(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3645023号
(P3645023)
(45)発行日　平成17年5月11日(2005.5.11)　(24)登録日　平成17年2月10日(2005.2.10)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
G01N 33/52	G01N	33/52	Z
G01N 33/53	G01N	33/53	X
G01N 35/00	G01N	35/00	A

請求項の数 6　(全 22 頁)

(21)出願番号　特願平8-18299
(22)出願日　平成8年1月9日(1996.1.9)
(65)公開番号　特開平9-189695
(43)公開日　平成9年7月22日(1997.7.22)
審査請求日　平成14年9月6日(2002.9.6)

(73)特許権者　000005201
富士写真フイルム株式会社
神奈川県南足柄市中沼２１０番地
(74)代理人　100082223
弁理士　山田　文雄
(74)代理人　100094282
弁理士　山田　洋資
(72)発明者　平井　希久生
埼玉県朝霞市泉水３丁目１１番４６号　富士写真フイルム株式会社内
(72)発明者　牧野　快彦
埼玉県朝霞市泉水３丁目１１番４６号　富士写真フイルム株式会社内

審査官　竹中　靖典

最終頁に続く

(54)【発明の名称】試料分析方法、検量線の作成方法及びそれを用いる分析装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

既知濃度の被検物を含有する標準試料中の被検物濃度とその分析測定値とから求めた検量線を用いて、試料中の被検物を定量分析する試料分析方法において、

前記検量線は、少なくとも

(a)多次関数で表現される低濃度領域の検量線部分；

(b)指数関数で表現される中間濃度領域の検量線部分；および

(c)多次関数で表現される高濃度領域の検量線部分；

に分割されており、これら各濃度領域の境界では隣接する２つの検量線部分の傾きが等しくなっていることを特徴とする試料分析方法。

【請求項２】

既知濃度の被検物を含有する標準試料中の被検物濃度とその分析測定値とから検量線の回帰関数を作成する検量線回帰関数作成方法において、

(a)低濃度領域の検量線部分を多次関数で表現し；

(b)中間濃度領域の検量線部分を指数関数で表現し；

(c)高濃度領域の検量線部分を多次関数で表現し；

(d)各濃度領域の境界条件として、隣接する２つの検量線部分の境界点での傾きが等しいとして、各濃度領域の検量線部分の関数を定める；

ことを特徴とする検量線回帰関数作成方法。

【請求項３】

前記低濃度領域及び高濃度領域の検量線部分を表現する多次関数は２次関数であることを特徴とする請求項２の検量線回帰関数作成方法。

【請求項４】

既知濃度の被検物を含有する複数の標準試料中の被検物濃度とその分析測定値とを直交座標系にプロットした検量線の回帰関数を作成する検量線回帰関数作成方法において、以下のステップからなることを特徴とする検量線回帰関数作成方法：

(a) 標準試料の各濃度（p_i）とその各分析測定値（q_i）の対数値（log q_i）とを直交座標系にプロットし、この片対数グラフにおいてその直線部分を構成する中間濃度領域（p_1～p_2）を求め、

(b) この中間濃度領域（p_1～p_2）の検量線部分を

$Y = \exp(b \cdot X + d)$

すなわち

$X = (\ln Y - d) / b$　　・・・・(1)

Y：分析測定値（q_i）（光学密度またはその他の物理量）

X：標準試料中の被検物の濃度（p_i）

ｂ、ｄ：係数

で表現する一方、

低濃度領域（最小濃度の標準試料の濃度p_0から濃度p_1まで）の検量線部分を、

$X = e \cdot Y^2 + f \cdot Y + g$　　・・・・(2)

e、f、g：係数

高濃度領域（濃度p_2から最大濃度の標準試料の濃度p_3まで）の検量線部分を、

$X = l \cdot Y^2 + m \cdot Y + n$　　・・・・(3)

l、m、n：係数

でそれぞれ表現し、

(c) 座標（p_1, q_1）において式(1)の微分値（dX/dY）が式(2)の微分値（dX/dY）と等しく、また座標（p_2, q_2）において式(2)の微分値（dX/dY）が式(3)の微分値（dX/dY）と等しいことを、境界条件として設定し、

(d) 式（1),(2),(3)の各係数を算出し、これにより全濃度領域（p_0からp_3）を連続する検量線回帰関数を求める。

【請求項５】

既知濃度の被検物を含有する複数の標準試料中の被検物濃度とその分析測定値とを直交座標系にプロットした検量線の回帰関数を作成する検量線回帰関数作成方法において、以下のステップからなることを特徴とする回帰関数作成方法：

(a) 標準試料の各濃度（p_i）とその各分析測定値（q_i）の対数値（log q_i）とを直交座標系にプロットした場合に、この片対数グラフにおいてその直線部分を構成する中間領域の両端の濃度にそれぞれ最も近接する濃度（p_1, p_2）を有する標準試料の濃度範囲を予め中間濃度領域と定義して、この中間濃度領域（p_1～p_2）の検量線部分を

$Y = \exp(b \cdot X + d)$

すなわち

$X = (\ln Y - d) / b$　　・・・・(1)

Y：分析測定値（（q_i）光学密度またはその他の物理量）

X：標準試料中の被検物の濃度（p_i）

b、d：係数

で表現する一方、

低濃度領域（最小濃度の標準試料の濃度p_0から濃度p_1まで）の検量線部分を、

$X = e \cdot Y^2 + f \cdot Y + g$　　・・・・(2)

e、f、g：係数

高濃度領域（濃度p_2から最大濃度の標準試料の濃度p_3まで）の検量線部分を、

$X = l \cdot Y^2 + m \cdot Y + n$　　・・・・(3)

l、m、n：係数

でそれぞれ表現し、
(b) 座標（p_1, q_1）において式(1)の微分値（dX/dY）が式(2)の微分値（dX/dY）と等しく、また座標（p_2, q_2）において式(2)の微分値（dX/dY）が式(3)の微分値（dX/dY）と等しいことを、境界条件として設定し、
(c) 式（1),(2),(3)の各係数を算出し、これにより全濃度領域（p_0からp_3）を連続する検量線回帰関数を求める。
【請求項６】
既知濃度の被検物を含有する標準試料中の被検物濃度とその分析測定値とから求めた検量線を用いて、試料中の被検物を定量分析する試料分析装置において、以下のものを備える試料分析装置：
1) 入力手段：複数の標準試料の被検物濃度（p_i）とその分析測定値（q_i）を入力する；
2) 演算手段：入力された濃度（p_i）とその分析測定値（q_i）に基づき以下のステップ(a)～(c)の演算を行う；
(a) 中間濃度領域（p_1～p_2）（中間濃度領域は、標準試料の各濃度（p_i）とその各分析測定値（q_i）の対数値（log q_i）とを直交座標系にプロットした場合に、この片対数グラフにおいてその直線部分を構成する中間領域の両端の濃度にそれぞれ最も近接する濃度（p_1, p_2）有する標準試料の濃度範囲により定義される）の検量線部分を
$Y = \exp(b \cdot X + d)$
すなわち
$X = (\ln Y - d) / b$ ・・・・(1)
Y：分析測定値（q_i）（光学密度またはその他の物理量）
X：標準試料中の被検物の濃度（p_i）
b、d：係数
で表現する一方、
低濃度領域（最小濃度の標準試料の濃度p_0から濃度p_1まで）の検量線部分を、
$X = e \cdot Y^2 + f \cdot Y + g$ ・・・・(2)
e、f、g：係数
高濃度領域（濃度p_2から最大濃度の標準試料の濃度p_3まで）の検量線部分を、
$X = l \cdot Y^2 + m \cdot Y + n$ ・・・・(3)
l、m、n：係数
でそれぞれ表現し、
(b) 座標（p_1, q_1）において式(1)の微分値（dX/dY）が式(2)の微分値（dX/dY）と等しく、また座標（p_2, q_2）において式(2)の微分値（dX/dY）が式(3)の微分値（dX/dY）と等しいことを、境界条件として設定し、
(c) 式（1),(2),(3)の各係数を算出し、これにより全濃度領域（p_0～p_3）を連続する検量線回帰関数を求める；
3) 検量線作成手段：
試料中の被検物を定量分析するのに使用する前記検量線を、前記演算手段で求められた検量線回帰関数に基づき作成する。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、試料分析方法、これに使用する検量線の回帰関数の作成方法、及びそれを用いた試料分析装置に関する。詳しくはシグモイド状の検量線を使用する試料分析方法において、この検量線の全濃度領域にわたって精度のよい検量線回帰関数を作成する方法に関するものである。
【０００２】
【発明の背景】
液体試料中の被検成分（アナライト）の定量分析では、適当な化学的または酵素的反応などにより、その分析測定値（吸光度、透過光学濃度または反射光学濃度などの光学密度や

、その他の測定された物理量、あるいはこれらを示すシグナル）から被検物濃度を求めることが行われている。このとき、既知濃度の標準試料を予めアッセイしておいて、その被検物濃度と分析測定値（光学濃度など）の対応関係をプロットして検量線（標準曲線ともいう）を作成しておき、この検量線を使って被検物の濃度を決めている。この検量線が定量測定域において直線性の高いものであれば、定量測定域上限付近、下限付近及び中間域の比較的少ない数の標準試料を用意すれば、検量線を作成することができる。

【０００３】

しかし、例えばエンザイムイムノアッセイ（ＥＩＡ）等の免疫反応における検量線などのように、一般に直線とはならない検量線も多く存在する。イムノアッセイでは、測定の基本となる抗原抗体結合反応が質量作用の法則に従って可逆的に反応するため、その検量線はＳ字状のシグモイド曲線となることが多い。このようなシグモイド曲線の検量線は、酵素と酵素基質との複合体形成により酵素－基質間の結合常数が変化する酵素反応系や、調節機能が働くアロステリック酵素反応系などでも見られる現象でもある。またエンザイムイムノアッセイでは、その検量線の形状が測定系の種類と反応条件により容易に変化しうる。また超微量分析法であるため測定データのばらつきが比較的多い。このためエンザイムノアッセイでは、アッセイの度に、定量測定域全体をカバーする多数の標準試料を調製し、これを分析測定して検量線を作成しなければならなかった。

【０００４】

しかし、迅速性、経済性、簡便性が要求される臨床検査の分野では、できるだけ少ない数の標準試料で精度の高い検量線を作成できることが望まれている。このため、検量線の回帰式を求め、これにより、少ない標準試料の測定値から検量線を作成しようとする試みが従来よりなされている。

【０００５】

検量線の回帰モデルには、大きく理論式と経験式があるが、このうち理論式は実際に適用できる場合が少ないこと並びに通常複雑な非線形関数となり統計学的取扱いがきわめて困難であることから、経験式が用いられることが多い。経験式は大別すると、検量線全体に１つのモデルを当てはめる方法（非分割法：non-split-plot experiment)と、検量線を幾つかに部分に分割して回帰する方法（分割法：split-plot experiment）とに分けることができる。分割法には、検量線の各２点間を直線で補間していく方法（多点間直線補間法：linear interporation method）や、各点間を互いの連続性を保ちながら３次多項式を当てはめ平滑化していく方法（スプライン関数平滑化法：fitting method by spline function）などがあるが、いずれも多数の実測点がなければＳ字型曲線の検量線にはフィットよく当てはめることはできない。

【０００６】

非分割法には、ロジスティック（logistic）曲線による回帰法、ロジット－ログ（logit-log）変換式による回帰法、直角双曲線を用いる方法、シグモイド状の検量線に３次多項式あるいはより高次の多項式をあてはめる方法などがある。このうち直角双曲線を用いる回帰法は、Ｓ字状の検量線を表現することはできない。

【０００７】

ロジスティック（logistic）曲線はＳ字状曲線に対する経験式として以前から知られていたものであり、現在広く用いられているのは次の数式１の４係数ロジスティック（logistic）曲線である（Rodbard et al.: Statistical analysis of radioimmunoassays and immunoradiometric (labeled antibody) assays. A generalized, weighted, iterative, least-squares method for logistic curve fitting. Symposium on RIA and Related Procedures in Medicine, p165, Int. Atomic Energy Agency, Vienna, 1974)。

【０００８】

【数１】

$$y = \frac{a - d}{1 + (x/c)^b} + d$$

【０００９】
ここで、ｘ：濃度、
ｙ：分析測定値（光学密度などのデータ）
a,b,c,d：係数
【００１０】
このロジスティック（logistic）曲線は、図１に示すようにシグモイド状の曲線となり、その中央の直線状部分のみならず、その両端部の曲線部、さらにその外側の漸近線状部分も確保できるので、少ない実測点すなわち少数の標準試料で得られる検量線のモデルとして優れている。しかしロジスティック曲線を表現する上記数式１が非線形であるため、この数式を回帰するには反復最小２乗法が必要となり、統計学的処理が煩雑である。また抗原量（濃度ｘ）０及び無限大（∞）の時の反応値（シグナル、後述する本発明の実施例ではΔＯＤ）を精密に求める必要があり、抗原量無限大（∞）の実測点を得るために大過剰抗原を含有した標準試料を用意し、これを管理しなければならない。しかし、これは、通常抗原（被検物）量の標準試料を調製、管理する場合に比べ、実際にはきわめて困難である。またイムノアッセイでは、抗体に対して過剰量の抗原が存在する場合には、フック（hook）効果（prozone effectともいう）によって、シグナルが変化し検量線が極大値（または極小値）を持つことがある。このような場合には、抗原量無限大のシグナルを得ることができない。
【００１１】
ロジット－ログ（logit-log）変換は、検量線の縦軸（反応値）をロジット変換、横軸（濃度:dose）を対数変換するもので次の数式２の簡単な１次多項式により、Ｓ字状曲線を直線化することができる（Rodbard et al.: Rapid calculation of radioimmunoassay results. J. Lab. Clin. Med., 74, p770, 1969）。
【００１２】
【数２】

$$Y = a + bX$$

$$\left[\begin{array}{ll} Y = \text{logit } y = \log \dfrac{y}{1-y} & ; \quad y = \dfrac{B_X - N}{B_0 - N} \\ X = \log x & ; \quad x = \text{"dose"} \end{array}\right]$$

【００１３】
ここでB_0、B_Xはそれぞれ濃度０、xにおける反応値、Ｎは無限大濃度における反応値である。この式の回帰は簡単な最小２乗法で容易に行える点で前述のロジスティック曲線よりも優れている。しかしこのロジット－ログ（logit-log）変換でも、濃度０の時のシグ

ナルB_0、濃度無限大の時のシグナルＮをそれぞれ正確に測定しなければ直線からの偏りが多くなるという欠点がある。できるだけ少ない実測点で検量線を設定するのは困難である。

【００１４】

従来多く行われている方法は、シグモイド状の検量線を３次多項式で近似する方法である。この方法はＳ字状曲線の一部分のみを検量線として用いる場合には有効であるが、Ｓ字状曲線の中央の直線状部分のみならず、その両端部の曲線部、さらに外側の漸近線状部分の一部まで検量線として使用する場合には、全領域にわたってフィットさせることができない。すなわちＳ字状曲線の中央部で精度を上げようとすれば両端領域の精度が下がり、また曲線の両端領域も検量線として使用しようとすれば中間濃度領域での精度をある程度犠牲にしなければならなかった。これは標準試料の実測点を多くしても変わらず、検量線全体に１つのモデル（関数）を当てはめる方法には限界があった。

【００１５】

【発明の目的】

本発明は、以上のような事情に鑑みなされたものであり、低濃度領域、中間濃度領域、高濃度領域のいずれの濃度領域でも精度の高い被検物の定量分析を可能にする試料分析方法を提供することを第１の目的とする。

【００１６】

また本発明は、少ない数の標準試料を用いて低濃度領域、中間濃度領域、高濃度領域にわたる広範囲の濃度領域のいずれでも精度の高い検量線を簡便かつ迅速に作成することができる検量線回帰関数作成方法を提供することを第２の目的とする。

【００１７】

さらに本発明は、この検量線を簡便かつ迅速に作成して、広い範囲の濃度領域において試料中の被検物を高精度に定量分析することができる分析装置を提供することを第３の目的とする。

【００１８】

【発明の構成】

このような本発明の第１の目的は、既知濃度の被検物を含有する標準試料中の被検物濃度とその分析測定値とから求めた検量線を用いて、試料中の被検物を定量分析する試料分析方法において、前記検量線は、少なくとも

(a)多次関数で表現される低濃度領域の検量線部分；
(b)指数関数で表現される中間濃度領域の検量線部分；および
(c)多次関数で表現される高濃度領域の検量線部分；

に分割されており、これら各濃度領域の境界では隣接する２つの検量線部分の傾きが等しくなっていることを特徴とする試料分析方法、により達成される。

【００１９】

また本発明の第２の目的は、既知濃度の被検物を含有する標準試料中の被検物濃度とその分析測定値とから検量線の回帰関数を作成する検量線回帰関数作成方法において、

(a)低濃度領域の検量線部分を多次関数で表現し；
(b)中間濃度領域の検量線部分を指数関数で表現し；
(c)高濃度領域の検量線部分を多次関数で表現し；
(d)各濃度領域の境界条件として、隣接する２つの検量線部分の境界点での傾きが等しいとして、各濃度領域の検量線部分の関数を定めることを特徴とする検量線回帰関数作成方法、により達成される。

【００２０】

低濃度領域及び高濃度領域の検量線部分を表現する多次関数は２次関数とすることが、この部分の関数を回帰するのに用いる実測点（標準試料）の数を少なくする上で便宜である。またこのように実測点を少なくしても、隣接する中間濃度領域との境界条件により連続性が保たれるので精度の低下は少ない。ただし、低濃度領域、高濃度領域の検量線パターンによっては、３次或いはそれより高次の整次関数で表現してもよい。

【００２１】
低濃度領域及び高濃度領域の検量線部分を表現する多次関数は２次関数とした場合には、以下の各ステップで検量線の回帰関数を作成することができる。
(a) 標準試料の各濃度（p_i）とその各分析測定値（q_i）の対数値（log q_i）とを直交座標系にプロットし、この片対数グラフにおいてその直線部分を構成する中間濃度領域（p_1～p_2）を求め、
(b) この中間濃度領域（p_1～p_2）の検量線部分を
$Y=\exp(b\cdot X+d)$
すなわち
$X=(\ln Y-d)/b$　　・・・・(1)
Y：分析測定値（q_i）（光学密度またはその他の物理量）
X：標準試料中の被検物の濃度（p_i）
b、d：係数
で表現する一方、
低濃度領域（最小濃度の標準試料の濃度p_0から濃度p_1まで）の検量線部分を、
$X=e\cdot Y^2+f\cdot Y+g$　　・・・・(2)
e、f、g：係数
高濃度領域（濃度p_2から最大濃度の標準試料の濃度p_3まで）の検量線部分を、$X=l\cdot Y^2+m\cdot Y+n$　　・・・・(3)
l、m、n：係数
でそれぞれ表現し、
(c) 座標（p_1, q_1）において式(1)の微分値（dX/dY）が式(2)の微分値（dX/dY）と等しく、また座標（p_2, q_2）において式(2)の微分値（dX/dY）が式(3)の微分値（dX/dY）と等しいことを、境界条件として設定し、
(d) 式（1),(2),(3)の各係数を算出し、これにより全濃度領域（p_0からp_3）を連続する検量線回帰関数を求める。
【００２２】
なお、指数関数で表現される中間濃度領域（p_1～p_2）を求めるステップ(a)は、その後に続くステップ(b),(c),(d)と必ずしも一緒に行わなくてもよい。すなわち、個々のアッセイキットあるいは分析装置ごとに、予め当該被検物を測定する際に指数関数で表現することが可能な中間濃度領域を求めておき、この中間濃度領域の両端濃度（またはこれに近接する濃度）の範囲を中間濃度領域（p_1～p_2）と設定しておいてもよい。この場合にはこの予め設定された中間濃度領域両端の濃度p_1、p_2を有する標準試料を、個々のアッセイキットまたは分析装置ごとに供給・配布することになる。従って、この場合の本発明の検量線回帰曲線作成方法は次のステップからなる方法と言い換えることができる。
【００２３】
(a) 標準試料の各濃度（p_i）とその各分析測定値（q_i）の対数値（log q_i）とを直交座標系にプロットした場合に、この片対数グラフにおいてその直線部分を構成する中間領域の両端の濃度にそれぞれ最も近接する濃度（p_1, p_2）を有する標準試料の濃度範囲を予め中間濃度領域と定義して、この中間濃度領域（p_1～p_2）の検量線部分を
$Y=\exp(b\cdot X+d)$
すなわち
$X=(\ln Y-d)/b$　　・・・・(1)
Y：分析測定値（q_i）（光学密度またはその他の物理量）
X：標準試料中の被検物の濃度（p_i）
b、d：係数
で表現する一方、
低濃度領域（最小濃度の標準試料の濃度p_0から濃度p_1まで）の検量線部分を、
$X=e\cdot Y^2+f\cdot Y+g$　　・・・・(2)
e、f、g：係数

高濃度領域（濃度p_2から最大濃度の標準試料の濃度p_3まで）の検量線部分を、
$X = l \cdot Y^2 + m \cdot Y + n$ ・・・・(3)
l、m、n：係数
でそれぞれ表現し、
(b) 座標（p_1, q_1）において式(1)の微分値（dX/dY）が式(2)の微分値（dX/dY）と等しく、また座標（p_2, q_2）において式(2)の微分値（dX/dY）が式(3)の微分値（dX/dY）と等しいことを、境界条件として設定し、
(c) 式（1),(2),(3)の各係数を算出し、これにより全濃度領域（p_0からp_3）を連続する検量線回帰関数を求める。

【００２４】

本発明の第３の目的は、既知濃度の被検物を含有する標準試料中の被検物濃度とその分析測定値とから求めた検量線を用いて、試料中の被検物を定量分析する試料分析装置において、以下のものを備える試料分析装置：
1) 入力手段：複数の標準試料の被検物濃度（p_i）とその分析測定値（q_i）を入力する；
2) 演算手段：入力された濃度（p_i）とその分析測定値（q_i）に基づき以下のステップ(a)～(c)の演算を行う：
(a) 中間濃度領域（p_1～p_2）（中間濃度領域は、標準試料の各濃度（p_i）とその各分析測定値（q_i）の対数値（log q_i）とを直交座標系にプロットした場合に、この片対数グラフにおいてその直線部分を構成する中間領域の両端の濃度にそれぞれ最も近接する濃度（p_1, p_2）有する標準試料の濃度範囲により定義される）の検量線部分を
$Y = \exp(b \cdot X + d)$
すなわち
$X = (\ln Y - d) / b$ ・・・・(1)
Y：分析測定値（q_i）（光学密度またはその他の物理量）
X：標準試料中の被検物の濃度（p_i）
b、d：係数
で表現する一方、
低濃度領域（最小濃度の標準試料の濃度p_0から濃度p_1まで）の検量線部分を、
$X = e \cdot Y^2 + f \cdot Y + g$ ・・・・(2)
e、f、g：係数
高濃度領域（濃度p_2から最大濃度の標準試料の濃度p_3まで）の検量線部分を、
$X = l \cdot Y^2 + m \cdot Y + n$ ・・・・(3)
l、m、n：係数
でそれぞれ表現し、
(b) 座標（p_1, q_1）において式(1)の微分値（dX/dY）が式(2)の微分値（dX/dY）と等しく、また座標（p_2, q_2）において式(2)の微分値（dX/dY）が式(3)の微分値（dX/dY）と等しいことを、境界条件として設定し、
(c) 式（1),(2),(3)の各係数を算出し、これにより全濃度領域（p_0～p_3）を連続する検量線回帰関数を求める；
3) 検量線作成手段：
試料中の被検物を定量分析するのに使用する前記検量線を、前記演算手段で求められた検量線回帰関数に基づき作成する：
により達成される。

【００２５】

【原理及び実施態様の説明】

「発明の背景」の項で述べたように、シグモイド状検量線全体を１つの関数のみで表現して、全濃度領域にわたって高い精度を確保しようとするのは困難である。きわめて複雑な関数を設定すれば可能であるかもしれないが、その場合には求める係数が多くなり、その結果測定すべき標準試料が多く必要になる。

【００２６】

本発明ではシグモイド状曲線を描く検量線を、低濃度領域、中間濃度領域、高濃度領域の３つに分割し、それぞれを異なる関数で表現している。このように関数を変えると、通常、その境界領域では精度が急激に変わることになる。これを防ぐため本発明では両関数の境界条件として、その境界点（接点）で接線が同じになる、すなわち傾きが等しいことを取り入れた。これを数学的に表現すれば境界点において隣接する両関数の微分値が互いに等しいということになる。この境界条件により、両関数は滑らかにつながり、両関数間で精度が大きく変動することがなくなった。また境界条件が設定されたことにより、各濃度領域の関数を規定する係数を求めるために必要な実測点（すなわち標準試料の数）は、少なくとも１つ減らすことができる。

【００２７】

また本発明では、シグモイド状検量線の中央部分には指数関数で表現されうる濃度領域があるという本発明者の知見に基づき、この中央部分を中間濃度領域として指数関数で表現・回帰させることにした。指数関数を片対数グラフにプロットすれば直線になることから理解できるように、この中間濃度領域では２つの実測点（標準試料）があれば、その対応する指数関数が一義的に決まる。使用する実測点（標準試料）の濃度を中間濃度領域の両末端濃度（あるいはこれに近接する濃度）にすれば、この実測点の（濃度、分析値）を隣接する低濃度領域及び高濃度領域の境界点として併用することができる。その結果、検量線全体の回帰関数を求めるのに必要な実測点（標準試料）は、さらに少ないものとすることができる。

【００２８】

シグモイド状検量線の中央部分が指数関数で表現されることについて、以下説明する。後述の実施例１で使用したＣＲＰ（C-reactive protein)分析用乾式分析要素を用いて、この分析要素の発色のバラツキ（C.V. (%)）を調べた。すなわちこの分析要素に、各種濃度のＣＲＰ含有標準試料液を点着し、37℃に保って、ＰＥＴ支持体側から650nmの反射光学濃度を測定した。点着から４分後及び６分後の反射光学濃度の差（ΔOD_{6-4}：本明細書及び添付図面ではdOD_{6-4}、または$dODr$とも表示される場合がある）を測定した。各濃度につき５０回測定をし、その平均値（$dOD_{ave.}$）、標準偏差（S.D.）並びにC.V.(＝（S.D.／$dOD_{ave.}$）×100）を求めた。以下の表１の結果が得られた。なお同じＣＲＰ濃度の欄は異なる日に行った実験の結果を併記したものである。

【００２９】

【表１】

CRP濃度 (mg/dL)	$dOD_{ave.}$	S.D.	C.V. (%)
1.0	0.2536	0.0083	3.3
1.8	0.2027	0.0064	3.2
10.1	0.0828	0.0031	3.7
17.0	0.0730	0.0023	3.2
1.7	0.2326	0.0065	2.8
1.7	0.2336	0.0057	2.4
2.6	0.2096	0.0052	2.5
2.6	0.2136	0.0064	3.0
4.3	0.1767	0.0062	3.5
4.3	0.1728	0.0053	3.1
平均	3.1		

【００３０】
ＣＲＰ濃度にかかわらず、C/V.(%)は、ほぼ一定（３％程度）であった。$dOD_{ave.}$と標準偏差（S.D.）の間には図２に示すように高い相関性が認められる。
【００３１】
また上記測定で得られたdOD_{6-4}を用いて描いた検量線を作り、この検量線から、各試料中のＣＲＰ濃度を分析し、その分析値（濃度）の標準偏差（S.D.)を求めたところ、次の表２、図３のような結果が得られた。少なくとも10mg/dLぐらいまでは、ＣＲＰ濃度にかかわらずＣＲＰ濃度測定値の標準偏差はほぼ一定（約0.25程度）であった。
【００３２】
【表２】

ＣＲＰ濃度 (mg/dL)	S.D. (mg/dL)
1.8	0.28
10.1	0.23
17.0	0.18
1.7	0.25
1.7	0.22
2.6	0.27
2.6	0.27
4.3	0.32
4.3	0.28
平均	0.25

【００３３】
ＣＲＰ濃度に関わらず、dＯＤrのバラツキ（C.V.）と、検量線から読みとられたＣＲＰ濃度分析値の標準偏差（S.D.）とがほぼ一定になることから、この条件下で可能な検量線の関数を考える。
【００３４】
ｘ：ＣＲＰ濃度、ｙ：dＯＤrに対し、
Ｆ：検量線関数、Ｇ：ＣＲＰ濃度分析値のS.D. 性能関数をそれぞれ設定すると、あるＣＲＰ濃度（x_0）におけるdＯＤr（y_0）について、検量線関数は、
$y_0 = F(x_0)$
となる。前述したように、dＯＤrのC.V.は一定なので、dＯＤr＝y_0の時のdＯＤrの標準偏差（S.D.）はα・y_0となる（α：一定値、ここでは前述の約0.03）。
【００３５】
検量線関数（F）の微分関数（F')を考えると、あるＣＲＰ濃度（x_0）におけるＣＲＰ濃度（測定値）のS.D.、とdＯＤr（＝y_0）のS.D.の関係は

$$F'(x_0) = [y_0\text{におけるdODrのS.D.}] / [x_0\text{におけるCRP濃度測定値のS.D.}]$$
$$= \alpha \cdot y_0 / G(x_0)$$

となる。
【００３６】
今、G(x)にS.D.性能関数を代入すれば、微分方程式としてF(x)を解くことができる。今、表２、図３の結果からG(x)＝0.25とすると、表１、図２の結果からα＝0.03（％表示のC.V.では3%）であるから、
$F'(x_0) = 0.03 \cdot F(x) / 0.25$
すなわち、
$F'(x_0) / F(x) = 0.03 / 0.25 = \text{constant}$
となる。一般化すれば係数b、dを用いて、

$F(x)=\exp(b\cdot X+d)$

となる。従って、ＣＲＰ分析用の検量線の基本骨格は「指数関数」で表現されることがわかった。

【００３７】

このようにシグモイド状検量線の少なくとも一部（実際には中間濃度領域）では、指数関数で表現できることが理解できる。本発明では、この中間濃度領域をはさむ低濃度領域及び高濃度領域を多次関数で表現し、その境界条件として境界点での傾き（微分値）を等しいことを条件にして、全濃度領域をカバーする検量線の回帰関数を作成することができる。以下、低濃度領域及ぶ高濃度領域を２次関数で表現する場合について、本発明の検量線回帰関数作成方法をくわしく説明する。

【００３８】

図４に典型的なシグモイド状検量線の概略図を示す。横軸に濃度Ｘ、縦軸に分析測定値Ｙ（例えば実施例におけるdＯＤr）をとる。図５は縦軸を分析測定値Ｙの対数値にしたものである。ここでは便宜上、A_0、A_1、A_2、A_3の４点の実測点をプロットする。p_0,p_1,p_2,p_3は各試料の濃度であり、q_0,q_1,q_2,q_3は分析測定値である。A_1～A_2の区間II（中間濃度領域(p_1～p_2））は図５に示される片対数グラフ上で直線部分を構成し、この間は指数関数で表現することができる。区間Ｉ（低濃度領域（p_0～p_1））、区間III（高濃度領域（p_2～p_3））をそれぞれ２次関数で表現すれば、各区間について以下のようになる。

【００３９】

区間II（中間濃度領域）：

$Y=\exp(b\cdot X+d)$

すなわち

$X=(\ln Y-d)/b$ ・・・・(1)

ｂ、ｄ：係数

区間Ｉ（低濃度領域）：

$X=e\cdot Y^2+f\cdot Y+g$ ・・・・(2)

e、f、g：係数

区間III（高濃度領域）：

$X=l\cdot Y^2+m\cdot Y+n$ ・・・・(3)

l、m、n：係数

【００４０】

区間IIでは、検量線はA_1（p_1,q_1）、Ａ２（p_2,q_2）を通るから、

$$b=(\ln q_2-\ln q_1)/(p_2-p_1)=\ln(q_2/q_1)/(p_2-p_1)\cdot\cdot(4)$$

$$d=\ln q_2-b\cdot p_2$$

$$=\ln q_2-[(\ln q_2-\ln q_1)/(p_2-p_1)]\cdot p_2$$

$$=(p_2\cdot\ln q_1-p_1\cdot\ln q_2)/(p_2-p_1)\quad\cdot\cdot\cdot(5)$$

となり、係数ｂ、ｄは容易に求められる。

【００４１】

次に区間Ｉ（低濃度領域）の各係数を求める。区間Ｉと区間IIの境界条件として、その境界点A_1（p_1,q_1）での傾き、すなわち微分値（dX/dY）が等しいとする。式(1)を微分して、

$dX/dY=1/(b\cdot Y)$ ・・・(6)

式(2)を微分して、

$dX/dY=2e\cdot Y+f$ ・・・(7)

境界点A_1（p_1,q_1）での式(6),(7)が等しい値を取るから、

$1/(b\cdot q_1)=2e\cdot q_1+f$ ・・・(8)

となる。一方、区間Ｉでは式(2)の２次曲線がＡ（p_0,q_0）、A_1（p_1,q_1）を通るから、

$p_0=e\cdot q_0^2+f\cdot q_0+g$ ・・・(9)

$p_1 = e \cdot q_1^2 + f \cdot q_1 + g$ ・・・(10)
両式の差を取って、

$$p_1 - p_0 = e(q_1^2 - q_0^2) + f(q_1 - q_0)$$
$$= (q_1 - q_0)[e(q_1 + q_0) + f]$$

両辺を$(q_1 - q_0)$で除すると、
$(p_1 - p_0)/(q_1 - q_0) = e(q_1 + q_0) + f$ ・・・(11)
式(8),(11)より、

$$1/\underline{(b \cdot q_1)} - (p_1 - p_0)/(q_1 - q_0) = 2e \cdot q_1 - e(q_1 + q_0)$$
$$= e(q_1 - q_0)$$

よって、
$e = [1/\underline{(b \cdot q_1)} - (p_1 - p_0)/\underline{(q_1 - q_0)}] / (q_1 - q_0)$ ・・・(12)式(8)より係数fは、
$f = 1/\underline{(b \cdot q_1)} - 2e \cdot q_1$ ・・・・(13)
となり、式(12)から求められる係数eの値と、式(4)から求められた係数bの値を入れれば定まる。
最後の係数gは式(9)より
$g = p_0 - e \cdot q_0^2 - f \cdot q_0$ ・・・・(14)
と求めることができる。
【００４２】
区間III（高濃度領域：$A_2 - A_3$）についても同様に、係数l、m、nを求めることができる。すなわち境界点A_2（p_2, q_2）において、式(3)の微分
$dX/dY = 2 \cdot l \cdot Y + m$ ・・・(15)
が、式(6)の$dX/dY = 1/b \cdot Y$と等しいから
$1/\underline{(b \cdot q_2)} = 2 \cdot l \cdot q_2 + m$ ・・・(16)
となる。一方、区間IIIでは式(3)の２次曲線がA_2（p_2, q_2）、A_3（p_3, q_3)を通るから、
$p_2 = l \cdot q_2^2 + m \cdot q_2 + n$ ・・・(17)
$p_3 = l \cdot q_3^2 + m \cdot q_3 + n$ ・・・(18)
両式の差を取って、
$p_3 - p_2 = l \cdot (q_3^2 - q_2^2) + m(q_3 - q_2) = (q_3 - q_2)[l \cdot (q_3 + q_2) + m]$
両辺を$(q_3 - q_2)$で除すると、
$(p_3 - p_2)/(q_3 - q_2) = l \cdot (q_3 + q_2) + m$ ・・・(19)
式(16)から式(19)を引いて、

$$1/\underline{(b \cdot q_2)} - (p_3 - p_2)/(q_3 - q_2) = 2 \cdot l \cdot q_2 - l \cdot (q_3 + q_2)$$
$$= l \cdot (q_2 - q_3)$$

よって、係数lは以下のようになる。
$l = [1/\underline{(b \cdot q_2)} - (p_3 - p_2)/(q_3 - q_2)] / (q_2 - q_3)$ ・・・(20)
係数mは、式(16)より、
$m = 1/\underline{(b \cdot q_2)} - 2 \cdot l \cdot q_2$ ・・・・(21)
係数nは、式(17)より
$n = p_2 - l \cdot q_2^2 - m \cdot q_2$ ・・・・(22)
と求めることができる。
【００４３】
以上まとめると、
区間Ｉ（低濃度領域：$p_0 \leqq X \leqq p_1$、$q_0 \geqq Y \geqq q_1$）に対し、
$X = e \cdot Y^2 + f \cdot Y + g$
区間II（中間濃度領域：$p_1 \leqq X \leqq p_2$、$q_1 \geqq Y \geqq q_2$）に対し、
$X = (\ln Y - d) / b$
区間III（高濃度領域：$p_2 \leqq X \leqq p_3$、$q_2 \geqq Y \geqq q_3$）に対し:

$X = l \cdot Y^2 + m \cdot Y + n$

各係数は、

$b = (\ln q_2 - \ln q_1) / (p_2 - p_1) = \ln(q_2/q_1) / (p_2 - p_1)$

$d = \ln q_2 - b \cdot p_2 = (p_2 \cdot \ln q_1 - p_1 \cdot \ln q_2) / (p_2 - p_1)$

$e = [1/(b \cdot q_1) - (p_1 - p_0)/(q_1 - q_0)] / (q_1 - q_0)$

$f = 1/(b \cdot q_1) - 2e \cdot q_1$

$g = p_0 - e \cdot q_0^2 - f \cdot q_0$

$l = [1 / (b \cdot q_2) - (p_3 - p_2)/(q_3 - q_2) / (q_2 - q_3)$

$m = 1/(b \cdot q_2) - 2 \cdot l \cdot q_2$

$n = p_2 - l \cdot q_2^2 - m \cdot q_2$

となる。

【００４４】

以上のように、本発明ではシグモイド状曲線を描く検量線を、多次関数で表現した低濃度領域の検量線部分、指数関数で表現した中間濃度領域の検量線部分、多次関数で表現した高濃度領域の検量線部分の３つに分割し、その境界点での傾きが等しいことを境界条件として、各濃度領域の検量線の回帰関数を求めた。このため、検量線を得るために測定する標準試料の数が少なくてすみ、しかも全濃度領域にわたって精度の高い検量線を得ることができる。

【００４５】

なお、このようにして求められた検量線回帰関数は、低濃度領域の関数を求めるために使用した最小濃度（p_0）よりも下の濃度についても、また高濃度領域の関数を求めるために称した最大濃度（p_3）よりも高い濃度領域についても、実用的には使用できる。

【００４６】

次に本発明の検量線回帰関数作成方法を用いた分析装置について説明する。図６はこの分析装置の基本構成を示したブロック図である。符号１０は測定手段であり、被検物を含む試料を酵素的或いは化学的反応によりその被検物量（濃度、または活性）に応じたシグナル（光学密度、或いは電気信号などの何らかの物理量）を測定・検出する。例えば実施例で述べるように、試料が点着された乾式分析要素の反射光学濃度を測定する。得られたシグナル（測定データ）は入力手段１２に入力され、この測定データから計算された分析値（濃度）が出力手段１４により出力される。

【００４７】

１６は検量線回帰関数を演算する演算手段であり、１８は本発明の検量線作成方法のアルゴリズムや分析装置の動作プログラムを記憶したＲＯＭ（フロッピーディスク、ハードディスク、光磁気ディスクなどの記録媒体でもよい）である。すなわち演算手段１６は、標準試料の分析測定値（シグナル）が入力手段から入力されると、この分析測定値を受け取り、ＲＯＭ１８に記憶されたプログラムに基づいて検量線回帰関数を演算する。なお既知濃度として与えられる標準試料中の被検物濃度は入力手段１２により入力されるが、キーボードや磁気読み取り手段などの別の入力装置により入力してもよい。２０は演算手段１６で求められた回帰曲線に基づき検量線を作成する検量線作成手段であり、ここで作成された検量線はＲＡＭ２２（フロッピーディスク、ハードディスク、光磁気ディスクなどの記録媒体でもよい）に記録される。

【００４８】

検量線作成の後、分析対象である試料の分析測定値が入力手段１２から入力されると、出力手段１４は、試料の分析測定値（測定データとしてのシグナル）をＲＡＭ２２に記憶された検量線と参照して、試料中の被検物濃度を算定し出力する。

【００４９】

図７は、この分析装置における検量線作成のためのフローチャート図である。まず各種濃度の標準試料（レベル０、１、２、３）をそれぞれ複数の乾式分析要素に点着し、その反射光学濃度を測定手段１０により測定する。その測定分析値（dＯＤr)が入力されると（ステップ１００）、各レベルの標準試料の分析測定値にバラツキがないかを調べる（ステ

ップ１０２）。すなわち各レベルの標準液の測定データの標準偏差（S.D.）が、予め設定したしきい値を越えるものであれば、バラツキが多いとして以下の動作をストップする。例えば標準液が点着されていなかった分析要素があった場合や、標準液が非均一的なものであった場合などが、これに相当する。なお、各レベルの測定データの最小値または最大値を示すデータの取り除くことにより、測定データの標準偏差がしきい値以内に収まる場合には、当該データを取り除いて残りのデータを有効なものとして以下の工程に進んでもよい。

【００５０】

各レベルの測定データのバラツキがしきい値以下と判定されると、次に、感度チェックがなされる（ステップ１０４）。ここでは、各レベルの測定データ（dODr）の平均値が、例えば[レベル０の測定データq_0]＞[レベル１の測定データq_1]＞[レベル２の測定データq_2]＞[レベル３の測定データq_3]のように予想される順番通りとなっているかチェックする。この順番通りになっていない場合には、標準試料を取り間違えている可能性があるので、検量線作成を中止する。

【００５１】

ステップ１０４をクリアーしたら、各レベルの表示値p_i（既知濃度）と測定データq_i（dODr）を用いて、本発明の検量線作成方法に従い各レベル間の検量線を求める（ステップ１０６）。すなわち、X：濃度、Y：dODrに関して、

$q_0 \geqq Y \geqq q_1$で、　$X = e \cdot Y^2 + f \cdot Y + g$

$q_1 \geqq Y \geqq q_2$で、　$X = (\ln Y - d) / b$

$q_2 \geqq Y \geqq q_3$で、　$X = l \cdot Y^2 + m \cdot Y + n$

を設定し、各係数、

$b = (\ln q_2 - \ln q_1) / (p_2 - p_1) = \underline{\ln(q_2/q_1)} / (p_2 - p_1)$

$d = \ln q_2 - b \cdot p_2 = (p_2 \cdot \ln q_1 - p_1 \cdot \ln q_2) / (p_2 - p_1)$

$e = [1/\underline{(b \cdot q_1)} - (p_1 - {}_0)/\underline{(q_1 - q_0)}] / (q_1 - q_0)$

$f = 1/\underline{(b \cdot q_1)} - 2e \cdot q_1$

$g = p_0 - e \cdot {q_0}^2 - f \cdot q_0$

$l = [1/\underline{(b \cdot q_2)} - (p_3 - p_2)/(q_3 - q_2)] / (q_2 - q_3)$

$m = 1/\underline{(b \cdot q_2)} - 2 \cdot l \cdot q_2$

$n = p_2 - l \cdot {q_2}^2 - m \cdot q_2$

を計算する。

【００５２】

求められた係数から、低濃度領域（$q_0 \geqq Y \geqq q_1$）の及び高濃度領域（$q_2 \geqq Y \geqq q_3$）での検量線関数の検定を行う（ステップ１０８）。すなわち、$q_0 > -f/2 \cdot e > q_1$となる場合には、低濃度領域の回帰関数$X = e \cdot Y^2 + f \cdot Y + g$は、$q_0$から$q_1$の間に極値（極大値）を持つことになり、同じ測定データ（Y）に対して２つの濃度（X）を示すので、検量線として使用することはできない。

【００５３】

同様に、$q_2 > -m/2 \cdot l > q_3$となる場合には、高濃度領域の回帰関数$X = l \cdot Y^2 + m \cdot Y + n$は、$q_2$から$q_3$の間に極値（極小値）を持つことになり、この区間の検量線として使用することはできない。以上のいずれにも該当しないとき、検量線は良と判断される。

【００５４】

ステップ１０８の検定にパスした後、得られた回帰関数は検量線作成手段２０に送られ、ここで検量線が作成され（ステップ１１０）、ＲＡＭ２２に記憶される。分析対象である試料の測定データが入力されたときには、出力手段はＲＡＭ２２に記憶された検量線を参照して試料中の被検物濃度を求め、これを出力する。

【００５５】

なお、上記各ステップで検量線作成の動作が中止される場合には、分析装置に組み込まれた、または付属のディスプレイ装置または異常表示装置（いずれも図６に図示せず）に、異常（エラー）である旨の表示をするように構成することができ、むしろそのような構成

の分析装置が好ましい。なおこのようなディスプレイ装置、異常表示装置は公知の方法のものを使用できる。

【００５６】

【実施例１】

ＣＲＰ分析用乾式分析要素を用いて、本発明に従い検量線回帰関数を作成した。使用したＣＲＰ分析要素は特開平4-128655の実施例２に記載されているものを用いた。この分析要素は透光性支持体の上に試薬層、接着層、編物布地からなる展開層を順次積層したもので、展開層にはアミラーゼ－抗ＣＲＰ・ＩｇＧ結合物及び標識酵素アミラーゼに対する基質カルボキシルメチル化澱粉が含浸されている。試薬層には、基質カルボキシルメチル化澱粉の分解生成物を検出する指示薬組成物が含有されている。具体的には以下のように作製した。

【００５７】

(1) 酵素標識抗体の合成

(1-1)ＣＨＭ化アミラーゼの作製

バチルス・ズブチリスアミラーゼ 5mgをpH6.3 の 0.1Mグリセロ燐酸１mLに溶かし、[4-(マレイミドメチル）シクロヘキサン-1- カルボン酸］スクシンイミドエステル（ＣＨＭＳ）2mg/mLのＤＭＦ溶液 100μLを加えて室温で、１時間反応させた。この反応液をセファデックスＧ-25カラムにアプライして、pH6.3 の 0.1Mグリセロ燐酸を流して素通り分画を分取、 4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸アミド化アミラーゼ（ＣＨＭ化アミラーゼ）を得た。

【００５８】

(1-2)抗ＣＲＰ・マウスIgＧＦ$(ab')_2$の作製

抗ＣＲＰ・マウスIgG10mg（0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)2mL)にパパイン300μgを加え、37℃で18時間撹拌した。0.1 N NaOHを加えてpHを6.0 に調節したこの反応液を予め0.1M 燐酸緩衝１mMEDTA溶液（pH6.3)で緩衝化したＡｃＡ-44ゲルカラムにアプライし、上記の燐酸緩衝液で溶出した。分子量約10万付近に溶出されたピーク部分を集めて1mLに濃縮し、目的の抗ＣＲＰ・マウスIgＧＦ$(ab')_2$を得た。

【００５９】

(1-3)α－アミラーゼ－抗ＣＲＰ・マウスIgＧＦab' 結合物の作製

(1-2)で調製した抗ＣＲＰ・マウスIgＧＦ$(ab')_2$ 6mg を含む0.1M燐酸緩衝液(1mM EDTA含有、 pH6.0) 1mL に10mg/mL の2-メルカプトエチルアミン塩酸塩水溶液 100μL を加え、37℃で90分間攪拌した。この反応液を予め0.1 M 燐酸緩衝液(pH 6.3)で緩衝化したセファデックスG-25カラムでゲル濾過して未反応の2-メルカプトエチルアミンを除去し、ＨＳ－Ｆab' を得た。これに(1-1)で調製したＣＨＭ化α－アミラーゼ2mgを加え、37℃で90分間反応させた。次にこの反応液を0.1 M 酢酸緩衝 5mM塩化カルシウム溶液(pH 7.0)で緩衝化したAcA-34カラムでゲル濾過して分子量20万以上の分画を集め、これを濃縮して目的の結合物を得た。

【００６０】

(2)分析要素の作製

ゼラチン下塗層が設けられている厚さ180μmの無色透明ポリエチレンテレフタレート（PET)シート（支持体）上に下記の被覆量になるように架橋剤含有試薬溶液を塗布し、乾燥して試薬層を設けた。

アルカリ処理ゼラチン	14.5 g/m^2
ノニルフェノキシポリエトキシエタノール（オキシエチレン単位平均9～10含有）	0.2 g/m^2
グルコースオキシダーゼ	5000 u/m^2
ペルオキシダーゼ	15000 u/m^2
グルコアミラーゼ	5000 u/m^2
2-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニル-4-[-(ジメチルアミノ)フェニル]-5-フェネチルイミダゾール（ロイコ色素）酢酸塩	0.38 g/m^2
ビス[(ビニルスルホニルメチルカルボニル）アミノ］メタン	0.1 g/m^2

【００６１】
この試薬層の上に下記の被覆量になるように接着層を塗布、乾燥して設けた。

アルカリ処理ゼラチン	14.5 g/m^2
ビス[(ビニルスルホニルメチルカルボニル）アミノ］メタン	0.1 g/m^2

【００６２】
ついで接着層の表面に下記の被覆量になるように下記試薬含有水溶液を塗布し、ゼラチン層を膨潤させ、その上に50デニール相当のPET紡績糸36ゲージ編みした厚さ約250μmのトリコット編物布地をほぼ一様に軽く圧力をかけてラミネートして多孔性展開層を設けた。

ノニルフェノキシポリエトキシエタノール（オキシエチレン単位平均 9～10含有）	0.15 g/m^2
ビス[(ビニルスルホニルメチル　カルボニル）アミノ］メタン	0.4 g/m^2

【００６３】
次に、下記の被覆量になるように基質を塗布、乾燥して基質層を設けた。

カルボキシルメチル化澱粉	4 g/m^2
ノニルフェノキシポリエトキシエタノール（オキシエチレン単位平均 9～10含有）	0.2 g/m^2

【００６４】
この基質層の上から、合成例(1) で合成したアミラーゼ－抗ＣＲＰ・IgG結合物のエタノール溶液を3mg/m^{2}の被覆量となるように塗布、含浸させ乾燥させた。この分析要素を15mm四方のチップに裁断し、特開昭57-63452に記載のスライドの枠に収めて、ＣＲＰ分析用免疫分析スライドとした。

【００６５】
【測定】
この分析スライドに既知量のＣＲＰを含有する試料液（50mMグリセロ燐酸緩衝：pH 7）10μLを点着し、３７℃に保って、中心波長650nmの可視光でＰＥＴ支持体側からスライドの反射光学濃度を測定した。点着から４分後及び６分後の反射光学濃度の差（ΔOD_{6-4}、dＯＤr）及びその対数値を求めた。結果を表３に示す。

【００６６】
【表３】

CRP濃度 (mg/dL)	dODr	ln (dODr)
* 0.00	0.2460	- 1.444
0.23	0.2313	- 1.464
0.47	0.2289	- 1.475
0.70	0.2195	- 1.516
0.93	0.2140	- 1.542
* 1.40	0.2003	- 1.608
1.87	0.1824	- 1.702
2.33	0.1591	- 1.838
2.80	0.1522	- 1.882
3.77	0.1187	- 2.131
* 4.73	0.0993	- 2.310
5.70	0.0853	- 2.462
6.67	0.0732	- 2.615
7.83	0.0657	- 2.723
9.00	0.0625	- 2.772
*10.17	0.0587	- 2.836
11.33	0.0590	- 2.831

【００６７】

これをグラフにしたのが図８である。図８において直線部分を構成する中間の度量域は点A_1（X=1.4mg/dL）と点A_2（X=4.7mg/dL）の間であった。そこで表３において＊印を付した試料液の、濃度とdＯＤr（分析測定値）を用いて、

A_0：p_0=0.00、q_0=0.2360

A_1：p_1= 1.4、q_1=0.2003

A_2：p_2= 4.7、q_2=0.0993

A_3：p_3=10.2、q_3=0.0587

とし、

$q_0 \geqq Y \geqq q_1$で、　$X = e \cdot Y^2 + f \cdot Y + g$

$q_1 \geqq Y \geqq q_2$で、　$X = (\ln Y - d) / b$

$q_2 \geqq Y \geqq q_3$で、　$X = l \cdot Y^2 + m \cdot Y + n$

を設定し、各係数を求めた。前述の式(4),(5),(12),(13),(14),(20),(21)及び(21)から

$b = (\ln q_2 - \ln q_1) / (p_2 - p_1) = -0.210532$

$d = \ln q_2 - b \cdot p_2 = -1.313295$

$e = [1/\underline{(b \cdot q_1)} - (p_1 - p_0)/\underline{(q_1 - q_0)}] / (q_1 - q_0) = -433.3017$ $f = 1/\underline{(b \cdot q_1)} - 2e \cdot q_1 = 149.84713$

$g = p_0 - e \cdot q_0^2 - f \cdot q_0 = -11.23075$

$l = [1/\underline{(b \cdot q_2)} - (p_3 - p_2)/(q_3 - q_2)] / (q_2 - q_3) = 2115.1352$

$m = 1/\underline{(b \cdot q_2)} - 2 \cdot l \cdot q_2 = -467,8245$

$n = p_2 - l \cdot q_2^2 - m \cdot q_2 = 30.331081$

となった。得られた係数を用いて描いた検量線を図９に示す。図中■で示した実測データと、全濃度領域にわたって、きわめてよい一致を示す検量線が作成できたことがわかった。

【００６８】

比較例として、表３のデータを用いて、従来のロジスティック(logistic) 曲線モデルで検量線を作成してみたところ、図１０に示すような結果となり、高濃度領域では実測データとのずれが顕著であった。これに対し、本発明の方法で作成した検量線（図９）は、高濃度領域でも実測点とよい一致を見ていた。

【００６９】

【発明の効果】

以上のように本発明では、シグモイド状曲線を描く検量線を、多次関数で表現した低濃度領域の検量線部分、指数関数で表現した中間濃度領域の検量線部分、多次関数で表現した高濃度領域の検量線部分の３つに分割し、その境界点での傾きが等しいことを境界条件として、下記濃度領域の検量線の回帰関数を求めた。このため、検量線を得るために測定する標準試料の数が少なくてすみ、しかも全濃度領域にわたって精度の高い検量線を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図１】従来のロジスティック曲線モデルによる検量線の説明図である。

【図２】ＣＲＰ分析用乾式分析要素における各濃度ごとの測定データの平均値（dOD_{ave}）と、その標準偏差（S.D.）の相関図である。

【図３】同じくＣＲＰ分析用乾式分析要素における、各濃度（表示値）と検量線から読みとったＣＲＰ濃度の標準偏差（S.D.）の関係を示す図である。

【図４】本発明の検量線回帰関数作成方法の原理を説明する概念図である。

【図５】同じく本発明の原理を説明するための図であり、縦軸を対数値とした検量線概念図である。

【図６】本発明の分析装置の一実施例の基本構成図である。

【図７】本発明の分析装置の動作説明図である。

【図８】実施例１において、ＣＲＰ濃度とｄＯＤｒをプロットした実測検量線である。

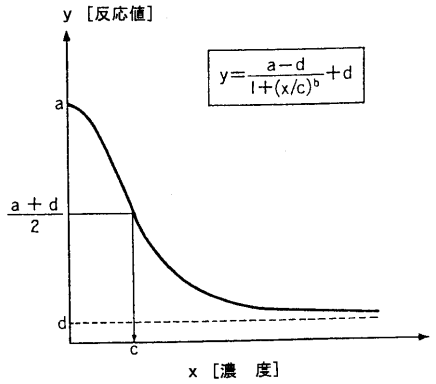
【図９】実施例１において、本発明の検量線回帰関数作成方法に基づいて作成したＣＲＰ定量用の回帰曲線である。

【図１０】比較例として、表３のデータを用いて、従来のロジスティック(logistic) 曲線モデルで作成した回帰曲線である。

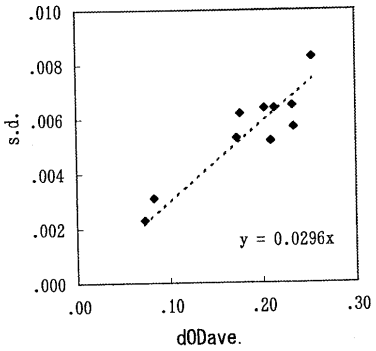
【符号の説明】

１０　測定手段
１２　入力手段
１４　出力手段
１６　演算手段
１８　検量線作成アルゴリズムを記憶した記憶手段としてのＲＯＭ
２０　検量線作成手段
２２　作成された検量線を記憶するＲＡＭ

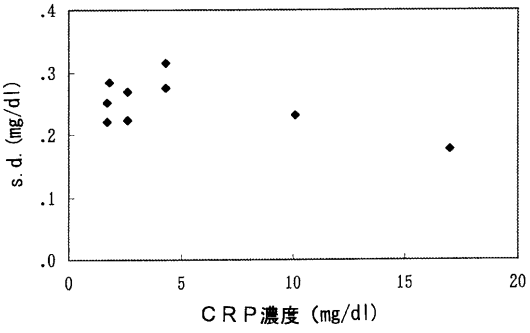
【図１】



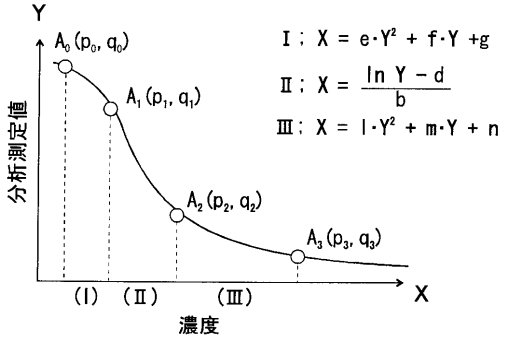
【図２】



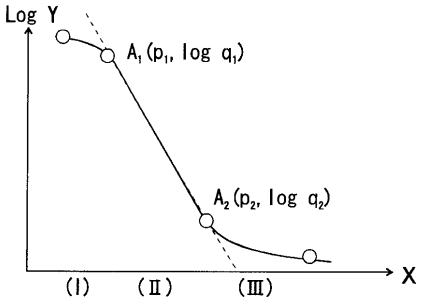
【図３】



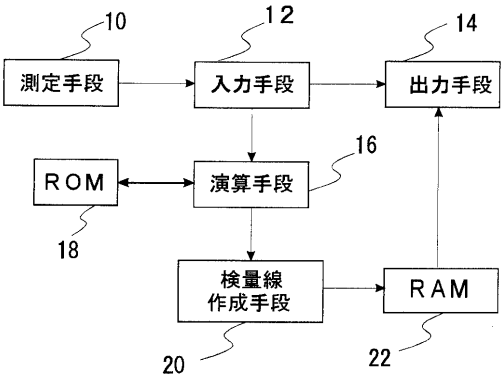
【図４】



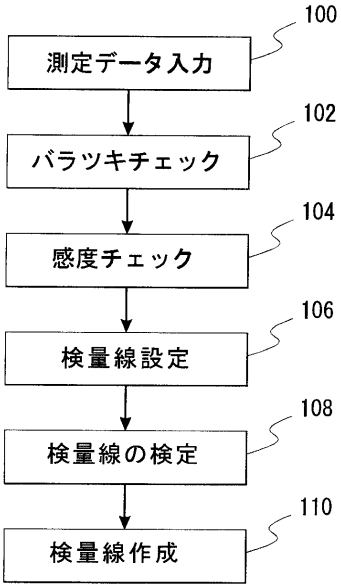
【図５】



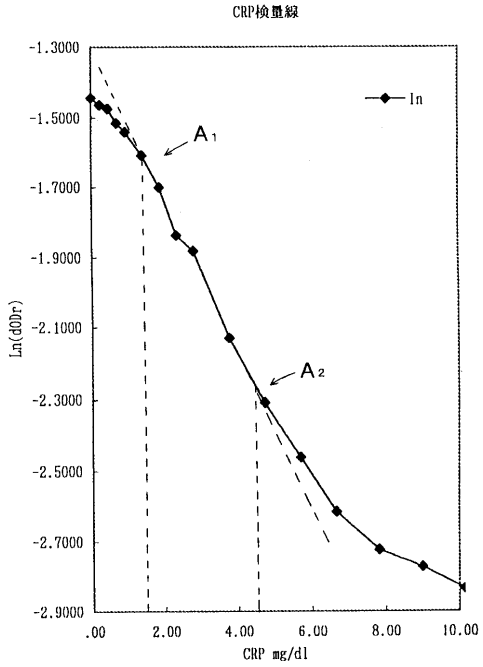
【図６】



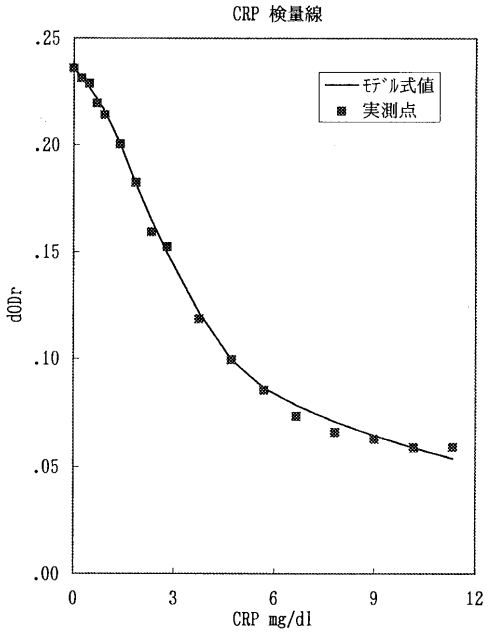
【図７】



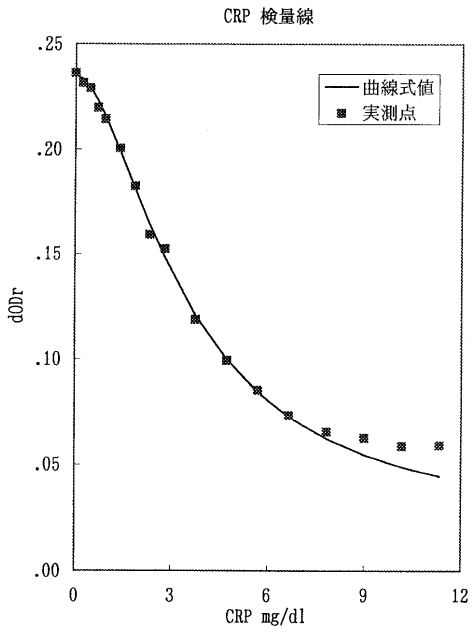
【図８】


CRP検量線
-1.3000
-1.5000
-1.7000
-1.9000
-2.1000
-2.3000
-2.5000
-2.7000
-2.9000
Ln(dODr)
ln
A1
A2
.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
CRP mg/dl

【図９】


CRP 検量線
.25
.20
.15
.10
.05
.00
dODr
モデル式値
実測点
0
3
6
9
12
CRP mg/dl

【図１０】


CRP 検量線
.25
.20
.15
.10
.05
.00
dODr
曲線式値
実測点
0
3
6
9
12
CRP mg/dl

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平０３－１１０４７１（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－１３２１６６（ＪＰ，Ａ）
特開平０７－１２０３８１（ＪＰ，Ａ）
特開平０５－０１８９６９（ＪＰ，Ａ）
特開平０７－２７０４２４（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
G01N 33/52
G01N 33/53
G01N 35/00