、希釈後にサンプル濃度が逆に上昇する場合はHD-HOOK効果サンプルであると判定する。非HD-HOOK効果サンプルは希釈後に濃度が低下することになる。その結果を表5に示す。

【手続補正28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0229

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0229】

【表 5】

表 5 希釈検証結果

希釈 検証	検出濃度			濃度 IU/mL
	原倍サン プル	2 倍希釈サン プル	4 倍希釈サン プル	
サンプル 1	128.79	262.17	474.22	<u>HD-HOOK</u>
サンプル 2	135.81	249.87	417.08	<u>HD-HOOK</u>
サンプル 3	228.96	388.23	642.69	<u>HD-HOOK</u>
サンプル 4	369.11	222.22	124.14	369.11
サンプル 5	353.47	618.94	886.34	<u>HD-HOOK</u>
サンプル 6	74.52	132.14	226.20	<u>HD-HOOK</u>
サンプル 7	134.44	60.89	31.22	134.44
サンプル 8	154.76	72.45	36.50	154.76
サンプル 9	331.50	546.11	881.46	<u>HD-HOOK</u>
サンプル 10	260.78	104.97	49.26	260.78
サンプル 11	174.00	97.86	51.41	174.00
サンプル 12	82.80	176.16	328.03	<u>HD-HOOK</u>
サンプル 13	94.92	192.47	367.37	<u>HD-HOOK</u>
サンプル 14	158.96	277.50	434.39	<u>HD-HOOK</u>
サンプル 15	269.64	480.82	814.12	<u>HD-HOOK</u>

【手続補正 29】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0232

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0232】

[校正品 1 ~ 校正品 6] 従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度は HD-HOOK サンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【手続補正 30】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0236

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0236】

本発明の方法によって得られた18個の血清サンプルの濃度は表6に示す通りである。まず、校正品6の増幅と比較するによって検出上限を超えたサンプルを識別し、すなわち、Aの値が7.4%を超えると、検出上限を超えたサンプルであると判定し、希釈してから検出することを提案する。一方、Aが7.4%未満であると、非HD-HOOK効果サンプルであると判定し、そのまま校正曲線でサンプル濃度を算出することができる。

【手続補正31】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0237

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0237】

サンプルを段階希釈した後に濃度の変化を検出することで上記結論の信頼性を検証する。サンプル1~サンプル18に対していずれも2倍希釈と4倍希釈を行うとともに、従来の検出方法で未希釈の原倍サンプル、2倍希釈サンプルと4倍希釈サンプルを検出して、希釈後の濃度の変化を観測することによってそのサンプルにはHD-HOOK効果が存在するか否かを判定し、すなわち、希釈後にサンプル濃度が逆に上昇する場合はHD-HOOK効果サンプルであると判定する。非HD-HOOK効果サンプルは希釈後に濃度が低下することになる。その結果を表7に示す。

【手続補正32】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0238

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0238】

【表 7】

表 7 希釈検証結果

希釈 検証	検出濃度			濃度 U/mL
	原倍 サンプル	2 倍希釈 サンプル	4 倍希釈 サンプル	
サンプル 1	8.02	4.36	2.26	8.02
サンプル 2	13.42	7.21	3.32	13.42
サンプル 3	47.14	25.17	11.8	47.14
サンプル 4	66.49	30.09	16.19	66.49
サンプル 5	80.84	44.42	20.86	80.84
サンプル 6	167.73	81.77	41.22	167.73
サンプル 7	192.31	101.89	49.65	192.31
サンプル 8	300.92	154.39	78.77	300.92
サンプル 9	352.65	170.05	87.05	352.65
サンプル 10	528.74	260.36	127.31	528.74
サンプル 11	612.44	299.05	141.28	612.44
サンプル 12	901.35	447.07	213.5	901.35
サンプル 13	>1000.00	559.3	258.1	>1000.00
サンプル 14	>1000.00	>1000.00	551.3	>1000.00
サンプル 15	>1000.00	>1000.00	771.9	>1000.00
サンプル 16	830.97	992.82	>1000.00	HD-HOOK
サンプル 17	734.25	934.91	>1000.00	HD-HOOK
サンプル 18	550.42	778.12	>1000.00	HD-HOOK

【手続補正 3 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 4 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 2 4 1 】

[校正品 1 ~ 校正品 6] 従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度は HD - HOOK サンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【 手続補正 3 4 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 2 4 8

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 2 4 8 】

本発明の方法では、2回の読み取りによって HD - HOOK 効果に起因する報告濃度が低いサンプルを同定するようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果である RLU_1 、 RLU_2 を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU_2 / RLU_1 - 1) \times 100\%$ をサンプルの濃度を判定するための指標の一つとする。表 8 および図 15 からわかるように、信号値が 10000 mIU/ml までは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅 A は濃度とともに上昇し続けることになる。したがって、測定対象サンプルの A の値と校正品の A の値とを直接に比較すれば、測定対象サンプルの濃度と校正品の濃度との大小関係を判定することができる。サンプル 8 ~ 14 の増幅 A がいずれも校正品 6 の増幅 (35.9%) を超えているので、サンプル 8 ~ 14 の $HBsAb$ 濃度はいずれも 1000 mIU/ml を超え、検出上限を超えていることが示されている。それは実際の濃度に合致しており、サンプル 12、13、14 の信号値が校正品 6 よりも低くなり、従来の方法では濃度が 802.57 mIU/ml 、 352.22 mIU/ml 、 147.9 mIU/ml として検出されるが、本発明の方法では、それらは濃度が検出範囲を超えたサンプルとして同定することができ、希釈して検出する必要がある。

【 手続補正 3 5 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 2 5 4

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 2 5 4 】

表 9 に示すように、抗原の希釈倍数を $10,000$ 倍に減少させた後、信号値は濃度の上昇と共に低下し、HD - HOOK 効果が生じ、濃度が一定の値 (例えばサンプル 12) まで上昇し続けると、 RLU は参考値 $cut\ off$ 以下に低下し、従来の検出方法では、その結果が陰性であると誤って判定されてしまう。本発明の方法では、まず、2回の信号の増幅 $A = (RLU_2 / RLU_1 - 1) \times 100\%$ を観察し、測定対象サンプルの A の値と陽性対照の A の値 (-25%) とを比較し、測定対象サンプルと陽性対照との大小関係を判定し、上記の表に示すように、サンプル 12 の A の値 (47%) は陽性対照の A の値 (-25%) よりもはるかに高くなり、このサンプルの濃度が陽性対照を超えていることが示され、陽性サンプルであり、その信号の不十分は HD - HOOK 効果に起因するもので、希釈して検証する必要がある。

【 手続補正 3 6 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 2 8 8

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 2 8 8 】

[校正品 1 ~ 校正品 6] 従来キットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度は HD - HOOK サンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【 手続補正 37 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0289

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0289 】

[ピーク校正品の選定] 既知の HD - HOOK サンプルを段階希釈し、従来の方法でその信号値を検出し、信号値が最も高いサンプルをピーク校正品として選定する。すなわち、ピーク校正品の濃度未満のサンプルでは HD - HOOK 効果が発生することなく、ピーク校正品の濃度を超えると、HD - HOOK 効果が発生することになる。その A の値を R0 と表記し、測定対象物が HD - HOOK 効果サンプルであるか否かを判定するための臨界値とする。

【 手続補正 38 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0292

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0292 】

【表 1 4】

表 14 本発明方法の検出結果

	サンプル	RLU (1)	RLU (2)	増幅 A	濃度 IU/ml
校正品	校正品 1	422	480	14%	0.00
	校正品 2	837	963	15%	0.10
	校正品 3	1810	2178	20%	0.90
	校正品 4	36396	45223	24%	27.56
	校正品 5	200089	250799	25%	156.46
	校正品 6	396371	502928	27%	336.56
	ピーク校正品	1067534	1393208	31%	
測定対象サンプル	サンプル 1	144451	202472	40%	HD-HOOK
	サンプル 2	145010	206857	43%	HD-HOOK
	サンプル 3	232678	318684	37%	HD-HOOK
	サンプル 4	415121	534674	29%	368.29
	サンプル 5	349098	468840	34%	HD-HOOK
	サンプル 6	83799	123879	48%	HD-HOOK
	サンプル 7	171530	211953	24%	137.07
	サンプル 8	199010	251351	26%	159.34
	サンプル 9	375057	498512	33%	HD-HOOK
	サンプル 10	325790	409503	26%	250.82
	サンプル 11	225486	282838	25%	188.59
	サンプル 12	97703	141949	45%	HD-HOOK
	サンプル 13	103552	150462	45%	HD-HOOK
	サンプル 14	193000	263358	36%	HD-HOOK
	サンプル 15	280822	370651	32%	HD-HOOK

【手続補正 3 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 9 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 9 3】

本発明の方法によって得られた 15 個の血清サンプルの濃度は表 1 4 に示す通りである。まず、ピーク校正品の増幅 R 0 と比較するによって HD - HOOK 効果サンプルを識別し、すなわち、A の値が 31% を超えると、HD - HOOK 効果サンプルであると判定し、希釈してから検出することを提案する。一方、A が 31% 未満であると、非 HD - HOOK 効果サンプルであると判定し、そのまま校正曲線でサンプル濃度を算出することができる。

【手続補正 4 0】

【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0294
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【0294】

サンプルを段階希釈した後に濃度の変化を検出することで上記結論の信頼性を検証する。サンプル1～サンプル15に対していずれも2倍希釈と4倍希釈を行うとともに、従来の検出方法で未希釈の原倍サンプル、2倍希釈サンプルと4倍希釈サンプルを検出して、希釈後の濃度の変化を観測することによってそのサンプルにはHD-HOOK効果が存在するか否かを判定し、すなわち、希釈後にサンプル濃度が逆に上昇する場合はHD-HOOK効果サンプルであると判定する。非HD-HOOK効果サンプルは希釈後に濃度が低下することになる。その結果を表15に示す。

【手続補正41】
 【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0295
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【0295】
 【表15】

表15 希釈検証結果

希釈 検証	検出濃度			濃度 IU/mL
	原倍 サンプル	2倍希釈 サンプル	4倍希釈 サンプル	
サンプル1	128.79	262.17	474.22	HD-HOOK
サンプル2	135.81	249.87	417.08	HD-HOOK
サンプル3	228.96	388.23	642.69	HD-HOOK
サンプル4	369.11	222.22	124.14	369.11
サンプル5	353.47	618.94	886.34	HD-HOOK
サンプル6	74.52	132.14	226.20	HD-HOOK
サンプル7	134.44	60.89	31.22	134.44
サンプル8	154.76	72.45	36.50	154.76
サンプル9	331.50	546.11	881.46	HD-HOOK
サンプル10	260.78	104.97	49.26	260.78
サンプル11	174.00	97.86	51.41	174.00
サンプル12	82.80	176.16	328.03	HD-HOOK
サンプル13	94.92	192.47	367.37	HD-HOOK
サンプル14	158.96	277.50	434.39	HD-HOOK
サンプル15	269.64	480.82	814.12	HD-HOOK

【手続補正42】
 【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0299
 【補正方法】変更

【補正の内容】

【0299】

〔ピーク校正品の選定〕既知のHD - HOOKサンプルを段階希釈し、従来の方法でその信号値を検出し、信号値が最も高いサンプルをピーク校正品として選定する。すなわち、ピーク校正品の濃度未満のサンプルではHD - HOOK効果が発生することなく、ピーク校正品の濃度を超えると、HD - HOOK効果が発生することになる。そのAの値をR0と表記し、測定対象物がHD - HOOK効果サンプルであるか否かを判定するための臨界値とする。

【手続補正43】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0301

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0301】

【表 16】

表 16 本発明方法の検出結果

	サンプル	RLU (1)	RLU (2)	増幅 A	濃度 U/ml
校正品	校正品 1	999	744	-25.5%	0
	校正品 2	10857	8248	-24.0%	9.17
	校正品 3	21563	17508	-18.8%	19.11
	校正品 4	102708	88869	-13.5%	87.53
	校正品 5	271593	259355	-4.5%	251.58
	校正品 6	794718	853603	7.4%	1043.74
	ピーク校正品	2537830	3012939	18.7%	
測定対象サンプル	サンプル 1	9665	7217	-25.3%	8.06
	サンプル 2	16130	12287	-23.8%	14.09
	サンプル 3	51059	42166	-17.4%	44.79
	サンプル 4	71055	59021	-16.9%	61.36
	サンプル 5	92952	80019	-13.9%	79.39
	サンプル 6	196716	178735	-9.1%	173.32
	サンプル 7	225436	213141	-5.5%	202.34
	サンプル 8	290252	281001	-3.2%	272.3
	サンプル 9	340529	345889	1.6%	330.44
	サンプル 10	465955	478028	2.6%	492.14
	サンプル 11	513321	530012	3.3%	560.23
	サンプル 12	711508	760017	6.8%	889.7
	サンプル 13	908842	973276	7.1%	>1000.00
	サンプル 14	1845773	2103378	14.0%	>1000.00
	サンプル 15	2390350	2772269	16.0%	>1000.00
	サンプル 16	688606	859340	24.8%	HD-HOOK
	サンプル 17	560058	709209	26.6%	HD-HOOK
	サンプル 18	453979	584179	28.7%	HD-HOOK

【手続補正 4 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0302

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0302】

本発明の方法によって得られた18個の血清サンプルの濃度は表16に示す通りである。まず、ピーク校正品の増幅R0と比較するによってHD-HOOK効果サンプルを識別し、すなわち、Aの値が18.7%を超えると、HD-HOOK効果サンプルであると判定し、希釈してから検出することを提案する。一方、Aが18.7%未満であると、非HD-HOOK効果サンプルであると判定し、そのまま校正曲線でサンプル濃度を算出することができる。

【手続補正45】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0303

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0303】

サンプルを段階希釈した後に濃度の変化を検出することで上記結論の信頼性を検証する。サンプル1~サンプル18に対していずれも2倍希釈と4倍希釈を行うとともに、従来の検出方法で未希釈の原倍サンプル、2倍希釈サンプルと4倍希釈サンプルを検出して、希釈後の濃度の変化を観測することによってそのサンプルにはHD-HOOK効果が存在するか否かを判定し、すなわち、希釈後にサンプル濃度が逆に上昇する場合はHD-HOOK効果サンプルであると判定する。非HD-HOOK効果サンプルは希釈後に濃度が低下することになる。その結果を表17に示す。

【手続補正46】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0304

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0304】

【表 17】

表 17 希釈検証結果

希釈 検証	検出濃度			濃度 U/mL
	原倍 サンプル	2倍希釈 サンプル	4倍希釈 サンプル	
サンプル 1	8.02	4.36	2.26	8.02
サンプル 2	13.42	7.21	3.32	13.42
サンプル 3	47.14	25.17	11.8	47.14
サンプル 4	66.49	30.09	16.19	66.49
サンプル 5	80.84	44.42	20.86	80.84
サンプル 6	167.73	81.77	41.22	167.73
サンプル 7	192.31	101.89	49.65	192.31
サンプル 8	300.92	154.39	78.77	300.92
サンプル 9	352.65	170.05	87.05	352.65
サンプル 10	528.74	260.36	127.31	528.74
サンプル 11	612.44	299.05	141.28	612.44
サンプル 12	901.35	447.07	213.5	901.35
サンプル 13	>1000.00	559.3	258.1	>1000.00
サンプル 14	>1000.00	>1000.00	551.3	>1000.00
サンプル 15	>1000.00	>1000.00	771.9	>1000.00
サンプル 16	830.97	992.82	>1000.00	<u>HD-HOOK</u>
サンプル 17	734.25	934.91	>1000.00	<u>HD-HOOK</u>
サンプル 18	550.42	778.12	>1000.00	<u>HD-HOOK</u>

【手続補正 47】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0307

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0307】

[校正品 1 ~ 校正品 6] 従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度は HD-HOOK サンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【手続補正 48】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0308

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0308】

〔ピーク校正品の選定〕既知のHD - HOOKサンプルを段階希釈し、従来の方法でその信号値を検出し、信号値が最も高いサンプル、本実験ではすなわちサンプル9をピーク校正品として選定する。ピーク校正品の濃度未満のサンプルではHD - HOOK効果が発生することなく、ピーク校正品の濃度を超えると、HD - HOOK効果が発生することになる。そのAの値をR0と表記し、測定対象物がHD - HOOK効果サンプルであるか否かを判定するための臨界値とする。

【手続補正49】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0312

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0312】

【表 18】

表 18 従来の検出及び本発明の検出の結果

	サンプル	実際濃度	従来の検出結果		本発明の検出結果			
		濃度 ng/ml	RLU	濃度 ng/ml	RLU (1)	RLU (2)	増幅 A	濃度 ng/ml
校正品	校正品 1	0	1504	0	1301	982	-24.5%	0
	校正品 2	19.91	9470	19.91	8419	5699	-32.3%	19.91
	校正品 3	101.02	46702	101.02	39701	31854	-19.8%	101.02
	校正品 4	502.74	201992	502.74	177904	152780	-14.1%	502.74
	校正品 5	994.36	382044	994.36	336189	299061	-11.0%	994.36
	校正品 6	2232.94	745316	2232.94	701657	662840	-5.5%	2232.94
	ピーク校正品 (サンプル 9)	51000	2378260	51000	2113558	2407210	13.9%	51000
測定対象サンプル	サンプル 1	20	10008	21.21	9010	6256	-30.6%	21.53
	サンプル 2	200	83614	184.44	75542	63340	-16.2%	196.81
	サンプル 3	2000	688675	>2000	635950	595131	-6.4%	>2000
	サンプル 4	5100	1131402	>2000	1083169	1077907	-0.5%	>2000
	サンプル 5	10200	1684984	>2000	1448123	1526161	5.4%	>2000
	サンプル 6	15300	1966033	>2000	1776540	1926924	8.5%	>2000
	サンプル 7	20400	2132659	>2000	1907869	2132148	11.8%	>2000
	サンプル 8	25500	2288952	>2000	1999686	2251677	12.6%	>2000
	サンプル 9	51000	2378260	>2000	2113558	2407210	13.9%	>2000
	サンプル 10	102000	2304238	>2000	2094861	2392541	14.2%	HD-HOOK
	サンプル 11	153000	2163232	>2000	1903523	2210245	16.1%	HD-HOOK
	サンプル 12	204000	1958628	>2000	1740069	2031467	16.7%	HD-HOOK
	サンプル 13	255000	1777808	>2000	1615030	1899252	17.6%	HD-HOOK
	サンプル 14	510000	1401282	>2000	1162934	1398233	20.2%	HD-HOOK
	サンプル 15	2550000	646266	1860.97	538637	668007	24.0%	HD-HOOK

【備考】フェリチンの従来検出の検出範囲は 0~2000ng/ml であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は >2000ng/ml として表示される。

【手続補正 50】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0315

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0315】

本発明の方法では、2回の読み取りによって HD - HOOK 効果サンプルを同定するようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果である RLU1、RLU2 を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を

サンプルの濃度を判定するための指標の一つとする。表18および図25からわかるように、信号値が51000 ng/mlまでは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅Aは濃度とともに上昇し続けることになる。したがって、測定対象サンプルのAの値と校正品のAの値とを直接に比較すれば、測定対象サンプルの濃度と校正品の濃度との大小関係を判定することができる。サンプル10～15の増幅Aがいずれもピーク校正品の増幅R0(13.9%)を超えているので、サンプル10～15のFerr濃度はいずれも51000 ng/mlを超え、HD-HOOKサンプルであることが示されている。それは実際の濃度に合致しており、サンプル15の信号値が校正品6よりも低くなり、従来の方法では濃度が1860.97 ng/mlとして検出されるが、本発明の方法では、それはHD-HOOKサンプルであると同定することができ、希釈して検出する必要がある。

【手続補正51】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0317

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0317】

[校正品1～校正品6]従来キットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度はHD-HOOKサンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線を作成するのに用いられる。

【手続補正52】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0318

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0318】

[ピーク校正品の選定]既知のHD-HOOKサンプルを段階希釈し、従来方法でその信号値を検出し、信号値が最も高いサンプル、本実験ではすなわちサンプル9をピーク校正品として選定する。ピーク校正品の濃度未満のサンプルではHD-HOOK効果が発生することなく、ピーク校正品の濃度を超えると、HD-HOOK効果が発生することになる。そのAの値をR0と表記し、測定対象物がHD-HOOK効果サンプルであるか否かを判定するための臨界値とする。

【手続補正53】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0322

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0322】

【表 19】

表 19 従来の検出及び本発明の検出の結果

サンプル	実際濃度	従来の検出結果		本発明の検出結果				
	濃度 ng/ml	RLU	濃度 ng/ml	RLU (1)	RLU (2)	増幅 A	濃度 ng/ml	
校正品	校正品 1	0	304	0	302	331	9.6%	0
	校正品 2	0.59	2035	0.59	1778	1308	-26.4%	0.59
	校正品 3	0.85	2539	0.85	2625	2016	-23.2%	0.85
	校正品 4	6.02	11619	6.02	9717	8017	-17.5%	6.02
	校正品 5	12.05	23261	12.05	21432	18465	-13.8%	12.05
	校正品 6	33.31	55424	33.31	47809	45456	-4.9%	33.31
	ピーク校正品 (サンプル 9)	10000	3170807	>30	2669419	3292270	23.3%	>30
測定対象サンプル	サンプル 1	1	2912	1.06	2900	2251	-22.4%	0.93
	サンプル 2	3	6499	3.12	5729	4545	-20.7%	2.37
	サンプル 3	10	20345	10.54	16747	13986	-16.5%	10.13
	サンプル 4	33	56700	>30	44852	42492	-5.3%	>30
	サンプル 5	100	162356	>30	132253	139349	5.4%	>30
	サンプル 6	335	435784	>30	359060	409421	14.0%	>30
	サンプル 7	1000	1458246	>30	1147167	1367003	19.2%	>30
	サンプル 8	3350	2610397	>30	2305534	2785700	20.8%	>30
	サンプル 9	10000	3170807	>30	2669419	3292270	23.3%	>30
	サンプル 10	33500	2998354	>30	2376362	2986650	25.7%	HD-HOOK
	サンプル 11	100000	2165769	>30	1717649	2233121	30.0%	HD-HOOK
	サンプル 12	335000	946947	>30	742994	981144	32.1%	HD-HOOK
	サンプル 13	1000000	363059	>30	297572	398779	34.0%	HD-HOOK
	サンプル 14	3350000	162871	>30	135756	184090	35.6%	HD-HOOK
	サンプル 15	10000000	58143	>30	46580	64473	38.4%	HD-HOOK
	サンプル 16	33500000	15674	8.15	12274	17359	41.4%	HD-HOOK
	サンプル 17	100000000	2379	0.76	1902	2693	41.6%	HD-HOOK

【備考】C ペプチドの従来検出の検出範囲は 0~30ng/ml であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は >30ng/ml として表示される。

【手続補正 5 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 2 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 2 6】

[校正品 1 ~ 校正品 6] 従来のキットにおける濃度既知のサンプルであって、濃度は HD-HOOK サンプルよりはるかに小さく、測定対象物の濃度を算出するための校正曲線

を作成するのに用いられる。

【手続補正 5 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 2 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 2 7】

〔ピーク校正品の選定〕既知のHD - HOOKサンプルを段階希釈し、従来の方法でその信号値を検出し、信号値が最も高いサンプル、本実験ではすなわちサンプル 9 をピーク校正品として選定する。ピーク校正品の濃度未満のサンプルではHD - HOOK効果が発生することなく、ピーク校正品の濃度を超えると、HD - HOOK効果が発生することになる。その A の値を R 0 と表記し、測定対象物がHD - HOOK効果サンプルであるか否かを判定するための臨界値とする。

【手続補正 5 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 3 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 3 1】

【表 20】

表 20 従来の検出及び本発明の検出の結果

	サンプル	実際濃度	従来の検出結果		本発明の検出結果			
		濃度 mIU/ml	RLU	濃度 mIU/ml	RLU1	RLU2	増幅 A	濃度 mIU/ml
校正品	校正品 1	0	524	0	498	523	5.0%	0
	校正品 2	10.23	3548	10.23	3188	4049	27.0%	10.23
	校正品 3	71.95	21493	71.95	17403	22854	31.3%	71.95
	校正品 4	213.65	64993	213.65	50526	67526	33.6%	213.65
	校正品 5	584.26	181544	584.26	133863	180954	35.2%	584.26
	校正品 6	1026.18	342125	1026.18	255651	347371	35.9%	1026.18
	ピーク校正品 (サンプル 9)	10,000	1050237	>1000	775542	1066620	37.5%	>1000
測定対象サンプル	サンプル 1	1	703	0.6	652	737	13.0%	0.58
	サンプル 2	3	1257	2.48	1182	1424	20.5%	2.58
	サンプル 3	10	3443	9.87	2876	3592	24.9%	9.02
	サンプル 4	33	9387	30.24	7743	10124	30.8%	28.78
	サンプル 5	100	31033	103.93	25555	33721	32.0%	107.83
	サンプル 6	335	101781	332.87	79257	106917	34.9%	341.56
	サンプル 7	1,000	341483	>1000	259926	352344	35.6%	>1000
	サンプル 8	3,350	757906	>1000	570542	781231	36.9%	>1000
	サンプル 9	10,000	1050237	>1000	775542	1066620	37.5%	>1000
	サンプル 10	33,500	985422	>1000	753452	1039798	38.0%	HD-HOOK
	サンプル 11	100,000	576535	>1000	415949	577782	38.9%	HD-HOOK
	サンプル 12	335,000	258461	802.57	184878	259170	40.2%	HD-HOOK
	サンプル 13	1,000,000	107739	352.22	75811	109111	43.9%	HD-HOOK
	サンプル 14	3,350,000	44514	147.9	33501	48374	44.4%	HD-HOOK

【備考】HBsAb の従来検出の検出範囲は 0~1000mIU/ml であり、検出上限を超えたサンプルの濃度は >1000mIU/ml として表示される。

【手続補正 57】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0334

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0334】

本発明の方法では、2回の読み取りによって HD - HOOK 効果サンプルを同定するようにされている。各測定対象サンプルについて、信号値の結果である RLU1、RLU2 を順番に検出し、2回目の読み取りの増幅 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ を

サンプルの濃度を判定するための指標の一つとする。表 20 および図 29 からわかるように、信号値が 10000 mIU/ml までは濃度とともに上昇し続け、その後、信号値が濃度の上昇とともに低下するが、増幅 A は濃度とともに上昇し続けることになる。したがって、測定対象サンプルの A の値と校正品の A の値とを直接に比較すれば、測定対象サンプルの濃度と校正品の濃度との大小関係を判定することができる。サンプル 10 ~ 14 の増幅 A がいずれもピーク校正品の増幅 R0 (37.5%) を超えているので、サンプル 10 ~ 14 の HBsAb 濃度はいずれも 10000 mIU/ml を超え、HD-HOOK 効果サンプルであることが示されている。それは実際の濃度に合致しており、サンプル 12、13、14 の信号値が校正品 6 よりも低くなり、従来の方法では濃度が 802.57 mIU/ml、352.22 mIU/ml、147.9 mIU/ml として検出されるが、本発明の方法では、それらは HD-HOOK 効果サンプルであると同定することができ、希釈して検出する必要がある。

【手続補正 58】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0335

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0335】

上記の実施例は、本発明の原理およびその効果の単なる例示であり、本発明を限定することを意図するものではない。当業者であれば、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、上記の実施例の修正または変更をなし得る。したがって、本発明の精神および思想から逸脱することなく当業者によって行われたすべての均等の修正または変更は、依然として添付の特許請求の範囲によって網羅されるべきである。

以下に、本願出願の当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

[1] 校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録し、ピーク校正品の 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分の増幅 A を R0 とし、測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の増幅 A' が R0 を超えているかを比較し、R0 を超えている場合、サンプルが HD-HOOK 効果を有し、R0 未満の場合、HD-HOOK 効果を有しないとする、というステップを含むことを特徴とする HD-HOOK 効果サンプルを同定する方法。

[2] 前記方法は、

(1) 校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1 回目の読み取り：ステップ (1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1 とするステップと、

(3) 2 回目の読み取り：ステップ (2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2 とするステップと、

(4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) ピーク校正品の 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分の増幅 A を R0 とするステップと、

(6) 測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A' の値を R0 と比較し、A' が R0 以上である場合、このサンプルが HD-HOOK 効果サンプルであると同定するステップ

と、を含むことを特徴とする [1] に記載の方法。

[3] 測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A ' の値を R 0 と比較し、A ' が R 0 以上である場合、測定対象サンプルが HD - H O O K 効果サンプルであり、希釈する必要があり、A ' が R 0 未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされ、

前記校正曲線は、校正品の 1 回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする [1] 又は [2] に記載の方法。

[4] 発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザ光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする [2] に記載の方法。

[5] ステップ (2) と (3) において、6 0 0 ~ 7 0 0 n m の赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は 5 2 0 ~ 6 2 0 n m とされていることを特徴とする [2] に記載の方法。

[6] 前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第 1 の抗体及び第 2 の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第 1 の抗原および第 2 の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする [2] に記載の方法。

[7] 化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、

化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録するための化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、

測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A ' によって HD - H O O K 効果サンプルの有無を特定するためのプロセッサと、を備える

免疫測定における HD - H O O K 効果を同定するためのシステム。

[8] 前記システムは、

化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、

化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録するための化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、

測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A ' が、ピーク校正品の 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分の増幅 R 0 を超えているかを比較し、R 0 を超えている場合、サンプルが HD - H O O K 効果を有し、R 0 未満の場合、HD - H O O K 効果を有しないとすプロセッサと、を備え、

化学発光の 2 回目の読み取りは、同一の免疫反応に対して一定の時間が経過した後に再度励起させ読み取ることによって得られるものである、[7] に記載のシステム。

[9] 前記システムの使用方法は、

(1) 校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体 (または抗原) によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体 (または抗原) と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1 回目の読み取り：ステップ (1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 1 とするステップと、

(3) 2 回目の読み取り：ステップ (2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 2 とするステップと、

(4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 1 0 0 \%$ で算出するステップと、

(5) ピーク校正品の 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分の増幅 A を R 0 とするステップと、

(6) 測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、このサンプルがHD-HOOK効果サンプルであると同定するステップと、を含むことを特徴とする[7]に記載のシステム。

[10] 測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、測定対象サンプルがHD-HOOK効果サンプルであり、希釈する必要がある、A'がR0未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされ

、前記校正曲線は、校正品の1回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする[9]に記載のシステム。

[11] 発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザー光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする[9]に記載のシステム。

[12] ステップ(2)と(3)において、600~700nmの赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は520~620nmとされていることを特徴とする[9]に記載のシステム。

[13] 前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第1の抗体及び第2の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第1の抗原および第2の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする[9]に記載のシステム。

[14] 校正品、ピーク校正品、第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を含むキットであって、前記キットの使用方法は、校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅A'によってHD-HOOK効果サンプルの有無を特定することを特徴とするキット。

[15] 前記キットの使用方法は、校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ1回目と2回目の読み取りを記録し、測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の増幅A'がピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅R0を超えているかを比較し、R0を超えている場合、サンプルがHD-HOOK効果を有し、R0未満の場合、HD-HOOK効果を有しないとす、というステップを含む[14]に記載のキット。

[16] 前記キットの使用方法は、

(1) 校正品、ピーク校正品、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) ピーク校正品の2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分の増幅AをR

0とするステップと、

(6)測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、このサンプルがHD-HOOK効果サンプルであると同定するステップと、を含むことを特徴とする[14]に記載のキット。

[17]測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅A'の値をR0と比較し、A'がR0以上である場合、測定対象サンプルがHD-HOOK効果サンプルであり、希釈する必要がある、A'がR0未満の場合、そのまま校正曲線でサンプルの濃度を算出するとされ

る、前記校正曲線は、校正品の1回目の読み取りと校正品の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする[14]に記載のキット。

[18]発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザ光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする[16]に記載のキット。

[19]ステップ(2)と(3)において、600~700nmの赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は520~620nmとされていることを特徴とする[16]に記載のキット。

[20]前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第1の抗体及び第2の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第1の抗原および第2の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする[16]に記載のキット。

[21]化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して複数回の読み取りを実行するための読み取りユニットと、

前記読み取りユニットに接続され、前記読み取りユニットの読み取りによって免疫測定にはHD-HOOKのリスクの有無を判定する処理ユニットと、を備える

HD-HOOK効果サンプルを同定するための測定装置。

[22]インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに移動し読み取りを実行するための移動機構をさらに備えることを特徴とする[21]に記載の免疫測定装置。

[23]化学発光免疫反応のために適切な環境温度を提供するためのインキュベータをさらに備えることを特徴とする[21]又は[22]に記載の免疫測定装置。

[24]読み取りが完了した後の混合液を前記インキュベータに復帰させ再度インキュベートするための復帰機構をさらに備えることを特徴とする[23]に記載の免疫測定装置。

[25]前記移動機構は押し出し機構であり、前記復帰機構は押し戻し機構であり、前記混合液はスラットで収容されることを特徴とする[24]に記載の免疫測定装置。

[26]前記読み取りユニットは化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して2回の読み取りを実行することに用いられることを特徴とする[21]~[25]のいずれか1つに記載の免疫測定装置。

[27]前記インキュベータは第1のインキュベータと第2のインキュベータとを有し、前記押し出し機構は、第1のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を第2のインキュベータに押し出しインキュベートするのに用いられ、かつ前記押し出し機構は第2のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し1回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記押し戻し機構は、1回目の読み取りが完了した後の混合液を第2のインキュベータに押し戻し再度インキュベートするのに用いられ

前記押し出し機構は、さらに、第2のインキュベータ内で再度インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し2回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記処理ユニットが2回目の読み取りと1回目の読み取りの増幅Aが標準曲線の最大値を超えていると検出した場合、免疫測定にはHOOKのリスクが存在すると判定すること

を特徴とする [2 5] に記載の免疫測定装置。

[2 8] 前記押戻し機構は、

底板と、

前記底板に設けられているガイドレールと、

前記ガイドレールに設けられ、スラットを支持するための移動カップ機構と、

前記移動カップ機構を前記ガイドレールに沿って移動させるための駆動装置と、

前記底板の両端に設けられ、前記移動カップ機構の位置を検出するための光電センサと

、
前記光電センサに接続され、前記光電センサによって発せられた位置信号に基づいて前記移動カップ機構の位置を調整することができる位置調整機構とを備えることを特徴とする [2 5] に記載の免疫測定装置。

[2 9] 前記ガイドレールは直線レールまたは可変レールであることを特徴とする [2 8] に記載の免疫測定装置。

[3 0] 前記インキュベータの一方の側に設けられ、測定対象サンプルと試薬とを混合させるためのスラット用試料添加皿と、前記インキュベータの他方の側に設けられ、試薬を収納するための試薬冷蔵領域とをさらに備えることを特徴とする [2 3] ~ [2 5] のいずれか 1 つ又は [2 7] ~ [2 9] のいずれか 1 つに記載の免疫測定装置。

[3 1] 前記スラット用試料添加皿の一方の側に設けられた、ブランクスラットスタッキング及びローディング機構をさらに備え、前記ブランクスラットスタッキング及びローディング機構は、ブランクスラットをスラット用試料添加皿に押し付けるのに用いられることを特徴とする [3 0] に記載の免疫測定装置。

[3 2] サンプル試験管を支持するためのサンプル試験管載置棚をさらに備えることを特徴とする [3 1] に記載の免疫測定装置。

[3 3] 前記サンプル試験管載置棚におけるブランクスラットスタッキング及びローディング機構に隣接する側に設けられ、予備希釈プレートに対して希釈処理するための希釈プレートシェーカーをさらに備えることを特徴とする [3 2] に記載の免疫測定装置。

[3 4] 試料添加針が設けられている機械式アームをさらに備え、

前記機械式アームは、前記サンプル試験管載置棚領域からサンプルを吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第 1 の機械式アームと、前記試薬冷蔵領域から試薬を吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第 2 の機械式アームとを有することを特徴とする [3 2] に記載の免疫測定装置。

[3 5] 第 1 の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第 1 の洗浄機構と、第 2 の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第 2 の洗浄機構とをさらに備えることを特徴とする [3 4] に記載の免疫測定装置。

[3 6] (1) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録し、2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅を A とするステップと、(2) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む既知の一連の標準物質の 2 回の読み取りの差分増幅 A' に基づいて標準曲線を作成し、または、測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む既知の一つの標準物質の 2 回の読み取りの差分増幅 A'' に基づいて標準を作成するステップと、(3) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線および / または標準と比較するステップと、を含む免疫測定方法。

[3 7] 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線と比較することを特徴とする [3 6] に記載の免疫測定方法。

[3 8] 前記既知の一連の標準物質の濃度は、HOOK 効果が生じる濃度よりも低く、および / または前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする [3 7] に記載の免疫測定方法。

[3 9] 前記方法は、(4) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サン

ルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含むことを特徴とする[38]に記載の免疫測定方法。

[40]前記方法は、

(a1)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(a2)1回目の読み取り:ステップ(a1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(a3)2回目の読み取り:ステップ(a2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(a4)サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(a5)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質(ただし、標準物質の濃度は、HOOK効果が生じる濃度よりも低い)の2回の読み取りの増幅A'に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(a6)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含むことを特徴とする[39]に記載の免疫測定方法。

[41]測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回目の読み取りと1回目の読み取りとの間の差分増幅Aを前記標準と比較し、かつ前記標準は臨界値であり、および/または、前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする[36]に記載の免疫測定方法。

[42]前記方法は、(4)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップ、をさらに含むことを特徴とする[41]に記載の免疫測定方法。

[43]前記方法は、

(c1)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(c2)1回目の読み取り:ステップ(c1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(c3)2回目の読み取り:ステップ(c2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(c4)サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(c5)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A''を臨界値とするステップと、

(c6)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップと、を含むことを特徴とする[42]に記載の免疫測定方法。

[4 4] 前記方法は、(4) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りが前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含むことを特徴とする[4 1]に記載の免疫測定方法。

[4 5] 前記方法は、

(d 1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(d 2) 1回目の読み取り：ステップ(d 1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(d 3) 2回目の読み取り：ステップ(d 2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(d 4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(d 5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(d 6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含むことを特徴とする[4 4]に記載の免疫測定方法。

[4 6] 前記方法は、(4) サンプルの濃度を特定するステップをさらに含むことを特徴とする[3 7]に記載の免疫測定方法。

[4 7] 前記方法は、

(b 1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(b 2) 1回目の読み取り：ステップ(b 1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(b 3) 2回目の読み取り：ステップ(b 2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(b 4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(b 5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅A'に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(b 6) Aの値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルのRLU1をそれに対応する標準曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含み

前記校正曲線は、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の1回目の読み取りと既知の一連の標準物質の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする[4 6]に記載の免疫測定方法。

[4 8] 前記発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されて

いる高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザー光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする [3 6] ~ [4 7] のいずれか 1 つに記載の免疫測定方法。

[4 9] 6 0 0 ~ 7 0 0 n m の赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は 5 2 0 ~ 6 2 0 n m とされていることを特徴とする [4 0]、[4 3]、[4 5] 及び [4 7] のいずれか 1 つに記載の免疫測定方法。

[5 0] 前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第 1 の抗体及び第 2 の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第 1 の抗原および第 2 の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする [4 0]、[4 3]、[4 5] 及び [4 7] のいずれか 1 つに記載の免疫測定方法。

[5 1] 免疫測定を同定するためのシステムであって、
 化学発光免疫反応を実施するための免疫反応装置と、
 化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録するとともに、2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅を A とするための化学発光免疫反応励起及びカウント装置と、
 プロセッサと、を備えるシステム。

[5 2] 前記プロセッサは、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質の 2 回の読み取りの増幅 A に基づいて標準曲線を作成するのに用いられ、ここで標準物質の濃度は H O O K 効果が生じる濃度よりも低く、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定することを特徴とする [5 1] に記載のシステム。

[5 3] 前記システムの使用方法は、
 (1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1 回目の読み取り：ステップ (1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 1 とするステップと、

(3) 2 回目の読み取り：ステップ (2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 2 とするステップと、

(4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 1 0 0 \%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む既知の一連の標準物質（ただし、標準物質の濃度は H O O K 効果が生じる濃度よりも低くなっている）の 2 回の読み取りの増幅 A に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(6) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップとを含むことを特徴とする [5 2] に記載のシステム。

[5 4] 前記プロセッサは、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A を臨界値と比較するのに用いられ、測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が前記既知の標準物質の濃度よりも高くなっていることを特徴とする [5 1] に記載のシステム。

[5 5] 前記システムの使用方法は、
 (1) 測定すべき目標抗原（または抗体）を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体（または抗原）によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体（または抗原）と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅Aを臨界値とするステップと、

(6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が前記既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとすることを特徴とする[54]に記載のシステム。

[56] 前記プロセッサは、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較するのに用いられ、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定し、

および/または前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする[51]に記載のシステム。

[57] 前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1回目の読み取り：ステップ(1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(3) 2回目の読み取り：ステップ(2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(4) サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅Aを臨界値とするステップと、

(6) 測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップとを含むことを特徴とする[56]に記載のシステム。

[58] 前記プロセッサは、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の1回目の読み取りと2回の読み取りの増幅Aに基づいてそれぞれ校正曲線と標準曲線を作成し、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの1回目の読み取りと2回の読み取りの増幅Aをそれぞれ校正曲線及び標準曲線と比較して、サンプルの濃度を特定するのに用いられることを特徴とする[51]に記載のシステム。

[59] 前記システムの使用方法は、

(1) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体 (または抗原) によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体 (または抗原) と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(2) 1 回目の読み取り : ステップ (1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 1 とするステップと、

(3) 2 回目の読み取り : ステップ (2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 2 とするステップと、

(4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 1 0 0 \%$ で算出するステップと、

(5) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む既知の一連の標準物質の 2 回の読み取りの増幅 A に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(6) A の値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルの R L U 1 をそれに対応する校正曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含むことを特徴とする [5 8] に記載のシステム。

[6 0] 前記発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微粒子であり、赤色レーザ光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする [5 1] ~ [5 9] のいずれか 1 つに記載のシステム。

[6 1] 6 0 0 ~ 7 0 0 n m の赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は 5 2 0 ~ 6 2 0 n m とされていることを特徴とする [5 3]、[5 5]、[5 7]、[5 9] のいずれか 1 つに記載のシステム。

[6 2] 前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第 1 の抗体及び第 2 の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第 1 の抗原および第 2 の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする [5 3]、[5 5]、[5 7]、[5 9] のいずれか 1 つに記載のシステム。

[6 3] 第 1 の抗体 (または抗原) によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体 (または抗原)、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を含むキットであって、前記キットの使用方法は、(1) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルに対して化学発光免疫反応を行い、化学発光を励起させ 1 回目と 2 回目の読み取りを記録し、2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅を A とするステップと、(2) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む既知の一連の標準物質の 2 回の読み取りの差分増幅 A ' に基づいて標準曲線を作成し、または、測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む既知の一つの標準物質の 2 回の読み取りの差分増幅 A ' ' に基づいて標準曲線を作成するステップと、(3) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線および / または標準と比較するステップと、を含むことを特徴とするキット。

[6 4] 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準曲線と比較することを特徴とする [6 3] に記載のキット。

[6 5] 前記既知の一連の標準物質の濃度は、H O O K 効果が生じる濃度よりも低く、および / または前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする [6 4] に記載のキット。

[6 6] 前記キットの使用方法は、(4) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップ、をさらに含むことを特徴とする [6 5] に記載

のキット。

[6 7] 前記キットの使用方法は、

(a 1) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体 (または抗原) によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体 (または抗原) と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(a 2) 1 回目の読み取り : ステップ (a 1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 1 とするステップと、

(a 3) 2 回目の読み取り : ステップ (a 2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 2 とするステップと、

(a 4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 1 0 0$ % で算出するステップと、

(a 5) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む既知の一連の標準物質 (ただし、標準物質の濃度は、H O O K 効果が生じる濃度よりも低い) の 2 回の読み取りの増幅 A ' に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(a 6) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記標準曲線の最大値を超えている場合、サンプルを希釈してから測定するステップとを含むことを特徴とする [6 6] に記載のキット。

[6 8] 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りとの間の差分増幅 A を前記標準と比較し、かつ前記標準は臨界値であることを特徴とする [6 3] に記載のキット。

[6 9] 前記キットの使用方法は、(4) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップ、をさらに含み、

および / または、前記既知の標準物質は陽性対照であることを特徴とする [6 8] に記載のキット。

[7 0] 前記キットの使用方法は、

(c 1) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルを第 1 の抗体 (または抗原) によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第 2 の抗体 (または抗原) と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(c 2) 1 回目の読み取り : ステップ (c 1) の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 1 とするステップと、

(c 3) 2 回目の読み取り : ステップ (c 2) において 1 回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、R L U 2 とするステップと、

(c 4) サンプルの 1 回目の読み取りによって得られた信号値に対する 2 回目の読み取りによって得られた信号値の増幅 A について、 $A = (R L U 2 / R L U 1 - 1) \times 1 0 0$ % で算出するステップと、

(c 5) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む既知の一つの標準物質の 2 回の読み取りの増幅 A ' ' を臨界値とするステップと、

(c 6) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A を臨界値と比較して、測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測定対象サンプルの 2 回の読み取りの増幅 A が前記臨界値を超えていると、前記測定対象サンプルの濃度が既知の標準物質の濃度よりも高くなっているとするステップと、を含むことを特徴とする [6 9] に記載のキット。

[7 1] 前記キットの使用方法は、(4) 測定すべき目標抗原 (または抗体) を含む測

定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りが前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップをさらに含むことを特徴とする[68]に記載のキット。

[72]前記キットの使用方法は、

(d1)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(d2)1回目の読み取り:ステップ(d1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(d3)2回目の読み取り:ステップ(d2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(d4)サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(d5)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一つの標準物質の2回の読み取りの増幅A'を臨界値とするステップと、

(d6)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aを臨界値と比較して、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルの2回の読み取りの増幅Aが前記臨界値を超え、かつそれと同時に前記測定対象サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値が前記既知の標準物質よりも低くなっていると、サンプルを希釈してから測定するステップと、を含むことを特徴とする[71]に記載のキット。

[73]前記キットの使用方法は、(4)サンプルの濃度を特定するステップをさらに含むことを特徴とする[64]に記載のキット。

[74]前記キットの使用方法は、

(b1)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む測定対象サンプルを第1の抗体(または抗原)によって被覆された発光微粒子、標識物で標識された第2の抗体(または抗原)と混合し、インキュベートすることによって、混合液が得られるステップと、

(b2)1回目の読み取り:ステップ(b1)の混合液に、さらに、標識物特異結合物で標識された感光微粒子を加え、インキュベートした後に励起光を照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU1とするステップと、

(b3)2回目の読み取り:ステップ(b2)において1回目の読み取りを行った後の反応溶液をさらにインキュベートした後に、励起光を再度照射して出射光量を検出し、光子カウンタで読み取り、RLU2とするステップと、

(b4)サンプルの1回目の読み取りによって得られた信号値に対する2回目の読み取りによって得られた信号値の増幅Aについて、 $A = (RLU2 / RLU1 - 1) \times 100\%$ で算出するステップと、

(b5)測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の2回の読み取りの増幅A'に基づいて標準曲線を作成するステップと、

(b6)Aの値によって測定対象物質の濃度が標準曲線の上昇区間に位置するかそれとも下降区間に位置するかを特定し、測定対象サンプルのRLU1をそれに対応する校正曲線に代入して濃度を算出するステップと、を含み、

前記標準曲線は、測定すべき目標抗原(または抗体)を含む既知の一連の標準物質の1回目の読み取りと既知の一連の標準物質の濃度によって作成された曲線であることを特徴とする[73]に記載のキット。

[75]前記発光微粒子とは発光化合物およびランタノイド族元素化合物が充填されている高分子微粒子のことをいい、前記感光微粒子は感光化合物が充填されている高分子微

粒子であり、赤色レーザー光による励起で一重項酸素イオンを発生させることができることを特徴とする [6 3] ~ [7 4] に記載のキット。

[7 6] 6 0 0 ~ 7 0 0 n m の赤色励起光で照射し、反応溶液の出射光量を検出し、出射光の検出波長は 5 2 0 ~ 6 2 0 n m とされていることを特徴とすることを特徴とする [6 7]、[7 0]、[7 2]、[7 4] に記載のキット。

[7 7] 前記抗原とは免疫原性を有する物質をいい、前記抗体とは有機体によって生じられた、特定の外来物を認識することができる免疫グロブリンをいい、前記第 1 の抗体及び第 2 の抗体とは前記目標抗原に特異的に結合可能な抗体をいい、前記第 1 の抗原および第 2 の抗原とは、前記目標抗体に特異的に結合可能な抗原をいうことを特徴とする [6 7]、[7 0]、[7 2]、[7 4] に記載のキット。

[7 8] 化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して複数回の読み取りを実行するための読み取りユニットと、

前記読み取りユニットに接続され、前記読み取りユニットの読み取りによって免疫測定には H O O K のリスクの有無を判定する処理ユニットと、を備える免疫測定装置。

[7 9] インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに移動し読み取りを実行するための移動機構をさらに備えることを特徴とする [7 8] に記載の免疫測定装置。

[8 0] 化学発光免疫反応のために適切な環境温度を提供するためのインキュベータをさらに備えることを特徴とする [7 8] 又は [7 9] に記載の免疫測定装置。

[8 1] 読み取りが完了した後の混合液を前記インキュベータに復帰させ再度インキュベートするための復帰機構をさらに備えることを特徴とする [8 0] に記載の免疫測定装置。

[8 2] 前記移動機構は押し出し機構であり、前記復帰機構は押し戻し機構であり、前記混合液はスラットで収容されることを特徴とする [8 1] に記載の免疫測定装置。

[8 3] 前記読み取りユニットは化学発光免疫反応を記録するとともにインキュベートされた後の混合液に対して 2 回の読み取りを実行することに用いられることを特徴とする [7 8] ~ [8 2] のいずれか 1 つに記載の免疫測定装置。

[8 4] 前記インキュベータは第 1 のインキュベータと第 2 のインキュベータとを有し、前記押し出し機構は、第 1 のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を第 2 のインキュベータに押し出しインキュベートするのに用いられ、かつ前記押し出し機構は第 2 のインキュベータ内でインキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し 1 回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記押し戻し機構は、1 回目の読み取りが完了した後の混合液を第 2 のインキュベータに押し戻し再度インキュベートするのに用いられ

前記押し出し機構は、さらに、第 2 のインキュベータ内で再度インキュベートされた後の混合液を読み取りユニットに押し出し 2 回目の読み取りを実行するのに用いられ、

前記処理ユニットが 2 回目の読み取りと 1 回目の読み取りの増幅が標準曲線の最大値を超えていると検出した場合、免疫測定には H O O K のリスクが存在すると判定することを特徴とする [8 2] に記載の免疫測定装置。

[8 5] 前記押し戻し機構は、

底板と、

前記底板に設けられているガイドレールと、

前記ガイドレールに設けられ、スラットを支持するための移動カップ機構と、

前記移動カップ機構を前記ガイドレールに沿って移動させるための駆動装置と、

前記底板の両端に設けられ、前記移動カップ機構の位置を検出するための光電センサと

、

前記光電センサに接続され、前記光電センサによって発せられた位置信号に基づいて前記移動カップ機構の位置を調整することができる位置調整機構とを備えることを特徴とする [8 2] に記載の免疫測定装置。

[8 6] 前記ガイドレールは直線レールまたは可変レールであることを特徴とする [8 5] に記載の免疫測定装置。

[8 7] 前記インキュベータの一方の側に設けられ、測定対象サンプルと試薬とを混合させるためのスラット用試料添加皿と、前記インキュベータの他方の側に設けられ、試薬を収納するための試薬冷蔵領域とをさらに備えることを特徴とする [8 0] ~ [8 2] のいずれか 1 つ又は [8 4] ~ [8 6] のいずれか 1 つに記載の免疫測定装置。

[8 8] 前記スラット用試料添加皿の一方の側に設けられた、ブランクスラットスタッキング及びローディング機構をさらに備え、前記ブランクスラットスタッキング及びローディング機構は、ブランクスラットをスラット用試料添加皿に押し付けるのに用いられることを特徴とする [8 7] に記載の免疫測定装置。

[8 9] サンプル試験管を支持するためのサンプル試験管載置棚をさらに備えることを特徴とする [8 8] に記載の免疫測定装置。

[9 0] 前記サンプル試験管載置棚におけるブランクスラットスタッキング及びローディング機構に近隣する側に設けられ、予備希釈プレートに対して希釈処理するための希釈プレートシェーカーをさらに備えることを特徴とする [8 9] に記載の免疫測定装置。

[9 1] 試料添加針が設けられている機械式アームをさらに備え、

前記機械式アームは、前記サンプル試験管載置棚領域からサンプルを吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第 1 の機械式アームと、前記試薬冷蔵領域から試薬を吸引してスラット用試料添加皿のスラット内に割り当てるための第 2 の機械式アームとを有することを特徴とする [8 9] に記載の免疫測定装置。

[9 2] 第 1 の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第 1 の洗浄機構と、第 2 の機械式アームの試料添加針を洗浄するための第 2 の洗浄機構とをさらに備えることを特徴とする [9 1] に記載の免疫測定装置。

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2017/112145
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N 33/53 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
G01N 33; G01N 21		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNKI & CNABS & CNTXT: HD-HOOK, 钩状效应, 前带效应, 峰值, 增幅, 二次, 比较, 对比, 校准品, 化学发光, VEN & EPODOC & WPI & ISI: hook effect, high dose hook, prozone phenomenon, peak, twice, compare, contrast, calibration, light initiating chemiluminescence, LICA, LICALIA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2790019 A1 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS GMBH) 15 October 2014 (15.10.2014), description, columns 2-11, and claim	1-62, 78-92
X	CN 104991056 A (WUHAN LINMIAN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 21 October 2015 (21.10.2015), claim, and description, pages 5-12	63-77
X	CN 102341706 A (ARKRAY INC.) 01 February 2012 (01.02.2012), the abstract, and claim, and description, pages 6-11	1-62, 78-92
A	CN 101055272 A (OLYMPUS LIFE AND MATERIAL SCIENCE) 17 October 2007 (17.10.2007), entire document	1-92
A	CN 101326440 A (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE INC.) 17 December 2008 (17.12.2008), entire document	1-92
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 09 February 2018	Date of mailing of the international search report 24 February 2018	
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer SHI, Jianping Telephone No. (86-10) 62085675	

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2017/112145

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB 2203836 A (DR CH NG SOO LING et al.) 26 October 1988 (26.10.1988), entire document	1-92
A	US 2008213797 A1 (ABBOTT LABORATORIES) 04 September 2008 (04.09.2008), entire document	1-92
X	马宏伟等. 血清心肌钙蛋白 I 光激化学发光免疫测定法的建立. 检验医学. 31 December 2007 (31.12.2007), 22(4), pp. 398-401. (MA, Hongwei et al. Development of Serum Cardiac Troponin I Light Induced Chemiluminescent Immunoassay. Laboratory Medicine.)	63-77
A	S. Amarasiri Fernando et al. Studies of the 'Hook' Effect in the One-Step Sandwich Immunoassay Journal of Immunological Methods. 31 December 1992 (31.12.1992), vol. 151, pp. 47-66	1-92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/112145

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
EP 2790019 A1	15 October 2014	None	
CN 104991056 A	21 October 2015	CN 104991056 B	04 January 2017
CN 102341706 A	01 February 2012	WO 2011016326 A1	10 February 2011
		JP 5714912 B2	07 May 2015
		CN 102341706 B	11 June 2014
		EP 2423686 A1	29 February 2012
		US 2012015450 A1	19 January 2012
		EP 2423686 A4	02 January 2013
		KR 101280650 B1	01 July 2013
		JP WO2011016326 A1	10 January 2013
		US 8993344 B2	31 March 2015
		EP 2423686 B1	02 September 2015
		KR 20110084253 A	21 July 2011
CN 101055272 A	17 October 2007	EP 1845373 A1	17 October 2007
		JP 2007286053 A	01 November 2007
		US 2007243559 A1	18 October 2007
CN 101326440 A	17 December 2008	WO 2006118647 A1	09 November 2006
		US 2006246601 A1	02 November 2006
		MX 2007013522 A	13 March 2008
		CN 101326440 B	24 April 2013
		EP 1875242 A1	09 January 2008
		KR 20080012852 A	12 February 2008
		JP 2008539424 A	13 November 2008
		KR 101288296 B1	29 July 2013
		US 7439079 B2	21 October 2008
		EP 1875242 B1	25 October 2017
GB 2203836 A	26 October 1988	GB 2203836 B	23 January 1991
		GB 8709814 D0	28 May 1987

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/112145

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		SG 96991 G	14 February 1992
US 2008213797 A1	04 September 2008	JP 2010520461 A	10 June 2010
		JP 5553615 B2	16 July 2014
		WO 2008106648 A2	04 September 2008
		WO 2008106648 A3	11 December 2008

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/112145

A. 主题的分类		
G01N 33/53(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
G01N33; G01N21		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNKI&CNABS&CNXTXT: HD-HOOK, 钩状效应, 前带效应, 峰值, 增幅, 二次, 比较, 对比, 校准品, 化学发光 VEN&EPODOC&WPI&ISI: hook effect, high dose hook, prozone phenomenon, peak, twice, compare, contrast, calibration, light initiating chemiluminescence, LIGA, LICLIA		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	EP 2790019 A1 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS GMBH) 2014年 10月 15日 (2014 - 10 - 15) 说明书第2-11栏、权利要求书	1-62, 78-92
X	CN 104991056 A (武汉林勉生物技术有限公司) 2015年 10月 21日 (2015 - 10 - 21) 权利要求书、说明书第5-12页	63-77
X	CN 102341706 A (爱科来株式会社) 2012年 2月 1日 (2012 - 02 - 01) 摘要、权利要求书、说明书第6-11页	1-62, 78-92
A	CN 101055272 A (奥林巴斯生命及材料科学欧洲有限公司) 2007年 10月 17日 (2007 - 10 - 17) 全文	1-92
A	CN 101326440 A (金伯利-克拉克环球有限公司) 2008年 12月 17日 (2008 - 12 - 17) 全文	1-92
A	GB 2203836 A (DR CH NG SOO LING等) 1988年 10月 26日 (1988 - 10 - 26) 全文	1-92
A	US 2008213797 A1 (ABBOTT LABORATORIES) 2008年 9月 4日 (2008 - 09 - 04) 全文	1-92
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “B” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2018年 2月 9日		2018年 2月 24日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		石剑平
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62085675

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/112145

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	马宏伟 等. "血清心肌肌钙蛋白I光激化学发光免疫测定法的建立" 检验医学, 第22卷, 第4期, 2007年 12月 31日 (2007 - 12 - 31), 第398-401页	63-77
A	S. Amarasiri Fernando et al. "Studies of the 'hook' effect in the one-step sandwich immunoassay" Journal of Immunological Methods, 第151卷, 1992年 12月 31日 (1992 - 12 - 31), 第47-66页	1-92

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/112145

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
EP	2790019	A1	2014年 10月 15日	无			
CN	104991056	A	2015年 10月 21日	CN	104991056	B	2017年 1月 4日
CN	102341706	A	2012年 2月 1日	WO	2011016326	A1	2011年 2月 10日
				JP	5714912	B2	2015年 5月 7日
				CN	102341706	B	2014年 6月 11日
				EP	2423686	A1	2012年 2月 29日
				US	2012015450	A1	2012年 1月 19日
				EP	2423686	A4	2013年 1月 2日
				KR	101280650	B1	2013年 7月 1日
				JP	W02011016326	A1	2013年 1月 10日
				US	8993344	B2	2015年 3月 31日
				EP	2423686	B1	2015年 9月 2日
				KR	20110084253	A	2011年 7月 21日
CN	101055272	A	2007年 10月 17日	EP	1845373	A1	2007年 10月 17日
				JP	2007286053	A	2007年 11月 1日
				US	2007243559	A1	2007年 10月 18日
CN	101326440	A	2008年 12月 17日	WO	2006118647	A1	2006年 11月 9日
				US	2006246601	A1	2006年 11月 2日
				MX	2007013522	A	2008年 3月 13日
				CN	101326440	B	2013年 4月 24日
				EP	1875242	A1	2008年 1月 9日
				KR	20080012852	A	2008年 2月 12日
				JP	2008539424	A	2008年 11月 13日
				KR	101288296	B1	2013年 7月 29日
				US	7439079	B2	2008年 10月 21日
				EP	1875242	B1	2017年 10月 25日
GB	2203836	A	1988年 10月 26日	GB	2203836	B	1991年 1月 23日
				GB	8709814	D0	1987年 5月 28日
				SG	96991	G	1992年 2月 14日
US	2008213797	A1	2008年 9月 4日	JP	2010520461	A	2010年 6月 10日
				JP	5553615	B2	2014年 7月 16日
				WO	2008106648	A2	2008年 9月 4日
				WO	2008106648	A3	2008年 12月 11日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 201611034252.1

(32)優先日 平成28年11月22日(2016.11.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

(31)優先権主張番号 201710695530.6

(32)優先日 平成29年8月15日(2017.8.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 ジャン、シャンファイ

中華人民共和国、201210 シャンハイ、プドン、カイルン・ロード・ナンバー88、ビルディング 2、サード・フロア

(72)発明者 リャン、ジフ

中華人民共和国、201210 シャンハイ、プドン、カイルン・ロード・ナンバー88、ビルディング 2、サード・フロア

(72)発明者 リウ、ガイドン

中華人民共和国、100094 베이진、ハイディアンのディストリクト、ヨンフェン・ベース、フェンシアン・ゾングル 7

(72)発明者 ウー、ドンヤン

中華人民共和国、100094 베이진、ハイディアンのディストリクト、ヨンフェン・ベース、フェンシアン・ゾングル 7

(72)発明者 ザオ、ウェイグオ

中華人民共和国、201210 シャンハイ、プドン、カイルン・ロード・ナンバー88、ビルディング 2、サード・フロア

(72)発明者 リウ、ユフイ

中華人民共和国、100094 베이진、ハイディアンのディストリクト、ヨンフェン・ベース、フェンシアン・ゾングル 7

(72)発明者 リ、リン

中華人民共和国、100094 베이진、ハイディアンのディストリクト、ヨンフェン・ベース、フェンシアン・ゾングル 7

Fターム(参考) 2G054 AB04 BA04 BB08 BB10 BB13 CD01 CD04 CE10 EA01 EA03
EB01 EB03 EB05 FA06 FA12 FA32 FA33 FA36 FB02 FB03
FB07 GA03 GA04 GA05 GB10 GE01 JA01 JA02 JA05 JA07
JA08
4B029 AA07 BB15 BB17 FA15

专利名称(译)	鉴定hd-hook效应样品和免疫测定的方法，系统，试剂盒和装置		
公开(公告)号	JP2020507780A	公开(公告)日	2020-03-12
申请号	JP2019547751	申请日	2017-11-21
[标]发明人	ヤンヤン リリン		
发明人	ヤン、ヤン ジャン、シャンファイ リヤン、ジフ リウ、ガイドン ウー、ドンヤン ザオ、ウェイグオ リウ、ユファイ リ、リン		
IPC分类号	G01N33/536 G01N21/76 C12M1/34 C09K11/06		
CPC分类号	G01N33/53 G01N21/76 G01N33/5375 G01N33/58 G01N33/6854 G16B25/10		
FI分类号	G01N33/536.D G01N21/76 C12M1/34.F C09K11/06		
F-TERM分类号	2G054/AB04 2G054/BA04 2G054/BB08 2G054/BB10 2G054/BB13 2G054/CD01 2G054/CD04 2G054/CE10 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/EB01 2G054/EB03 2G054/EB05 2G054/FA06 2G054/FA12 2G054/FA32 2G054/FA33 2G054/FA36 2G054/FB02 2G054/FB03 2G054/FB07 2G054/GA03 2G054/GA04 2G054/GA05 2G054/GB10 2G054/GE01 2G054/JA01 2G054/JA02 2G054/JA05 2G054/JA07 2G054/JA08 4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/FA15		
优先权	201611026623.1 2016-11-22 CN 201611034237.7 2016-11-22 CN 201611034252.1 2016-11-22 CN 201710695530.6 2017-08-15 CN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在免疫测定中鉴定HD-HOOK作用样品的方法，鉴定HD-HOOK作用的系统，试剂盒和装置，免疫鉴定方法，系统，试剂盒和鉴定免疫测定的装置。是的。校正产物，峰校正产物，包含待测靶抗原（或抗体）的待测样品的化学发光免疫反应，激发化学发光以记录第一和第二读数以及峰校正产物 R0是第二读数与第一读数之间的差值的放大率A，并且进行比较以比较待测样品的第二读数与第一读数之间的放大率A'是否超过R0。但是，如果它超过R0，则样本具有HD-HOOK效果；如果它小于R0，则其不具有HD-HOOK效果。[选型图]图1

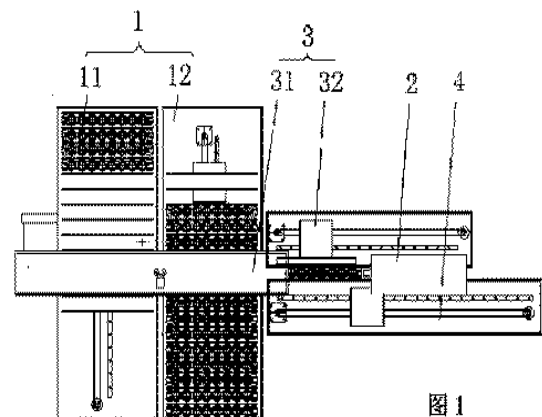


图1