

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4435581号  
(P4435581)

(45) 発行日 平成22年3月17日(2010.3.17)

(24) 登録日 平成22年1月8日(2010.1.8)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 7
GO 1 N 15/14 (2006.01)	GO 1 N 15/14 P
GO 1 N 27/06 (2006.01)	GO 1 N 27/06 Z

請求項の数 12 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2004-2390 (P2004-2390)	(73) 特許権者	390014960
(22) 出願日	平成16年1月7日(2004.1.7)		シスメックス株式会社
(65) 公開番号	特開2005-195473 (P2005-195473A)		兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
(43) 公開日	平成17年7月21日(2005.7.21)	(74) 代理人	100088867
審査請求日	平成18年11月30日(2006.11.30)		弁理士 西野 卓嗣
		(72) 発明者	川手 康徳
			神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
			シスメックス株式会社内
		(72) 発明者	松本 輝也
			神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
			シスメックス株式会社内
		(72) 発明者	大坪 加代子
			神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
			シスメックス株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫測定装置および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

測定対象物質を含むと思われる検体と、測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、を混和して測定用試料を調製する測定用試料調製手段と、測定用試料に含まれる各粒子から粒子の内部情報および粒子の大きさ情報を検出する検出手段と、検出された内部情報に基づいて担体粒子を測定対象外粒子から識別する識別手段と、前記識別手段により識別された担体粒子の大きさ情報に基づいて担体粒子の凝集度を求める分析手段とを備え、前記内部情報が側方散乱光又は高周波抵抗であることを特徴とする免疫測定装置。

【請求項2】

前記識別手段は、前記内部情報および大きさ情報に基づいて担体粒子を識別する請求項1に記載の免疫測定装置。

【請求項3】

前記内部情報が側方散乱光であり、前記大きさ情報が前方散乱光であることを特徴とする請求項1又は2に記載の免疫測定装置。

【請求項4】

前記内部情報が高周波抵抗であり、前記大きさ情報が直流抵抗であることを特徴とする請求項1又は2に記載の免疫測定装置。

【請求項5】

前記分析手段は、前記凝集度に基づいて検体に含まれる測定対象物質の濃度を算出する請

求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の免疫測定装置。

【請求項 6】

前記分析手段は、前記凝集度に基づいて検体に測定対象物質が含まれるか否かを判別する請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の免疫測定装置。

【請求項 7】

測定対象物質を含むと思われる検体と、測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、を混和して測定用試料を調製する測定用試料調製工程と、測定用試料に含まれる各粒子から粒子の内部情報および粒子の大きさ情報を検出する検出工程と、検出された内部情報に基づいて担体粒子を測定対象外粒子から識別する識別工程と、前記識別工程により識別された担体粒子の大きさ情報に基づいて担体粒子の凝集度を求める凝集度算出工程を含み、前記内部情報が側方散乱光又は高周波抵抗であることを特徴とする免疫測定方法。

10

【請求項 8】

前記識別工程は、前記内部情報および粒子の大きさ情報に基づいて担体粒子を識別する請求項 7 に記載の免疫測定方法。

【請求項 9】

前記内部情報が側方散乱光であり、前記大きさ情報が前方散乱光であることを特徴とする請求項 7 又は 8 に記載の免疫測定方法。

【請求項 10】

前記内部情報が高周波抵抗であり、前記大きさ情報が直流抵抗であることを特徴とする請求項 7 又は 8 に記載の免疫測定方法。

20

【請求項 11】

前記凝集度に基づいて検体に含まれる測定対象物質の濃度を算出する濃度算出工程を含む請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の免疫測定方法。

【請求項 12】

前記凝集度に基づいて検体に測定対象物質が含まれるか否かを判別する判別工程を含む請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫測定装置および免疫測定方法に関し、特に担体粒子を用いた免疫学的凝集反応により、血液、尿などの検体に含まれる測定対象物質を検出し、分析する装置および方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

抗原抗体反応を利用して、血液等の検体に含まれる測定対象物質を検出する免疫測定方法が、臨床検査の分野で広く用いられている。そのような免疫測定方法としては、ラジオイムノアッセイ (RIA)、エンザイムイムノアッセイ (EIA)、粒子凝集法などの方法が知られている。

【0003】

粒子凝集法では測定対象物質を含むと思われる検体と、測定対象物質に対応する抗体又は抗原を感作した担体粒子とを混和する。検体中に測定対象物質が存在すると、抗原抗体反応により担体粒子が凝集するので、その凝集を検出する。

40

【0004】

一般的に、前記した粒子凝集法における検体は、血清および血漿が用いられている。これは、血液中に存在する赤血球や血小板などの血球成分、破碎赤血球や破碎血小板など血球成分の破碎物、および脂肪粒子などの測定対象外粒子が担体粒子凝集の検出に影響を与えるためである。そのため、被験者から得られた血液は、遠心分離などの作業を経て、全血から血清もしくは血漿を調製しなければならない。

【0005】

50

しかし、血清および血漿を検体として使用する際、全血に含まれる脂肪粒子などの比較的小さい測定対象外粒子については、遠心分離などの作業を経ても完全に取り除くことができない場合がある。そのような場合では、血清および血漿中に残った測定対象外粒子が凝集の検出に影響を及ぼす可能性がある。

【0006】

また、緊急検査など、早急に測定結果を得たい場合は、煩雑で時間のかかる血清および血漿の調製が不要な、全血を検体として用いる測定方法が望まれている。全血を用いることが可能な、粒子凝集法による免疫測定方法としては、以下のような技術がある。

【0007】

担体粒子を用いたカウンティングイムノアッセイ(CIA)において、測定対象外粒子の粒度分布を推定し、担体粒子と測定対象外粒子を含む粒度分布から、推定した測定対象外粒子の粒度分布を差し引いて補正する粒度分布作成方法(例えば特許文献1)を利用した免疫測定方法。

【0008】

担体粒子を用いたカウンティングイムノアッセイ(CIA)では、まず測定対象物質を含む検体と、測定対象物質に対応する抗体又は抗原を感作した担体粒子とを混和し、抗原抗体反応によって担体粒子を凝集させる。そして、その凝集を光学的に検出して担体粒子の粒度分布を得、粒度分布から担体粒子の凝集度を解析して測定対象物質の濃度を調べる。

【0009】

ところが、上記の方法において、検体中に測定対象外粒子が存在すると、担体粒子の粒度分布図において測定対象外粒子の分布が現れる。そこで、特許文献1で示されているような粒度分布作成方法を用いることにより、測定対象外粒子の影響を排除できる。この粒度分布作成方法は、測定対象外粒子の粒度分布をスプライン関数で補間して推定し、担体粒子と測定対象外粒子を含む粒度分布から、推定した測定対象外粒子の粒度分布を差し引いて補正する。この補正により、測定対象外粒子の影響を排除した担体粒子の粒度分布図を得ることができる。

【0010】

【特許文献1】特許第2912413号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の解決課題は、粒子凝集法を用いた免疫測定において、検体として全血および血清もしくは血漿を用いることが可能であって、さらに、検体中に測定対象外粒子が含まれていても、担体粒子と測定対象外粒子を識別し、担体粒子として識別された粒子の情報のみを用いることで、より高精度に担体粒子の凝集度を求めることができる免疫測定装置および方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

上記課題に鑑み本発明は、測定対象物質を含むと思われる検体と、測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、を混和して測定用試料を調製する測定用試料調製手段と、測定用試料に含まれる各粒子から粒子の内部情報および粒子の大きさ情報を検出する検出手段と、検出された内部情報に基づいて担体粒子を測定対象外粒子から識別する識別手段と、前記識別手段により識別された担体粒子の大きさ情報に基づいて担体粒子の凝集度を求める分析手段とを備え、前記内部情報が側方散乱光又は高周波抵抗である免疫測定装置を提供する。

【0013】

また、本発明は、測定対象物質を含むと思われる検体と、測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、を混和して測定用試料を調製する測定用試料調製手段と、測定用試料に含まれる各粒子から側方散乱光および前方散乱光を検出する検出手段と、検出された側方散乱光に基づいて担体粒子を測定対象外粒子から識別する識別手段と、前

10

20

30

40

50

記識別手段により識別された担体粒子の前方散乱光に基づいて担体粒子の凝集度を求める分析手段を有する免疫測定装置を提供する。

【0015】

また、本発明は、測定対象物質を含むと思われる検体と、測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、を混和して測定用試料を調製する測定用試料調製工程と、測定用試料に含まれる各粒子から粒子の内部情報および粒子の大きさ情報を検出する検出工程と、検出された内部情報に基づいて担体粒子を測定対象外粒子から識別する識別工程と、前記識別工程により識別された担体粒子の大きさ情報に基づいて担体粒子の凝集度を求める凝集度算出工程を含み、前記内部情報が側方散乱光又は高周波抵抗である免疫測定方法を提供する。

10

【0016】

また、本発明は、測定対象物質を含むと思われる検体と、測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、を混和して測定用試料を調製する測定用試料調製工程と、測定用試料に含まれる各粒子から側方散乱光および前方散乱光を検出する検出工程と、検出された側方散乱光に基づいて担体粒子を測定対象外粒子から識別する識別工程と、前記識別工程により識別された担体粒子の前方散乱光に基づいて担体粒子の凝集度を求める凝集度算出工程を含む免疫測定方法を提供する。

【発明の効果】

【0017】

本発明の免疫測定装置および方法においては、各粒子の内部情報を検出し、その内部情報に基づいて担体粒子と測定対象外粒子を識別する。そのため、本発明の免疫測定装置および方法では、測定対象外粒子の影響を排除して、簡便、迅速かつ正確に担体粒子の凝集度を求めることが可能である。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明における免疫測定方法は粒子凝集法を用いるものである。担体粒子としては、粒子凝集法で一般的に用いられているもの、例えばラテックス粒子、金属粒子、デンドリマーなどが挙げられる。

【0019】

担体粒子に感作する抗体又は抗原には、測定対象物質が抗体であればその抗体と特異的に抗原抗体反応する抗原が用いられ、測定対象物質が抗原であればその抗体と特異的に抗原抗体反応する抗体が用いられる。例えば測定項目が癌胎児性抗原（CEA抗原）であれば抗CEA抗体が感作される。

30

【0020】

本発明では、担体粒子および測定対象外粒子から「粒子の内部情報」（以下、内部情報と省略する）を検出する。内部情報としては、例えば「粒子内の密度」（以下、密度と省略する）が挙げられる。担体粒子の密度は、検体に含まれる赤血球、血小板、脂肪粒子などの測定対象外粒子の密度よりも大きい。そこで、担体粒子および測定対象外粒子の密度を反映する情報を検出し、その情報に基づいて担体粒子と測定対象外粒子を識別することができる。密度を反映する情報としては、側方散乱光強度といった光学的情報が挙げられる。また、光学的情報以外にも、高周波電流を流した電極間に粒子を通過させた際に得られる高周波抵抗といった電気的情報が挙げられる。

40

【0021】

未凝集の担体粒子（以下、単独粒子と省略する）と複数の担体粒子が凝集して形成された凝集塊（以下、凝集粒子と省略する）とを比較すると、凝集粒子のほうが見かけの大きさが大きい。そのため、「粒子の大きさ情報」（以下、大きさ情報と省略する）を検出することで、単独粒子と凝集粒子とを区別して計数することができ、担体粒子の凝集度を求めることができる。そこで、本発明では検出した大きさ情報に基づいて、担体粒子の凝集度を求める。本発明における大きさ情報としては、前方散乱光といった光学的情報が挙げられる。また、光学的情報以外にも、直流電流を流した電極間に粒子を通過させた際に得

50

られる直流抵抗といった電気的情報が挙げられる。

【0022】

また、本発明における担体粒子の凝集度とは、抗原抗体反応に基づく担体粒子の凝集の度合いをいう。

【0023】

以下、本発明の1つの実施形態における免疫測定装置について説明する。

【0024】

(概要)

この免疫測定装置は、血液や尿などの検体、担体粒子懸濁液および反応緩衝液を混合して測定用試料を調製する。担体粒子懸濁液とは、担体粒子を水や緩衝液など適当な液体に懸濁させたものである。検体中に測定対象物質が存在する場合、担体粒子懸濁液を検体に添加すると、抗原抗体反応により担体粒子の凝集が生じる。反応緩衝液は、担体粒子懸濁液と共に検体に添加し、抗原抗体反応を生じさせる環境を整えるためのものである。調製した測定用試料にはレーザー光を照射し、試料液から発せられた側方散乱光および前方散乱光といった光学的情報を検出する。さらに、検出した光学的情報に基づき、担体粒子の凝集度を算出する。

10

【0025】

(免疫測定装置の全体構成)

図1は免疫測定装置1の外観を示したものである。装置1の最前面には、各種設定入力を行ったり、また測定結果を表示出力するための液晶タッチパネル2、測定用試料調製部カバー3およびスタートスイッチ4が配置されている。図2は免疫測定装置1の内部構成を示したものである。装置1右側のスペースには装置の動作や分析処理をつかさどる制御部5が配置されている。装置1左下のスペースには、試料液から信号を検出するための測定部6が配置されている。また、残りのスペースには、試料液を調製するための測定用試料調製部7が配置されている。

20

【0026】

(測定用試料調製部の構成)

図3は測定用試料調製部7を示す説明図である。測定用試料調製部7は検体セット部8、試薬セット部9、反応部10、分注装置11および送液装置12を含む。前記図1の測定用試料調製部カバー3を開けることにより、検体セット部8には検体の入った検体容器を、また、試薬セット部9には反応緩衝液の入った微量試験管13や担体粒子懸濁液の入った微量試験管14をそれぞれセットするようになっている。反応部10に微量試験管15がセットされており、そこで検体に反応緩衝液と担体粒子懸濁液が混合されて、測定用試料が調製される。なお図には示していないが、反応部10には微量試験管15の中の溶液を一定の温度に保つための温度調節機構と微量試験管15の中の溶液を攪拌させるための攪拌機構が備えられている。分注装置11はその先端から所定量の液体を吸引・吐出するようになっており、また図示していない駆動装置によって上下左右に移動可能となっている。送液装置12は測定用試料を吸引するための吸引管16と、吸引管16から吸引した測定用試料を図4で示している測定部6へと送液する送液管17と、測定用試料を吸引して測定部6へ送液するためのポンプ18からなる。吸引管16は反応部10にセットされた微量試験管15に挿入され、そして所定の量の測定用試料が吸引される。吸引された測定用試料は送液管17を通過して測定部6へ送液される。

30

40

【0027】

(測定部の構成)

図4は測定部6を示す説明図である。測定部6にはシースフローセル19、レーザー光源20、コンデンサレンズ21、2つの集光レンズ22、23、2つのピンホール24、25、フォトダイオード26およびフォトマルチプライヤーチューブ27が設けられている。シースフローセル19は、前記図3の測定用試料調製部7で調製された測定用試料を流すためのものである。また、図5に示すようにシースフローセル19は、測定用試料液を細孔部31に向かって上方へ噴射する試料ノズル28と、シース液供給口29と廃液口

50

30を備える。集光レンズ24および25は、レーザー光を受けた試料中の粒子一個一個から得られる前方散乱光および側方散乱光といった光学的情報を集光する。フォトダイオード26は前方散乱光を受光、光電変換し、電気信号として出力する。また、フォトマルチプライヤーチューブ27は側方散乱光を受光、光電変換し、電気信号として出力する。出力された各信号は制御部5へ送られる。

#### 【0028】

(制御部の構成)

図6は制御部5の構成、および制御部5と装置各部との関係を示すブロック図である。制御部5は中央演算装置(CPU)やROM・RAM等の記憶装置を有するマイクロコンピュータ、測定部6から送られてきた信号を処理する回路などを有する。制御部5は記憶部32、分析部33および動作制御部34としての機能を果たす。記憶部32は、試料中の粒子から得た信号の分析を行う分析プログラムや、装置各部の動作を制御する制御プログラムを記憶している。また、測定部6で検出された信号のデータや、分析プログラムによる処理結果を記憶する。分析部33は、分析プログラムに基づき測定部6で検出された信号を分析して、測定用試料液中に含まれる各粒子に関するデータを生成する。分析部33で生成されたデータは液晶タッチパネル2に出力される。動作制御部34は、記憶部32に記憶されている制御プログラムに基づき装置各部の動作を制御する。

#### 【0029】

以下装置の動作について詳しく説明する。まず、操作者が検体や測定用試薬を測定用試料調製部7の所定の位置にセットする。検体は、前記図1の測定用試料調製部カバー3を開けることにより、前記図3の測定用試料調製部7の検体セット部8にセットできるようになっている。また、測定用試料調製部7の試薬セット部9には反応緩衝液の入った微量試験管13や担体粒子懸濁液の入った微量試験管14をそれぞれセットするようになっている。

#### 【0030】

このようにして、検体および試薬をセットし、スタートスイッチ4を押すと、全体制御がスタートする。図7は制御プログラムによる全体制御の流れを示すフローチャートである。スタートスイッチを押すと、スタートスイッチを押すと、ステップS1(測定用試料調製)、ステップS2(測定)、ステップS3(分析)およびステップS4(出力)が順次実行される。測定用試料調製部7、測定部6、分析部33は制御プログラムにより制御され、一連の動作が自動的に行われる。上記ステップS1、S2、S3およびS4について以下に説明する。

#### 【0031】

ステップS1(測定用試料調製)

測定用試料調製における測定用試料調製部7の動作を、図3を用いて説明する。まず分注装置11が、検体セット部8にセットされている検体容器から検体を吸引し、反応部10にセットされている微量試験管15に10 $\mu$ Lを分注する。次に分注装置11が試薬セット部9にセットされている微量試験管13から反応緩衝液を吸引し、反応部10にセットされている微量試験管15に80 $\mu$ Lを分注する。さらに分注装置11が試薬セット部9にセットされている微量試験管14から担体粒子懸濁液を吸引し、反応部10にセットされている微量試験管15に10 $\mu$ Lを分注する。この後反応部10が微量試験管15を温度45に保ちながら15分間攪拌する。これより、微量試験管15において測定用試料が調製される。測定用試料が調製されると、送液装置12により反応部10の微量試験管15から測定用試料が吸引され、測定部6のシースフローセル19に流される。

#### 【0032】

ステップS2(測定)

測定における測定部6の動作を、図4と図5を用いて説明する。測定用試料調製部7で調製された測定用試料はシースフローセル19に導かれ、試料ノズル28から試料液がシースフローセル内に吐出される。それと同時にシース液供給口29からシース液がシースフローセル内に吐出される。これによって試料液はシースフローセル内でシース液に包ま

10

20

30

40

50

れ、さらに細孔部 3 1 によって細く絞られて流れる。試料液の流れを、粒子径と同程度まで絞り込むことにより、試料液に含まれた粒子を一行に整列させて細孔部に流すことができる。

#### 【 0 0 3 3 】

細孔部 3 1 を流れる試料流へレーザー光源 2 0 から出射されたレーザー光がコンデンサレンズ 2 1 で絞られて照射される。レーザー光を受けた試料中の粒子一個一個から発せられる前方散乱光は集光レンズ 2 2 より、側方散乱光は集光レンズ 2 3 により集光され、それぞれピンホール 2 4、2 5 を通過する。ピンホール 2 4 を通過した前方散乱光は、フォトダイオード 2 6 で受光、光電変換されて、前方散乱光信号として出力される。一方、ピンホール 2 5 を通過した側方散乱光は、フォトマルチプライヤーチューブ 2 7 で受光、光電変換されて、側方散乱光信号として出力される。出力された各信号は制御部 5 へ送られ、粒子毎のデータとして記憶部 3 2 に記憶される。

10

#### 【 0 0 3 4 】

##### ステップ S 3 (分析)

ステップ S 2 の測定により前方散乱光信号や側方散乱光信号が検出されると、次に分析部 3 3 が分析プログラムに基づいて各信号を分析する。ステップ S 3 における分析プログラムの動作について、図 8 のフローチャートを用いて説明する。フローチャートの各ステップは以下のとおりである。

#### 【 0 0 3 5 】

ステップ S 5 : 試料液から検出された前方散乱光信号および側方散乱光信号のデータを記憶部 3 2 から読み出す。続いてステップ S 6 へ進む。

20

ステップ S 6 : 試料液中の各粒子から得られた前方散乱光信号および側方散乱光信号に基づき、前方散乱光強度 (Fsc) および側方散乱光強度 (Ssc) を算出する。続いてステップ S 7 へ進む。

ステップ S 7 : ステップ S 6 で算出した粒子毎の Fsc および Ssc をパラメーターとしたスキヤッタグラムを作成する。これは、まず Fsc および Ssc を軸にとった二次元座標を展開し、次に測定用試料中の各粒子についてステップ S 6 で算出した Fsc および Ssc に対応する座標にプロットを行う。このようにして Fsc および Ssc をパラメーターとしたスキヤッタグラムを作成する。続いてステップ S 8 へ進む。

ステップ S 8 : 作成したスキヤッタグラム上において、担体粒子が出現する領域 (以下、CP 領域とする) を設定する。この領域がスキヤッタグラム上に設定された様子を図 9 に示す。スキヤッタグラムは、縦軸に側方散乱光強度 (Ssc) を、横軸に前方散乱光強度 (Fsc) をとっている。Fsc は、粒子の大きさを反映する情報であり、スキヤッタグラムにおいて右へいくほど粒子の大きさが大きくなる。Ssc は、密度を反映する情報であり、スキヤッタグラムにおいて上へいく程密度が大きくなる。担体粒子は、測定対象外粒子と比較して密度が高い傾向にある。ゆえに、Ssc をパラメーターとしたスキヤッタグラムを用いることで、担体粒子と測定対象外粒子を識別することができる。ここで担体粒子を識別するために設定される CP 領域は、測定対象物質のみ含む検体より調製した測定用試料、ならびに測定対象物質および測定対象外粒子を含む検体より調製した測定用試料を測定することにより、経験的に定めたものである。これより、測定用試料に含まれている担体粒子は CP 領域内に出現し、測定対象外粒子は CP 領域外に出現する。なお、CP 領域は、記憶部 3 2 に記憶されており、ステップ S 8 において分析プログラムによって読み出され、スキヤッタグラム上に適用される。続いてステップ S 9 へ進む。

30

40

ステップ S 9 : スキヤッタグラム上に設定された CP 領域内に出現した担体粒子について、ヒストグラムを作成する。図 10 の A は、CP 領域内に出現した担体粒子の Fsc をもとに作成したヒストグラムの一例であり、縦軸に粒子の個数 (度数) を、横軸に Fsc をとったものである。続いてステップ S 10 へ進む。

ステップ S 10 : ステップ S 9 で作成したヒストグラムに基づいて、凝集度を算出する。ここでは、まず、ステップ S 9 で作成したヒストグラムに基づいて、単独粒子と凝集粒子を区別する。そして、単独粒子数 (M) および凝集粒子数 (P) を計数する。さらに、M と P

50

の合計である総粒子数 (T) を求め、 $P/T$  を凝集度として算出する。続いてステップS11へ進む。

ステップS11：ステップS7および8で作成されたスカッタグラム、ステップ9で作成されたヒストグラム、およびステップS10より算出された凝集度のデータを記憶する。

【0036】

ステップS4（出力）

ステップS7および8で作成されたスカッタグラム、ステップ9で作成されたヒストグラム、およびステップS10より算出された凝集度のデータを液晶タッチパネル2に出力し、表示する。以上がこの実施形態における測定のプロフローチャートである。

10

【0037】

図10は、全血を検体として用いて本実施形態の免疫測定装置1で測定し、得られたヒストグラムの一例を示したものである。図10のAは、CP領域内に出現した担体粒子について作成したヒストグラムである。一方、図10のBは、CP領域内に出現した担体粒子およびCP領域外に出現した測定対象外粒子について作成したヒストグラムである。

【0038】

図10のAからわかるように、検出された粒子は単独粒子、二個凝集粒子、三個凝集粒子といった担体粒子の大きさの対応する位置に分布する。図中v、w、x、yで示すように、単独粒子よりも大きさの小さい個所、単独粒子と二個凝集粒子の間の個所、二個凝集粒子と三個凝集粒子の間の個所、三個凝集粒子よりも大きさの大きい個所には、実質的に粒子が分布しない。このようなヒストグラムにおいて、単独粒子の大きさに対応する前方散乱光強度および二個凝集粒子の大きさに対応する前方散乱光強度の間に閾値を設定し、前記閾値より小さな範囲に分布する粒子を単独粒子、前記閾値より大きな範囲に分布する粒子を凝集粒子として区別することで単独粒子数および凝集粒子数を計算できる。

20

【0039】

一方、図10のBに示したヒストグラムには、担体粒子のみならず、全血検体中の測定対象外粒子も含まれており、本来粒子が分布すべきでないv、w、x、yの個所にも粒子の分布が見られる。このため、図10のBのように測定対象外粒子の影響を受けたヒストグラムに基づき単独粒子数および凝集粒子数を計算しても、その値は正確なものとはならず、単独粒子数および凝集粒子数から算出される担体粒子の凝集度も、正確なものとはならない場合がある。

30

【0040】

図10のAとBとの比較からわかるように、担体粒子と測定対象外粒子とを識別し、担体粒子のみを対象としてヒストグラムを作成することにより、測定対象外粒子の影響を効率よく排除して正確な担体粒子の凝集度を算出することが可能である。

【0041】

<測定例>

上記に説明してきた免疫測定装置1を用いて検体を分析した結果の例を示す。本例の測定には、シスメックス（株）製ランリームHBsAgを用いた。これは、HBs抗原測定用の試薬キットであり、HBsAgラテックス試薬、HBsAg緩衝液、HBsAg検体希釈液、HBsAgキャリアプレートから構成される。本例では担体粒子懸濁液としてHBsAgラテックス試薬を、反応緩衝液としてHBsAg緩衝液を使用した。HBsAgラテックス試薬は、抗HBs抗体を感作したラテックス粒子の懸濁液である。なお、HBs抗原は、B型肝炎ウイルス（HBV）の表面抗原であり、HBs抗原測定用の試薬を用いた測定によりHBV感染状態かどうかを調べることができる。

40

【0042】

また、本例では、ヒトから採取したHBsAg陰性の全血およびヒトから採取したHBsAg陽性の全血をそれぞれ検体として用いた。

【0043】

図11は、上記の試薬および検体を用いた測定により得られたスカッタグラムである

50

。図11において、Iは検体としてHBsAg陰性の全血を用いた場合のスカッタグラムであり、IIは検体としてHBsAg陽性の全血を用いた場合のスカッタグラムである。いずれのスカッタグラムについても、CP領域内にはラテックス粒子に対応するドットが出現し、CP領域外には測定対象外粒子に対応するドットは出現している。なお、本例で用いた検体に含まれる測定対象外粒子は、主に血小板である。

【0044】

図12は、HBsAg陰性の全血を用いた場合のスカッタグラム(図11-I)上に出現した粒子について作成したヒストグラムである。図12のAは、図11-IのCP領域内に出現した担体粒子について作成したヒストグラムであり、図12のBは、図11-IのCP領域内に出現した担体粒子およびCP領域外に出現した測定対象外粒子について作成したヒストグラムである。これより、Bのヒストグラムにおいて見られる全体的にベースラインが上がるといったような測定対象外粒子の影響が、Aのヒストグラムにおいて排除されていることがわかる。

10

【0045】

図13は、HBsAg陽性の全血を用いた場合のスカッタグラム(図11-II)上に出現した粒子について作成したヒストグラムである。図13のAは、図11-IIのCP領域内に出現した担体粒子について作成したヒストグラムであり、図13のBは、図11-IIのCP領域内に出現した担体粒子およびCP領域外に出現した測定対象外粒子について作成したヒストグラムである。これより、Bのヒストグラムにおいて見られる全体的にベースラインが上がるといったような測定対象外粒子の影響が、Aのヒストグラムにおいて排除されていることがわかる。

20

【0046】

次に、前記図12および図13で示したヒストグラムに基づいて算出された凝集度P/Tを、以下の表1に示す。

【0047】

【表1】

	凝集度 (P/T%)
I-A	0.49
I-B	1.24
II-A	12.50
II-B	14.65

30

【0048】

表1のI-Aは、HBsAg陰性の全血を検体として用いて得られたヒストグラムのうち、CP領域内に出現した担体粒子について作成したヒストグラム(図12A)に基づいて算出した凝集度(P/T%)である。一方、I-Bは、HBsAg陰性の全血を検体として用いて得られたヒストグラムのうち、CP領域内に出現した担体粒子およびCP領域外に出現した測定対象外粒子について作成したヒストグラム(図12B)に基づいて算出した凝集度(P/T%)である。また、表1のII-Aは、HBsAg陽性の全血を検体として用いて得られたヒストグラムのうち、CP領域内に出現した担体粒子について作成したヒストグラム(図13A)に基づいて算出した凝集度(P/T%)である。一方、II-Bは、HBsAg陽性の全血を検体として用いて得られたヒストグラムのうち、CP領域内に出現した担体粒子およびCP領域外に出現した測定対象外粒子について作成したヒストグラム(図13B)に基づいて算出した凝集度(P/T%)である。

40

【0049】

表1において、I-Bの凝集度はI-Aの凝集度よりも高い値を示している。また、同様に、II-Bの凝集度はII-Aの凝集度よりも高い値を示している。以上のことから、CP領域内に出現した担体粒子およびCP領域外に出現した測定対象外粒子について作成したヒストグ

50

ラムに基づいて凝集度を算出すると、CP領域外に出現した測定対象外粒子の影響を受け、実際の凝集度の値よりも高くなるということがわかる。

【 0 0 5 0 】

以下、測定対象物質の濃度の算出について説明する。

【 0 0 5 1 】

検体に含まれる測定対象物質の濃度は、予め既知濃度の測定対象物質を含む検体を測定して、得られた担体粒子の凝集度に基づき検量線を作成し、この検量線を利用することで求めることができる。そこで、本例では、シスメックス（株）製ランリームHBsAgのHBsAg検体希釈液およびHBsAgキャリブレーターを用いて検量線を作成し、図12および図13のヒストグラムより算出された凝集度（表1）に基づき、HBs抗原の濃度を算出した。HBsAg検体希釈液は、HBs抗原を含有していない液体である。HBsAgキャリブレーターは、HBs抗原を含む溶液であり、抗原濃度が6段階に調製されている。そこで、HBsAg検体希釈液とHBsAgキャリブレーターを、計7段階の抗原濃度の検量線作成用検体として用い、検量線を作成した。この検量線に基づき、算出されたHBs抗原の濃度を以下の表2に示す。

10

【 0 0 5 2 】

【表2】

	HBs抗原の濃度 (U/mL)
I - a	0
I - b	0.4
II - a	8.5
II - b	14.0

20

【 0 0 5 3 】

表2のI - aは、表1のI - Aの凝集度に基づいて算出したHBs抗原の濃度 (U/mL) である。一方、表2のI - bは、表1のI - Bの凝集度に基づいて算出したHBs抗原の濃度 (U/mL) である。また、表2のII - aは、表1のII - Aの凝集度に基づいて算出したHBs抗原の濃度 (U/mL) である。一方、表2のII - bは、表1のII - Bの凝集度に基づいて算出したHBs抗原の濃度 (U/mL) である。

【 0 0 5 4 】

30

表2では、I - aのHBs抗原の濃度が0 (U/mL) であるのに対し、I - bのHBs抗原の濃度が0.4 (U/mL) と、I - aのHBs抗原の濃度よりも高い値を示している。また、同様に、II - aのHBs抗原の濃度が8.5 (U/mL) であるのに対し、II - bのHBs抗原の濃度が14.0 (U/mL) と、II - aのHBs抗原の濃度よりも高い値を示している。以上のことから、HBs抗原の濃度に対して、CP領域外に出現した測定対象外粒子は大きな影響を与えるということがわかる。

【 0 0 5 5 】

つまり、図12、図13、表1および表2の結果は、上記に示したような方法によってCP領域を設定し、CP領域内に出現した担体粒子について凝集度およびHBs抗原の濃度を算出することが、誤った測定結果を導く測定対象外粒子の影響を排除する上で非常に有効であることを示すものである。

40

【 0 0 5 6 】

なお、本実施形態では、ヒトから採取した全血を検体として用いているが、本発明はこれに限定されない。本発明では、全血以外に、血清および血漿を検体として用いることができる。さらに、血球、血球成分の破砕物、細菌および脂肪粒子などの測定対象以外の粒子が含まれている血液、尿を検体として用いることができる。

【 0 0 5 7 】

本実施形態では、反応緩衝液としてシスメックス（株）製ランリームHBsAgのHBsAg緩衝液を用いているが、使用できる反応緩衝液はこれに限定されない。例えば、約pH6~8.5付近に緩衝能を有する溶液を反応緩衝液として用いることができる。緩衝液の種類として

50

は、例えば、リン酸塩緩衝液、トリス-塩酸緩衝液などが挙げられる。また、反応緩衝液には、非特異反応を抑制するための物質や増感剤なども必要に応じて添加することができる。

【0058】

本実施形態では、担体粒子としてシスメックス（株）製ランリームHBsAgのHBsAgラテックス試薬に含まれるラテックス粒子を用いているが、本発明ではこれに限定されない。本発明では、測定対象物質に対応する抗体又は抗原が感作された担体粒子であれば用いることができる。この粒子のサイズは、直径約0.1~1.0 $\mu$ m程度のものが適当である。また、担体粒子に抗体又は抗原を感作する方法は、当該分野で公知の方法により行うことができる。例えば、物理吸着法、化学結合法などが挙げられる。担体粒子に感作する抗体又は抗原としては、抗原抗体反応を利用して検出可能なものであれば特に限定されない。

10

【0059】

本実施形態では、免疫測定装置によって測定対象物質として抗HBs抗原が検出されているが、本発明の測定対象物質はこれに限定されない。当該分野の担体粒子を用いた免疫測定において検出される測定対象物質であれば、本発明において測定対象物質として検出することができる。例えば、癌胎児性抗原（CEA）、前立腺特異抗原（PSA）、抗HCV抗体、インシュリン、フェリチン（FRN）などを測定対象物質としてもよい。

【0060】

本実施形態の免疫測定装置1は、分析のステップにおいて、凝集度を算出しているが、本発明はこれに限定されない。例えば、図14のような「凝集度の算出」、「測定対象物質が検体に含まれるか否かの判別」を行う分析プログラムを図6の記憶部32に記憶させ、この分析プログラムに基づいて分析部33により分析処理を行うようにしてもよい。算出した凝集度に基づいて測定対象物質が検体に含まれるか否かを判別する1つの方法としては、予め凝集度に関して所定の値を設定し、この所定の値と算出される凝集度（E）とを比較して、検体に測定対象物質が含まれるか否かを判別する、という方法が挙げられる。また、図15のような「凝集度の算出」、「検量線の作成」、「検体に含まれる測定対象物質の濃度の算出」、「測定対象物質が検体に含まれるか否かの判別」を行う分析プログラムを図6の記憶部32に記憶させ、この分析プログラムに基づいて分析部33により分析処理を行うようにしてもよい。測定対象物質の濃度に基づいて測定対象物質が検体に含まれるか否かを判別する1つの方法としては、予め測定対象物質の濃度に関して所定の値を設定し、この所定の値と算出される測定対象物質の濃度（F）とを比較して、検体に測定対象物質が含まれるか否かを判別する、という方法が挙げられる。

20

30

【0061】

本実施形態の測定部6では、レーザー光源から照射されるレーザー光の進行方向に対して、直角方向に散乱する側方散乱光を受光できるように集光レンズ23、ピンホール25およびフォトマルチプライヤーチューブ27を設置しているが、本発明はこれに限定されない。内部情報を反映する散乱光を受光できる位置であれば、レーザー光の進行方向に対していずれの方向に設置してもかまわない。

【0062】

本実施形態では、側方散乱光強度および前方散乱光強度の2つの情報に基づいて担体粒子と測定対象外粒子とを識別しているが、本発明はこれに限定されない。本発明では、側方散乱光強度のみの情報に基づいて担体粒子と測定対象外粒子とを識別することも可能である。このような方法としては、例えば以下のような方法が挙げられる。まず、図16Aで示しているように、縦軸に粒子の個数（度数）を、横軸に側方散乱光強度をとったヒストグラムを作成する。上述したように、担体粒子は、測定対象外粒子と比較して密度が高い傾向にある。ゆえに、図16Aのようなヒストグラムでは、側方散乱光強度が小さい位置に測定対象外粒子が出現し、側方散乱光強度が大きい位置に担体粒子が出現する。そこで、担体粒子に対応する側方散乱光強度と測定対象外粒子に対応する側方散乱光強度の間に閾値を設定し、前記閾値より小さな範囲に分布する粒子を測定対象外粒子、前記閾値より大きな範囲に分布する粒子を担体粒子として識別することができる。なお、識別された

40

50

担体粒子の凝集度の算出は、前記の実施例と同様に、縦軸に粒子の個数（度数）を、横軸に前方散乱光強度をとったヒストグラム（図16B）に基づいて算出することができる。

【0063】

本実施形態では内部情報として、密度を反映する側方散乱光強度を用いている。また、大きさ情報として前方散乱光強度を用いている。しかし、本発明はこれに限定されない。本発明では、内部情報として高周波抵抗を、大きさ情報として直流抵抗を用いることができる。この場合、測定部には、測定用試料に含まれる粒子が通過する細孔部を設け、さらにその両側に電極を設ける。この電極間には、高周波電流および直流電流が印加されており、細孔部に粒子が通過した際に生じる高周波抵抗の変化および直流抵抗の変化を検出する。

10

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】本発明の一実施形態に関する免疫測定装置の外観を示す図である。

【図2】本発明の一実施形態に関する免疫測定装置の内部構成を示す図である。

【図3】本発明の一実施形態に関する免疫測定装置の測定用試料調製部を示す図である。

【図4】本発明の一実施形態に関する免疫測定装置の測定部を示す図である。

【図5】本発明の一実施形態に関する免疫測定装置のシースフローセル部分を示す図である。

【図6】本発明の一実施形態に関する免疫測定装置の制御部と各装置部との関係を示す図である。

20

【図7】本発明の一実施形態に関する免疫測定装置の全体制御のフローを示す図である。

【図8】本発明の一実施形態に関する分析のフローを示す図である。

【図9】本発明の一実施形態で得られるスキュッタグラムを模式的に示した図である。

【図10】本発明の一実施形態において、全血を検体として用いた場合に得られるヒストグラムを模式的に示した図である。

【図11】本発明の一実施形態の測定例において得られたスキュッタグラムである。

【図12】本発明の一実施形態の測定例において、HBsAg陰性の全血を検体として用いた場合に得られたヒストグラムである。

【図13】本発明の一実施形態の測定例において、HBsAg陽性の全血を検体として用いた場合に得られたヒストグラムである。

30

【図14】本発明の一実施形態に関する分析のフローを示す図である。

【図15】本発明の一実施形態に関する分析のフローを示す図である。

【図16】本発明の一実施形態に関して、側方散乱光強度に基づいて担体粒子を識別し、識別した担体粒子の凝集度を求める場合に作成されるヒストグラムの一例である。

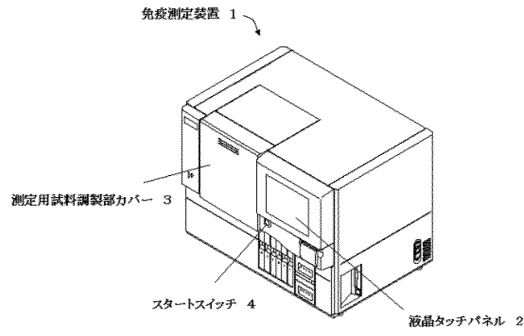
【符号の説明】

【0065】

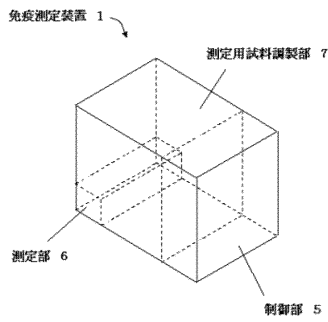
- 1 免疫測定装置
- 2 液晶タッチパネル
- 3 測定用試料調製部カバー
- 4 スタートスイッチ
- 5 制御部
- 6 測定部
- 7 測定用試料調製部
- 8 検体セット部
- 9 試薬セット部
- 10 反応部
- 11 分注装置
- 12 送液装置
- 28 シースフローセル

40

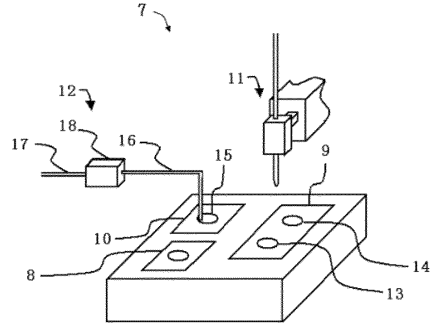
【図1】



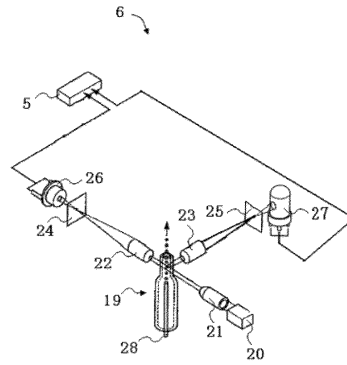
【図2】



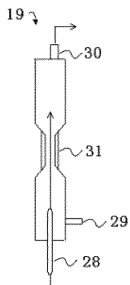
【図3】



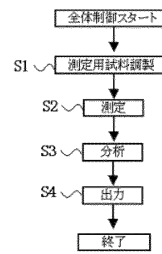
【図4】



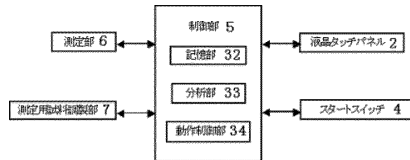
【図5】



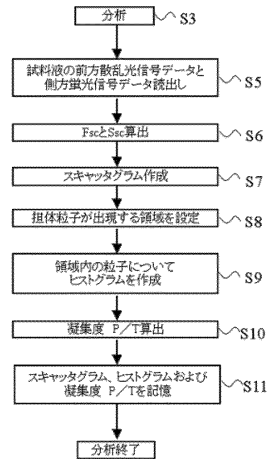
【図7】



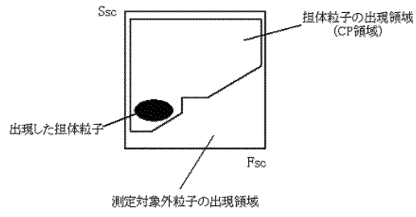
【図6】



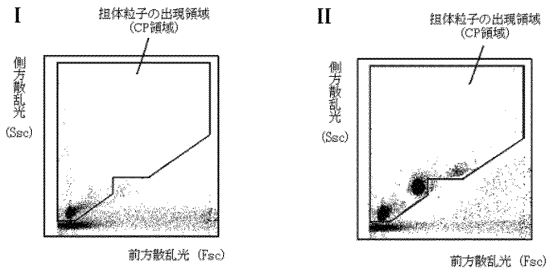
【図8】



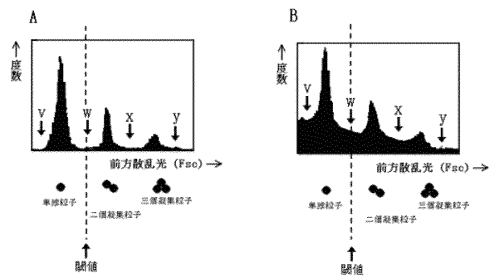
【図9】



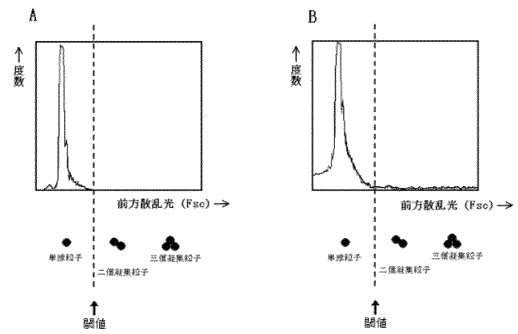
【図11】



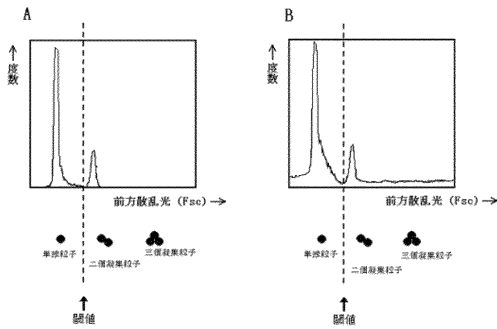
【図10】



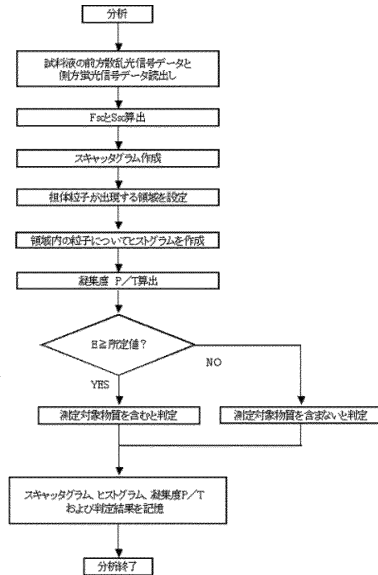
【図12】



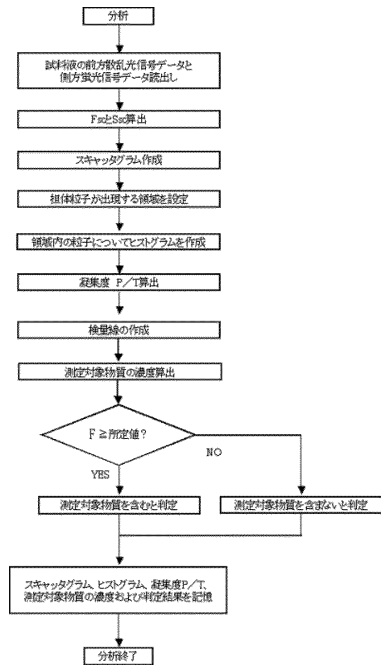
【図13】



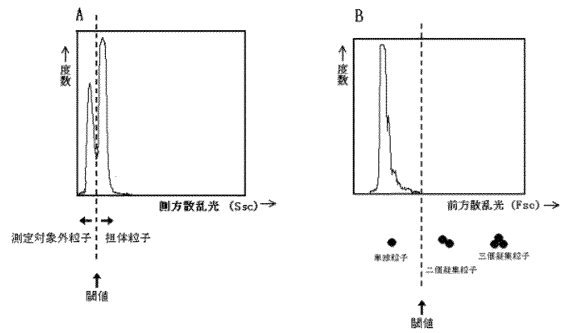
【図14】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



---

フロントページの続き

審査官 浅野 美奈

- (56)参考文献 特開2002-107365(JP,A)  
特開2000-275163(JP,A)  
国際公開第01/096868(WO,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- |      |        |
|------|--------|
| G01N | 33/543 |
| G01N | 15/14  |
| G01N | 27/06  |

专利名称(译)	免疫测定装置和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4435581B2</a>	公开(公告)日	2010-03-17
申请号	JP2004002390	申请日	2004-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
当前申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
[标]发明人	川手康德 松本輝也 大坪加代子		
发明人	川手 康德 松本 輝也 大坪 加代子		
IPC分类号	G01N33/543 G01N15/14 G01N27/06 G01N15/00 G01N15/02 G01N33/487 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/5302 G01N2015/0092 G01N2015/1493		
FI分类号	G01N33/543.587 G01N15/14.P G01N27/06.Z		
F-TERM分类号	2G060/AA07 2G060/AC02 2G060/AC10 2G060/AE17 2G060/AF02 2G060/AF07 2G060/AG11 2G060/FA01 2G060/HA01 2G060/HC10 2G060/HC22 2G060/HD03 2G060/HE01 2G060/KA06		
其他公开文献	JP2005195473A5 JP2005195473A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：使用颗粒聚集方法提供免疫测量中的免疫测量装置和方法，该方法可以测量载体颗粒聚集的程度而不受目标颗粒以外的颗粒的影响，即使不是目标颗粒的颗粒也是如此通过识别载体颗粒和除目标颗粒之外的颗粒并使用仅被识别为载体颗粒的颗粒的颗粒信息，将测量值包括在样本中。解决方案：在本发明中，将可以包括待测材料和对抗体或对抗待测材料的抗原敏感的载体颗粒的样品混合以制备用于测量的样品。从样本中包括的每个粒子检测内部信息和大小信息。基于检测到的内部信息，识别载体颗粒和除待测量的目标颗粒之外的颗粒。基于所识别的载体颗粒的尺寸信息，确定载体颗粒聚集的程度。Z

【表1】

	凝集度 (P/T%)
I-A	0.49
I-B	1.24
II-A	12.50
II-B	14.65