

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2024-40980
(P2024-40980A)

(43)公開日 令和6年3月26日(2024.3.26)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	F 2 G 0 4 3
G 0 1 N 21/21 (2006.01)	G 0 1 N 21/21	Z 2 G 0 5 9

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全15頁)

(21)出願番号	特願2022-145660(P2022-145660)	(71)出願人	000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(22)出願日	令和4年9月13日(2022.9.13)	(74)代理人	100110412 弁理士 藤元 亮輔
		(74)代理人	100104628 弁理士 水本 敦也
		(74)代理人	100121614 弁理士 平山 倫也
		(72)発明者	増村 考洋 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
		(72)発明者	掛川 法重 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

最終頁に続く

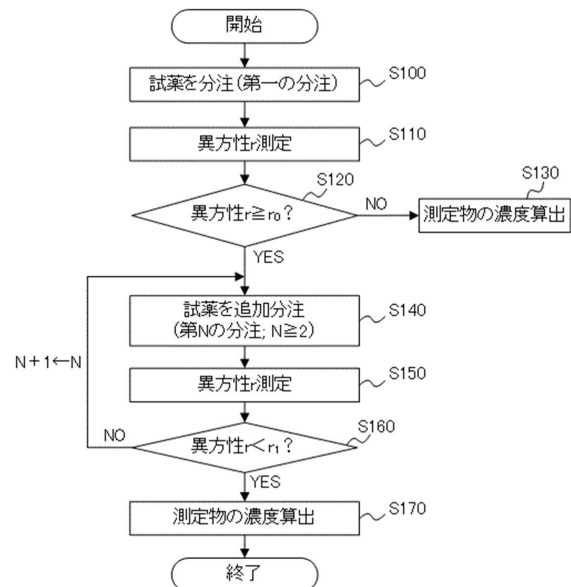
(54)【発明の名称】 測定方法、測定装置、およびプログラム

(57)【要約】

【課題】低濃度から高濃度な領域まで広範囲に測定物の濃度を高感度に分析可能な測定方法を提供する。

【解決手段】測定方法は、測定物に蛍光試薬を分注する分注ステップ(S100, S140)と、測定物と蛍光試薬とを混合した反応液に光を照射し反応液から放射される蛍光の異方性を測定する測定ステップ(S110, S150)を備え、分注及び測定ステップを実施して異方性についての第一の結果を取得し、測定ステップによる異方性と分注ステップによる蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、第一の結果から測定物の濃度を測定する第一のシーケンスと、第一のシーケンス後に分注及び測定ステップを1回以上繰り返して異方性についての第二の結果を取得し、測定ステップによる異方性と分注ステップによる蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、第二の結果から測定物の濃度を測定する第二のシーケンスを有する。

【選択図】図4



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

測定物に蛍光試薬を分注する分注ステップと、

前記測定物と前記蛍光試薬とを混合した反応液に光を照射し、前記反応液から放射される蛍光の異方性を測定する測定ステップと、を備える測定方法であって、

前記分注ステップと前記測定ステップとを実施して前記異方性についての第一の結果を取得し、前記測定ステップで測定した前記異方性と前記分注ステップで分注した前記蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、前記第一の結果から前記測定物の濃度を測定する第一のシーケンスと、

前記第一のシーケンスの後に前記分注ステップと前記測定ステップとを1回以上繰り返して前記異方性についての第二の結果を取得し、前記測定ステップで測定した前記異方性と前記分注ステップで分注した前記蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、前記第二の結果から前記測定物の濃度を測定する第二のシーケンスと、を有することを特徴とする測定方法。

10

【請求項 2】

前記測定方法は、前記第一の結果が第一の所定値未満であれば、前記第一のシーケンスにより前記測定物の濃度を測定することを特徴とする請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 3】

前記第一のシーケンスは、前記第一の結果が前記第一の所定値未満であれば、前記測定物の濃度と前記異方性の値との関係を示す第一の検量線に基づいて、前記第一の結果から前記測定物の濃度を測定することを特徴とする請求項 2 に記載の測定方法。

20

【請求項 4】

前記測定方法は、前記第一の結果が前記第一の所定値以上であれば、前記第二のシーケンスを実行することを特徴とする請求項 2 に記載の測定方法。

【請求項 5】

前記第二のシーケンスにおいて、前記異方性の値が第二の所定値未満となるまで、前記分注ステップと前記測定ステップは、繰り返し実行されることを特徴とする請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 6】

前記第二のシーケンスは、前記蛍光試薬の分注量と前記測定物の濃度との関係を示す第二の検量線に基づいて、前記第二の結果から前記測定物の濃度を測定することを特徴とする請求項 5 に記載の測定方法。

30

【請求項 7】

前記第二のシーケンスは、前記第二の検量線に基づいて、前記第二の結果と前記第二のシーケンスにおける前記蛍光試薬の分注量とから前記測定物の濃度を測定することを特徴とする請求項 6 に記載の測定方法。

【請求項 8】

前記第一のシーケンスにおける前記分注ステップでの前記蛍光試薬の分注量と、前記第二のシーケンスにおける前記分注ステップでの前記蛍光試薬の分注量は、等しいことを特徴とする請求項 1 に記載の測定方法。

40

【請求項 9】

前記第一の所定値は、前記異方性が前記測定物の濃度に対して飽和する値に基づいて設定されていることを特徴とする請求項 2 に記載の測定方法。

【請求項 10】

前記測定方法は、

前記第一の結果が第一の所定値以上であれば、前記第二のシーケンスを実行し、

前記第二のシーケンスにおいて、前記異方性の値が第二の所定値未満となるまで、前記分注ステップと前記測定ステップは繰り返し実行され、

前記第二の所定値は、前記第一の所定値以下に設定されていることを特徴とする請求項 1 に記載の測定方法。

50

【請求項 1 1】

前記第一のシーケンスでは、前記第二のシーケンスよりも相対的に低濃度な前記測定物の濃度を測定するように前記試薬の分注量が調整されていることを特徴とする請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 1 2】

測定物と蛍光試薬とを混合した反応液を収容可能な反応容器と、
前記反応容器に前記蛍光試薬を分注する分注手段と、
前記反応液に光を照射し、前記反応液から放射される蛍光の異方性を測定する測定手段と、
前記測定手段から取得される測定結果を用いて前記測定物の濃度を算出する処理手段と

10

、
前記分注手段、前記測定手段と、及び前記処理手段を制御する制御手段と、を有し、
前記制御手段は、

前記分注手段による前記蛍光試薬の分注ステップと、前記測定手段による前記異方性を測定する測定ステップとを実施して前記異方性についての第一の結果を取得し、前記測定ステップで測定した前記異方性と前記分注ステップで分注した前記蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、前記第一の結果から前記測定物の濃度を算出する第一のシーケンスと

、
前記第一のシーケンスの後に、前記分注ステップと前記測定ステップとを 1 回以上繰り返して前記異方性についての第二の結果を取得し、前記測定ステップで測定した前記異方性と前記分注ステップで分注した前記蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、前記第二の結果から前記測定物の濃度を算出する第二のシーケンスとを実行可能であることを特徴とする測定装置。

20

【請求項 1 3】

請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の測定方法をコンピュータに実行させることを特徴とするプログラム。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、測定方法に関する。

30

【背景技術】**【0002】**

抗原抗体反応を利用した検体検査方法において、蛍光の偏光特性を利用した蛍光偏光法が知られている。蛍光偏光法は、検査項目（測定物）を含む被検試料と蛍光試薬を混合した混合液（反応液）に直線偏光の励起光を照射し、反応液から放射される蛍光強度を偏光分解して測定し、偏光度（偏光異方性、或いは異方性）を評価する。特許文献 1 には、この蛍光偏光法を用いた分析装置について開示されている。この異方性の値は、測定物の回転運動に非常に敏感であり、この回転運動は測定物のサイズに依存する。一方、抗原抗体反応では、測定物（抗原）と、抗体で修飾した試薬とを混合すると、抗原と抗体が特異的に反応して結合し、凝集体が生成される。従って、異方性を測定することで、測定物のサイズの変化（凝集反応）を高感度に検出可能である。測定物のサイズ変化と測定される異方性の関係は、測定物と試薬との濃度関係に依存する。事前に既知の試薬量を用い、測定物の濃度と測定される異方性の関係を検量線として取得しておけば、異方性の測定結果から測定物の濃度を算出することが可能である。特許文献 1 には、この蛍光偏光法を用いた分析装置について開示されている。

40

【先行技術文献】**【特許文献】****【0003】**

【特許文献 1】特許第 1 6 9 2 2 5 4 号

【特許文献 2】特開 2 0 1 5 - 0 0 7 6 4 9 号公報

50

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

上記蛍光偏光法は、混合する試薬の量を最適に調整することで、非常に低濃度の測定物を高感度に測定することができる。しかし、このように高感度検出のために調整された試薬の条件では、測定可能な濃度範囲が低濃度領域に限られてしまうという課題がある。測定物の濃度がその濃度範囲を超えてしまうと、測定物の濃度に依らず異方性の値は一定値に飽和してしまい、測定物の濃度に感度を持たなくなる。反対に、高濃度領域を測定できるように試薬量を調整すると、低濃度領域での測定感度が低下する。このように、蛍光偏光法は高感度と、広い測定範囲を両立できないという課題がある。

10

【0005】

本発明は、低濃度から高濃度な領域まで広範囲に、測定物の濃度を高感度に分析可能な測定方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】**【0006】**

本発明の一側面としての測定方法は、測定物に蛍光試薬を分注する分注ステップと、前記測定物と前記蛍光試薬とを混合した反応液に光を照射し、前記反応液から放射される蛍光の異方性を測定する測定ステップと、を備える測定方法であって、前記分注ステップと前記測定ステップとを実施して前記異方性についての第一の結果を取得し、前記測定ステップで測定した前記異方性と前記分注ステップで分注した前記蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、前記第一の結果から前記測定物の濃度を測定する第一のシーケンスと、前記第一のシーケンスの後に前記分注ステップと前記測定ステップとを1回以上繰り返して前記異方性についての第二の結果を取得し、前記測定ステップで測定した前記異方性と前記分注ステップで分注した前記蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、前記第二の結果から前記測定物の濃度を測定する第二のシーケンスと、を有することを特徴とする。

20

【0007】

本発明の他の目的及び特徴は、以下の実施例において説明される。

【発明の効果】**【0008】**

本発明によれば、低濃度から高濃度な領域まで広範囲に、測定物の濃度を高感度に分析可能な測定方法を提供することができる。

30

【図面の簡単な説明】**【0009】**

【図1】 蛍光偏光測定方法の測定範囲の一例を示す図である。

【図2】 反応液中における測定物、蛍光体、及びその凝集体の状態について、異なる濃度条件で模式的に示した図である。

【図3】 第一の実施例における蛍光偏光分析装置の構成図である。

【図4】 第一の実施例における測定及び解析フローを示す図である。

【図5】 第一の分注と、追加分注における測定時間と異方性の変化を模式的に示した図である。

40

【図6】 第一の検量線、及び第二の検量線について模式的に示した図である。

【図7】 第二の実施例における蛍光偏光測定装置の構成図である。

【発明を実施するための形態】**【0010】**

以下、本発明の実施例について、図面を参照しながら詳細に説明する。各図において、同一の部材については同一の参照符号を付し、重複する説明は省略する。

（本発明の原理・課題の説明）

本発明の蛍光偏光測定方法は、ヒトなどの検体から採取された血液や尿などの被検試料に試薬を混合し、被検試料中に含まれる所望の検査項目（測定物）の濃度を測定する。試薬は蛍光体（蛍光分子）を含み、且つ蛍光体は抗体で修飾されている。この抗体は、被検

50

試料に含まれる抗原（測定物）と特異的に反応し、抗原を介して蛍光体を含む試薬（蛍光試薬）が凝集する。この凝集度合いを定量化することで、測定物の濃度を測定することができる。この定量化について、本発明の蛍光偏光測定方法では、蛍光強度の偏光依存性を測定し、偏光度（異方性）というパラメータを算出することで凝集度合いを評価する。具体的には、反応液に直線偏光の励起光を照射し、反応液から放射される蛍光について、励起光の偏光方向と平行な偏光の蛍光強度 $I_{//}$ と、励起光の偏光方向と直交する偏光の蛍光強度 I_{\perp} を測定する。この2つの測定結果を用い、以下の式（1）に従って異方性 r を算出する。

【0011】

$$r = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + 2I_{\perp}) \quad \dots (1)$$

10

或いは、以下の式（2）に従って異方性 r を算出してもよい。

【0012】

$$r = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + I_{\perp}) \quad \dots (2)$$

蛍光体では、励起光の偏光方向と蛍光分子の向き（分子軸）との相対的な関係に応じて、光が吸収、励起され、発光する。一方、蛍光体は、反応液中でブラウン運動により、回転運動、並進運動する。いま、蛍光体の発光過程において、蛍光寿命よりも蛍光体の回転が十分遅く、回転の影響が無視できれば、励起光と平行な分子軸で光が吸収されて発光する。従って、励起光と平行な偏光の蛍光強度が最も大きく測定される。反対に、蛍光寿命よりも蛍光体の回転運動が非常に高速であれば、光が吸収されてから発光するまでに蛍光体がランダムに回転しているため、測定される蛍光は無偏光になる。これらの中間の状態
20
で、蛍光寿命と回転運動とがおおよそ同じ程度であれば、蛍光体が回転しながらも、励起光の偏光方向をある程度維持したまま発光するため、測定する蛍光に偏光特性が現れる。この条件で、蛍光の異方性を測定することで、凝集反応による蛍光体の回転運動の変化を捉えることが蛍光偏光測定方法の大きな特徴である。この回転運動は、蛍光体の体積（サイズの3乗）に依存するため、蛍光体のサイズ変化に非常に敏感である。この原理を利用すれば、非常に低濃度の測定物でも高感度に反応液の凝集度合い（測定物のサイズ変化）を測定することが可能である。測定物のサイズ変化と測定される異方性 r の関係は、測定物と試薬との濃度関係に依存する。事前に既知の試薬量を用い、測定物の濃度と測定される異方性 r の関係を検量線として取得しておけば、異方性 r の測定結果から測定物の濃度を算出することが可能である。
30

【0013】

しかしながら、この異方性 r の値は上限があるため、その上限に達しない範囲で測定を行う必要がある。図1に蛍光偏光測定方法を用いて、ある測定物の濃度を測定した結果を示す。横軸は反応液中の測定物の濃度で、縦軸は異方性 r である。図1において、測定物の濃度に応じて異方性 r が変化している領域（図中の測定範囲）では、異方性 r の測定結果と測定物の濃度が1対1で対応しているため、異方性 r から測定物の濃度を算出可能である。ところが、異方性 r がある上限値 r_0 を超えると、測定物の濃度に対して異方性 r が一定の値となる（図中の飽和領域）ため、異方性の値から濃度を算出することができなくなる。つまり、異方性 r の値が、上限値 r_0 未満であれば濃度を定量可能であり、 r_0 以上であれば異方性が飽和するため濃度を測定不能となる。図1の例では、濃度の測定範囲はおおよそ2桁の範囲であることがわかる。なお、測定範囲の低濃度側の限界は、測定する蛍光強度の S/N で決まる。
40

【0014】

ここで、反応に用いる蛍光体の試薬量を調整することで測定範囲を高濃度側にシフトさせることは可能である。ただし、その場合は低濃度側の測定感度を犠牲にすることになり、蛍光偏光測定方法の特徴が活かせなくなる。

【0015】

上記異方性 r の上限は、測定される蛍光強度に対して、凝集した状態の蛍光体の発光と、凝集していないフリーな蛍光体の発光とで、どちらの寄与が大きいかによって依存する。図2は、反応液中における、測定物100と蛍光体101、及びそれらの凝集体102の状態
50

を模式的に示した図である。いま、フリーの蛍光体 101 の回転緩和時間は、蛍光体 101 の蛍光寿命よりも十分短い（回転が速い）とする。つまり、蛍光体 101 単独では、蛍光は回転の影響でほぼ無偏光となり、測定される異方性は非常に小さい。図 2 (a) は、測定物 100 よりも、試薬である蛍光体 101 の数の方が大きい状態である。このとき異方性は、フリーな蛍光体 101 からの発光と、凝集している蛍光体 102 からの発光の 2 つの寄与を足し合わせた結果になる。この状況は、図 1 に示す測定範囲の条件で、測定物 100 の濃度に応じて、測定される異方性が変化する領域となる。一方、図 2 (b) は、測定物 100 に対して、蛍光体 101 の数が少ない状態で、蛍光はほぼ凝集体 102 の状態で発光したものが測定される。このとき測定される異方性は、その条件でとり得るほぼ最大の値をとる。これが図 1 に示す飽和領域の状態である。この状態において、測定物 100 がさらに高濃度になっても、測定される蛍光は凝集体 102 から発光されることに変化はないため、異方性の値は変化しない。

10

【0016】

本発明は、図 2 (b) の状態でも測定物 100 の濃度を異方性の変化として測定することを目的とする。本発明では、図 2 (b) のような飽和領域の状態において、試薬である蛍光体 101 をさらに追加分注していく。追加された蛍光体 101 は、反応相手の測定物 100 が存在すれば凝集体 102 を生成する。この場合、測定される異方性は変化しない。さらに蛍光体 101 を追加で分注していくと、どこかで図 2 (a) のように、測定物 100 よりも蛍光体 101 の数が上回り、フリーな状態で発光する蛍光体 101 の寄与が大きくなる。つまり、測定される異方性の値が飽和値から減少していく。この異方性が飽和した値から減少に転じるまでに要する追加分の試薬量は、測定物 100 の濃度に依存する。測定物 100 が高濃度であれば、その分多くの蛍光体 101 を追加で分注することになる。従って、図 1 の飽和領域における測定物 100 の濃度は、異方性 r が飽和値である r_0 を下回るまでに要した、追加分注した試薬量（或いは、分注した全試薬量でもよい）から定量することが可能である。なお、我々は検証実験を行い、実際に前述の飽和領域においても測定物の濃度が算出可能であることを確認している。

20

【0017】

（第一の実施例）

図 3 を参照して、本発明の第一の実施例における蛍光偏光分析装置について説明する。図 3 は、本実施例の蛍光偏光分析装置 22 である。光源 70 は、試薬の蛍光体を励起する波長の光を放射する光源である。光源の波長は、蛍光体の励起波長に合わせて適宜選択することができる。例えば、波長 400 ~ 1100 nm の可視帯域から近赤外帯域の光であってもよいし、波長が 400 nm 以下の紫外帯域の光、或いは 1100 nm 以上の赤外帯域の光を用いてもよい。光源 70 として、LED やレーザーを用いることができる。本実施例では、ある程度波長幅が狭い単色光を用いることが望ましいが、必要に応じて白色光を用いてもよい。

30

【0018】

光源 70 から放射される励起光 90 は、偏光フィルタ 71 を透過して、直線偏光の励起光として、反応容器に収められた反応液 80 に入射する。反応液 80 には、図 2 に示すような、測定物を含む被検試料と、測定物と特異的に反応する抗体で修飾されている蛍光体を含む試薬とが混合されている。反応液 80 では、測定物や蛍光体のサイズや濃度、更には測定物と試薬とを混合してからの時間（反応時間）や、反応液 80 の温度などの条件に応じて凝集体が生成される。なお、反応液 80 は、被検試料と試薬とを分注した後に攪拌部（不図示）により攪拌され、反応液 80 中で測定物と試薬が一様に分散している。

40

【0019】

試薬の蛍光体は、吸収波長、発光波長、蛍光の発光効率、蛍光寿命などの特性と、測定物と特異的に反応する抗体との組み合わせも含めて適切に選択・設計することができる。特に、試薬の蛍光体は、測定物のサイズや凝集体のサイズで決まる回転緩和時間と、ほぼ同じオーダーの蛍光寿命をもつことが望ましい。

【0020】

50

反応液 80 に入射した励起光 90 は、反応液 80 中を伝搬しながら蛍光体を励起し、蛍光を発光させる。反応液 80 からは励起光 90 と蛍光 91 が放射されるが、励起光 90 は励起光カットフィルタ 72 でカットされ、蛍光 91 のみがフィルタ 72 を透過する。蛍光 91 はハーフミラー 73 によって分岐され、一方は偏光フィルタ 74 を、もう一方は偏光フィルタ 76 に入射する。偏光フィルタ 74 と 76 は、偏光フィルタ 71 の偏光面に対して、それぞれ平行および垂直となるように配置されている。従って、偏光フィルタ 74 を透過した、励起光 90 の偏光と平行な偏光成分の蛍光 92 の強度 $I_{//}$ は、検出器 75 を用いて測定される。一方、偏光フィルタ 76 を透過した、励起光 90 の偏光と直交する偏光成分の蛍光 93 の強度 I_{\perp} は、検出器 77 を用いて測定される。2 つの検出器 75、77 から得られる光強度から、式 (1) を用いて異方性 r を算出することができる。ここで、検出器 75、77 として、フォトダイオードやアバランシェフォトダイオード (APD)、或いは光電子増倍管 (PMT) などの単一センサ、または、CCD センサや CMOS センサなどのアレイセンサを用いてもよい。

10

【0021】

上記のような構成の装置を用いた本実施例における測定・解析方法を図 4 のフローを用いて説明する。図 4 は、本実施例における測定及び解析フローを示す図である。

【0022】

ステップ S100 において、測定物を含む被検試料が収められた反応容器に対して、蛍光体を含む試薬 (蛍光試薬) を規定の濃度で、ある一定量分注する (第一の分注)。分注後、攪拌部によって攪拌された後、ステップ S110 において、異方性 r を測定する。次にステップ S120 において、測定された異方性 r が異方性の飽和値 r_0 (第一の所定値) 以上であるか否かを判定する。測定結果が飽和値 r_0 未満であれば、測定物の濃度は図 1 に示す測定範囲内であるので、ステップ S130 において、第一の分注で得られた異方性の値から測定物の濃度を算出する。ここで、図 5 (a) に示すように、異方性 r を測定物と試薬とを混合してからの反応時間 T の関数として、異方性 r を複数回測定して評価してもよい。反応が十分収束したときの異方性 r_a の値を第一の分注における異方性の値とすることができる。測定結果からの測定物の濃度の算出は、事前に測定した検量線に基づいて行う。濃度が既知の測定物を含む標準試料を用い、第一の分注と同じ条件の濃度と分注量で、測定物の濃度と異方性の値との対応関係を予め測定し、この結果を第一の検量線とする。なお、この第一の検量線に基づいて、異方性 r の飽和値 r_0 を設定してもよい。なお、この飽和値 r_0 の値は、飽和領域に達するよりも十分小さい値に設定することもできる。測定濃度の変化に対して異方性の変化が十分な感度をもつように飽和値 r_0 を設定してもよい。

20

30

【0023】

ステップ S120 の判定で、測定した異方性 r が飽和値 r_0 以上である場合は、フローはステップ S140 に進み、規定の濃度、規定量の試薬を追加分注する (第 N の分注; $N \geq 2$)。ここで追加分注は、ステップ S100 の第一の分注と同じ条件 (試薬の濃度、分注する量) であってもよいし、追加分注用に設定した第一の分注とは異なる条件であってもよい。ステップ S140 の追加分注後、攪拌された反応液に対して、ステップ S150 で異方性 r を再度測定する。ステップ S160 で、測定した異方性 r が、ある所定の値 r_1 (第二の所定値) 未満か否かを判定する。この所定の値 r_1 の値は、飽和値 r_0 と同じであってもよいし、飽和値 r_0 と異なる値に設定してもよい。例えば、測定誤差による変動以上に十分低下したと判断できるように所定の値 r_1 を設定してもよい。ただし、 $r_1 < r_0$ である。ステップ S160 において、追加分注して測定した異方性 r が所定の値 r_1 未満となるまでステップ S140 ~ S150 までの処理を繰り返す。ここで、図 5 (b) に示すように、追加分注における測定においても、反応時間 T を考慮する。つまり、ステップ S140 において追加分注してから、異方性 r を反応時間 T の関数として異方性 r を測定する。反応時間 T 経過後に、ステップ S150 の測定を実行してもよい。異方性 r が所定の値 r_1 未満となれば、ステップ S170 で追加分注した試薬量から測定物の濃度を算出する。ステップ S170 においても、ステップ S130 と同様に事前 to 取得した検

40

50

量線に基づいて濃度を算出する。ただし、ステップ S 1 7 0 においては、追加分注量と測定物の濃度の関係を測定した第二の検量線を用いる。

【 0 0 2 4 】

ここで図 6 を用いてステップ S 1 3 0、及びステップ S 1 7 0 における測定物の濃度の算出方法について説明する。図 6 (a) は、ステップ S 1 3 0 で用いる第一の検量線の一例を模式的に示した図である。横軸は測定物の濃度、縦軸は第一の分注で分注する試薬量の試薬を測定物と反応させたときに測定される異方性 r の値である。第一の検量線は、前述の標準試料を用いて取得することができる。この第一の検量線を用いて測定物の濃度を定量できる範囲は、ノイズレベル以上の測定結果 r_A が得られる濃度 A から、前述の飽和値 r_0 となる濃度 B までとなる。なお、図 6 (a) に示す測定結果を適切な関数でフ
10
ィットしたものを第一の検量線として用いてもよい。次に図 6 (b) は、ステップ S 1 7 0 で用いる第二の検量線を模式的に示したものである。横軸は追加で分注した試薬量である。或いは、横軸を第一の分注で分注した試薬量も含めて、トータルの分注量としてもよい。縦軸は測定した異方性 r の値である。第二の検量線も、同様に標準試料を用いて測定
20
することができる。図 6 (b) は、測定物の濃度が 1 、 2 、 3 ($1 < 2 < 3$) のときの測定結果で、異方性 r の値が基準値 r_1 となるときの追加分注した試薬量をそれぞれ q_1 、 q_2 、 q_3 で示している。この測定結果を用い、異方性 r_1 が得られたときの分注量 q_1 から測定物の濃度 1 を求めることができる。第二の検量線としては、図 6 (b) の測定結果から、濃度 1 を分注量 q の関数で表現したデータでもよい。また、濃度
算出に用いる異方性 r を前述のように基準値 r_1 を用い、ステップ S 1 6 0 の判定には別
20
の基準 r_2 (ただし、 $r_2 < r_1$) を用いてもよい。つまり、測定結果として、基準値 r_1 を十分下回るまでの測定結果を得た上で、基準値 r_1 となる試薬の追加分注量を測定結果から推定し、その推定結果から第二の検量線を用いて濃度を算出してもよい。

【 0 0 2 5 】

また、蛍光体を追加分注していくときの追加分注量は、測定する濃度の分解能に影響する。少ない分注量で追加分注して測定すれば、測定濃度の分解能を向上させることができる。しかし、測定範囲を広げるためには分注回数 N を大きくする必要があり、反応時間も含めて測定に要する時間がかかる。従って、飽和領域における測定物の濃度は、測定したい分解能と測定時間とのバランスを考慮して決めればよい。なお、追加分注量は、必ずしも第一の分注の分注量と等しくなくてもよい。また、追加分注の分注量をそれぞれ独立に
30
変えることも可能である。さらに、測定物の濃度範囲が事前にわかっているならば、それに
応じて第一の分注の分注量、及び追加分注の分注量を設定してもよい。

【 0 0 2 6 】

ここで、本実施例における蛍光偏光分析装置 2 2 は、図 3 に示す構成に限定されるものではない。例えば、本実施例における蛍光偏光分析装置 2 2 は、図 3 に示すように、反応液 8 0 に入射する励起光 9 0 の透過方向に放射する蛍光 9 1 を測定している。しかし、励起光 9 0 の進行方向に対して 9 0 度直交した方向で反応液 8 0 から放射される蛍光 9 1 を測定してもよい。或いは、任意の角度で蛍光 9 1 を測定してもよい。

【 0 0 2 7 】

また、蛍光 9 1 を偏光分解して測定する構成において、強度 $I_{//}$ と強度 I_{\perp} とを測定
40
できれば、本実施例の蛍光偏光測定方法を適用することができる。例えば、ハーフミラー 7 3 による分岐を省き、励起光側と蛍光側で 1 対の偏光フィルタ (例えば、フィルタ 7 1 と 7 4) を用い、偏光フィルタ 7 4 を回転させることで、時分割で平行強度 $I_{//}$ 、直交
強度 I_{\perp} を測定してもよい。

【 0 0 2 8 】

なお、本実施例に示す蛍光偏光測定方法は、測定物に対して、蛍光体のサイズ及び蛍光寿命を適切に設定すれば非常に低濃度の測定物に対して高感度に測定することが可能である。この低濃度領域で高感度な特徴を最大限に活用するために、第一の分注における試薬の分注量を、前述の装置構成の条件において、最も低濃度な測定物を測定できる測定限界に合わせ調整することが望ましい。例えば、低濃度の測定物で感度を得るためには、蛍
50

光試薬を測定限界近くまで微量に調整する。このように第一の分注量を調整した上で、第一の分注で測定できない濃度領域の測定物に対しては、本実施例におけるステップ S 1 4 0 ~ S 1 7 0 までの追加分注のステップを実施することが望ましい。これにより、低濃度の測定物に最大限の感度を保持したまま、高濃度領域まで広い測定範囲を実現することができる。

【 0 0 2 9 】

このように本実施例では、蛍光偏光測定方法は、分注ステップ (S 1 0 0) と測定ステップ (S 1 1 0) とを実施して第一の結果 (S 1 2 0 ~ S 1 3 0) を取得する第一のシーケンス (S 1 0 0 ~ S 1 3 0) を有する。更に、蛍光偏光測定方法は、この第一のシーケンスの後に、分注ステップ (S 1 4 0) と測定ステップ (S 1 5 0) とを少なくとも 1 回以上繰り返して第二の結果 (S 1 6 0 ~ S 1 7 0) を取得する第二のシーケンス (S 1 4 0 ~ S 1 7 0) を有する。第一のシーケンスでは、第一の結果である異方性 r が第一の所定値 r_0 未満であれば、第一のシーケンスでの異方性 r と蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、第一の結果から測定物の濃度を測定する。具体的には、第一のシーケンスでは、第一の結果である異方性 r が第一の所定値 r_0 未満であれば、第一の結果から、第一の検量線に基づいて測定物の濃度を算出する (S 1 3 0)。一方、第一の結果が第一の所定値 r_0 以上であれば (S 1 2 0)、第二のシーケンス (S 1 4 0 ~ S 1 7 0) が実行される。第二のシーケンスでは、第二のシーケンスでの異方性 r と蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、第二の結果から測定物の濃度を測定する。具体的には、第二のシーケンスでは、第二の結果である異方性 r を取得し、第二の結果と追加分注した試薬量から、第二の検量線に基づいて測定物の濃度を算出する (S 1 7 0)。

10

20

【 0 0 3 0 】

(第二の実施例)

次に本発明の第二の実施例について説明する。図 7 は、本実施例における蛍光偏光測定方法を搭載した自動分析装置 1 0 (蛍光偏光測定装置) の構成図である。自動分析装置 1 0 は、特開 2 0 1 5 - 0 0 7 6 4 9 号公報にも開示されているように、分析部 2 0 と、分析部 2 0 を制御する制御部 3 0 (制御手段) とを有する。制御部 3 0 は、測定部 2 2 (測定手段) における測定フローを制御し、測定部 2 2 から出力される信号を受け取り、処理部 4 0 (処理手段) およびメモリ 5 0 を制御して、データの転送・処理・保存を実行する。また自動分析装置 1 0 は、処理部 4 0 で処理された結果を表示する表示部 6 0 を備える。

30

【 0 0 3 1 】

分析部 2 0 は、回転移動可能なディスク 2 1 と、ディスク 2 1 の円周上に複数配置された反応容器 2 3 とを備える。測定部 2 2 は、第一の実施例で示した図 3 の構成であって、回転移動しながら測光位置を通過した反応容器 2 3 に対して、蛍光の異方性を測定する。また分析部 2 0 は、標準試料や測定物等のサンプルを反応容器 2 3 に分注する分注部 2 4、サンプルに含まれる測定物と反応する試薬を分注する第一の分注部 2 5 (分注手段)、および、試薬を追加分注するための追加分注部 2 6 (分注手段) を備える。また分析部 2 0 は、サンプルと試薬を混合した混合液を攪拌する攪拌部 2 7 と、測定を終えた混合液を反応容器 2 3 から吸引して反応容器 2 3 内を洗浄・乾燥する洗浄乾燥部 2 8 とを備える。従って、自動分析装置 1 0 は、サンプル・試薬の分注、攪拌、測定、吸引・洗浄・乾燥までの一連のフローについて、ディスク 2 1 を回転させながら連続的に行うことが可能である。なお、反応容器 2 3 は恒温槽内に収められており、反応液の温度は一定に保たれている。

40

【 0 0 3 2 】

上述の装置構成において、図 4 に示す測定フローに従い、測定部 2 2 は、第一の分注部 2 5 で分注 (S 1 0 0) された試薬を混合した反応液に対して、異方性の測定 (S 1 1 0) を行う。そして、処理部 4 0 は、データ処理してステップ S 1 2 0 の判定及びステップ S 1 3 0 の処理を行う。また、ステップ S 1 4 0 の追加分注は、追加分注部 2 6 により行われ、測定部 2 2 は異方性の測定 (S 1 5 0) を行う。処理部 4 0 は、データ処理してス

50

ステップ S 1 6 0 の判定及びステップ S 1 7 0 の処理を実行する。測定 (S 1 1 0 、 S 1 5 0) は、反応容器 2 3 が測定部 2 2 を通過するタイミングで、反応時間 T の関数としてディスク 2 1 の回転中に複数回実行され、異方性が評価される。第一の分注の分注量や、追加分注の分注量などの測定条件は、測定前にメモリ 5 0 に保存されており、制御部 3 0 が図 4 の測定フローに従い、必要に応じて測定条件をメモリ 5 0 から読み出す。なお、追加分注部 2 6 は第一の分注部 2 5 が兼ねてもよい。

【 0 0 3 3 】

本実施例の自動分析装置は、第一の実施例と同様に、分注ステップ (S 1 0 0) と測定ステップ (S 1 1 0) とを実施して第一の結果 (S 1 2 0 ~ S 1 3 0) を取得する第一のシーケンス (S 1 0 0 ~ S 1 3 0) を実行する。第一のシーケンスでは測定した異方性 r (第一の結果) が第一の所定値 r_0 未満であれば、第一のシーケンスでの異方性 r と蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、第一の結果から測定物の濃度を測定する。具体的には、第一のシーケンスでは、測定した異方性 r (第一の結果) が第一の所定値 r_0 未満であれば、第一の結果から、第一の検量線に基づいて測定物の濃度を算出する (S 1 3 0) 。一方、自動分析装置は、第一の結果が第一の所定値 r_0 以上であれば (S 1 2 0) 、第二のシーケンス (S 1 4 0 ~ S 1 7 0) を実行する。第二のシーケンス (S 1 4 0 ~ S 1 7 0) は、第一のシーケンスの後に、分注ステップ (S 1 4 0) と測定ステップ (S 1 5 0) とを 1 回以上繰り返して第二の結果 (S 1 6 0 ~ S 1 7 0) を取得するシーケンスである。第二のシーケンスでは、第二のシーケンスでの異方性 r と蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、第二の結果から測定物の濃度を測定する。具体的には、第二のシーケンスでは、得られた異方性 r (第二の結果) と追加分注した試薬量から、第二の検量線に基づいて測定物の濃度を算出する (S 1 7 0) 。

【 0 0 3 4 】

以上、本発明に係る実施形態を例示的な実施形態を参照して説明したが、本発明が上述の実施形態に限定されないことを理解すべきである。添付の特許請求の範囲の範囲は、そのような変形並びに同等の構造及び機能をすべて含むように最も広い意味での解釈とみなされるべきである。

【 0 0 3 5 】

(その他の実施例)

本発明は、上述の実施例の 1 以上の機能を実現するプログラムを、ネットワーク又は記憶媒体を介してシステム又は装置に供給し、そのシステム又は装置のコンピュータにおける 1 つ以上のプロセッサがプログラムを読み出し実行する処理でも実現可能である。また、1 以上の機能を実現する回路 (例えば、ASIC) によっても実現可能である。

【 0 0 3 6 】

以上、本発明の好ましい実施形態について説明したが、本発明はこれらの実施形態に限定されたものではなく、その要旨の範囲内で様々な変形、及び変更が可能である。

【 0 0 3 7 】

上記各実施例の開示は、以下の方法および構成を含む。

(方法 1)

測定物に蛍光試薬を分注する分注ステップと、

前記測定物と前記蛍光試薬とを混合した反応液に光を照射し、前記反応液から放射される蛍光の異方性を測定する測定ステップと、を備える測定方法であって、

前記分注ステップと前記測定ステップとを実施して前記異方性についての第一の結果を取得し、前記測定ステップで測定した前記異方性と前記分注ステップで分注した前記蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、前記第一の結果から前記測定物の濃度を測定する第一のシーケンスと、

前記第一のシーケンスの後に前記分注ステップと前記測定ステップとを 1 回以上繰り返して前記異方性についての第二の結果を取得し、前記測定ステップで測定した前記異方性と前記分注ステップで分注した前記蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、前記第二の結果から前記測定物の濃度を測定する第二のシーケンスと、を有することを特徴とする測定

方法。

(方法 2)

前記測定方法は、前記第一の結果が第一の所定値未満であれば、前記第一のシーケンスにより前記測定物の濃度を測定することを特徴とする方法 1 に記載の測定方法。

(方法 3)

前記第一のシーケンスは、前記第一の結果が前記第一の所定値未満であれば、前記測定物の濃度と前記異方性の値との関係を示す第一の検量線に基づいて、前記第一の結果から前記測定物の濃度を測定することを特徴とする方法 2 に記載の測定方法。

(方法 4)

前記測定方法は、前記第一の結果が前記第一の所定値以上であれば、前記第二のシーケンスを実行することを特徴とする方法 2 または 3 に記載の測定方法。

10

(方法 5)

前記第二のシーケンスにおいて、前記異方性の値が第二の所定値未満となるまで、前記分注ステップと前記測定ステップは、繰り返し実行されることを特徴とする方法 1 から 4 のいずれかに記載の測定方法。

(方法 6)

前記第二のシーケンスは、前記蛍光試薬の分注量と前記測定物の濃度との関係を示す第二の検量線に基づいて、前記第二の結果から前記測定物の濃度を測定することを特徴とする方法 5 に記載の測定方法。

(方法 7)

20

前記第二のシーケンスは、前記第二の検量線に基づいて、前記第二の結果と前記第二のシーケンスにおける前記蛍光試薬の分注量とから前記測定物の濃度を測定することを特徴とする方法 6 に記載の測定方法。

(方法 8)

前記第一のシーケンスにおける前記分注ステップでの前記蛍光試薬の分注量と、前記第二のシーケンスにおける前記分注ステップでの前記蛍光試薬の分注量は、等しいことを特徴とする方法 1 から 7 のいずれかに記載の測定方法。

(方法 9)

前記第一の所定値は、前記異方性が前記測定物の濃度に対して飽和する値に基づいて設定されていることを特徴とする方法 2 から 4 のいずれかに記載の測定方法。

30

(方法 10)

前記測定方法は、

前記第一の結果が第一の所定値以上であれば、前記第二のシーケンスを実行し、

前記第二のシーケンスにおいて、前記異方性の値が第二の所定値未満となるまで、前記分注ステップと前記測定ステップは繰り返し実行され、

前記第二の所定値は、前記第一の所定値以下に設定されていることを特徴とする方法 1 から 9 のいずれかに記載の測定方法。

(方法 11)

前記第一のシーケンスでは、前記第二のシーケンスよりも相対的に低濃度な前記測定物の濃度を測定するように前記試薬の分注量が調整されていることを特徴とする方法 1 から 10 のいずれかに記載の測定方法。

40

(構成 1)

測定物と蛍光試薬とを混合した反応液を収容可能な反応容器と、

前記反応容器に前記蛍光試薬を分注する分注手段と、

前記反応液に光を照射し、前記反応液から放射される蛍光の異方性を測定する測定手段と、

前記測定手段から取得される測定結果を用いて前記測定物の濃度を算出する処理手段と、

前記分注手段、前記測定手段と、及び前記処理手段を制御する制御手段と、を有し、

前記制御手段は、

50

前記分注手段による前記蛍光試薬の分注ステップと、前記測定手段による前記異方性を測定する測定ステップとを実施して前記異方性についての第一の結果を取得し、前記測定ステップで測定した前記異方性と前記分注ステップで分注した前記蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、前記第一の結果から前記測定物の濃度を算出する第一のシーケンスと

、
 前記第一のシーケンスの後に、前記分注ステップと前記測定ステップとを1回以上繰り返して前記異方性についての第二の結果を取得し、前記測定ステップで測定した前記異方性と前記分注ステップで分注した前記蛍光試薬の分注量との関係に基づいて、前記第二の結果から前記測定物の濃度を算出する第二のシーケンスとを実行可能であることを特徴とする測定装置。

(構成2) 方法1から11のいずれかに記載の測定方法をコンピュータに実行させることを特徴とするプログラム。

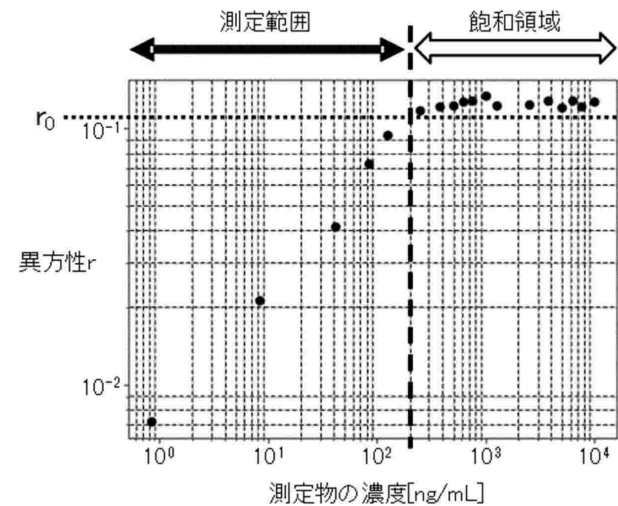
【符号の説明】

【0038】

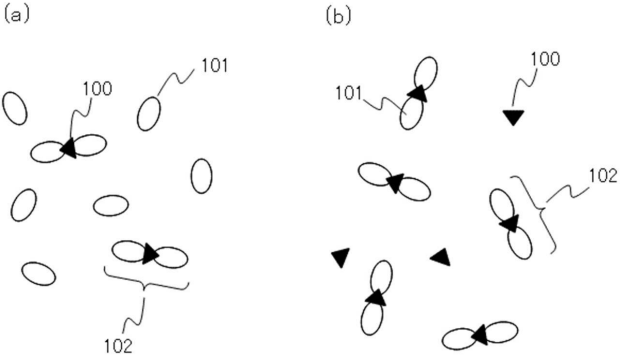
- 23 反応容器
- 25 分注手段
- 22 測定手段
- 40 処理手段
- 30 制御手段

【図面】

【図1】



【図2】



10

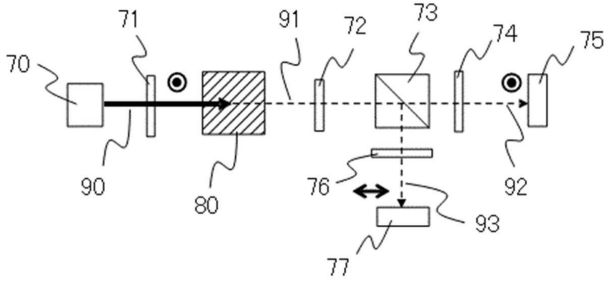
20

30

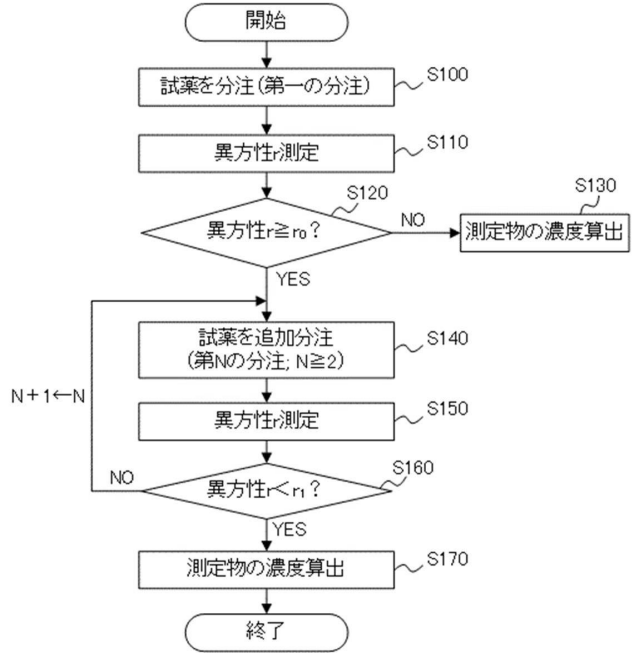
40

50

【 図 3 】



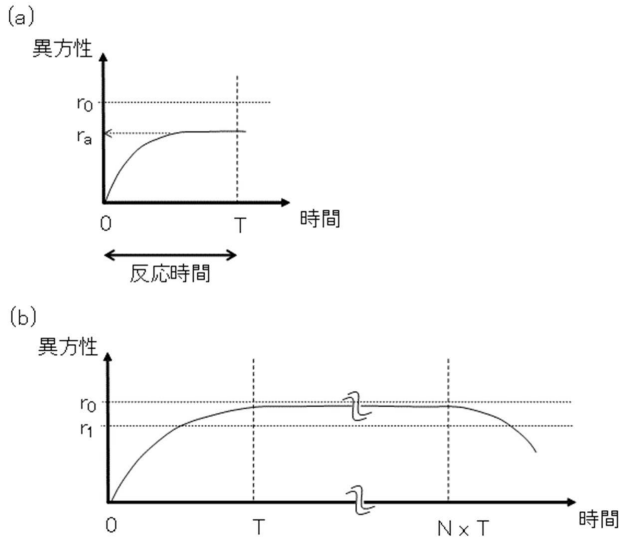
【 図 4 】



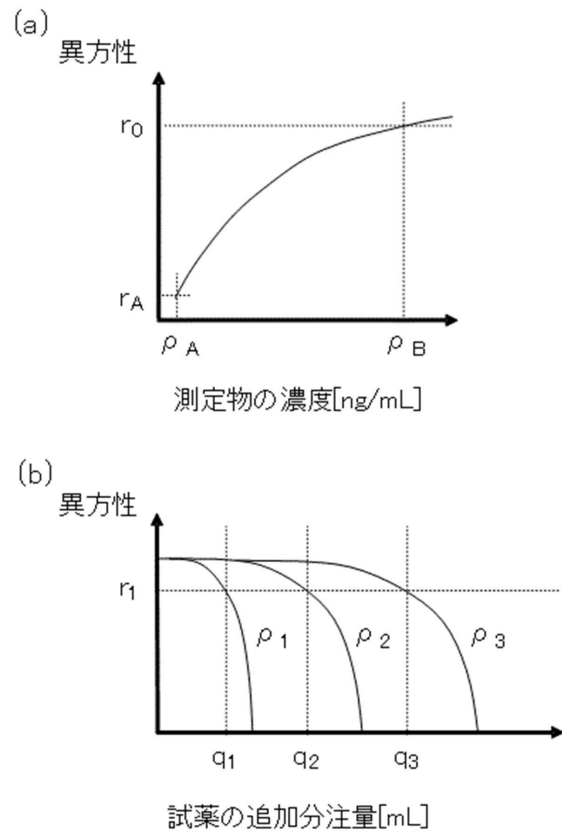
10

20

【 図 5 】



【 図 6 】

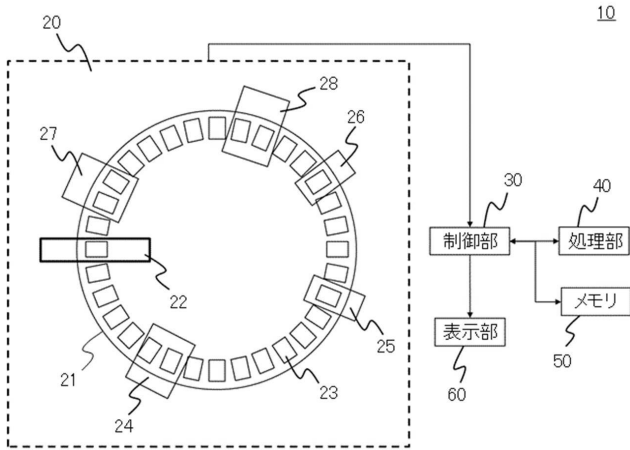


30

40

50

【図7】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA04 DA02 EA01 HA09 JA03 KA01 KA02 KA03
KA09 LA02 LA03 NA01
2G059 AA01 BB13 CC16 DD03 EE05 EE07 FF12 GG01 GG02 GG04
HH01 HH02 HH03 JJ03 KK02 KK03 KK04 MM01