

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 4735

(P2003 - 4735A)

(43)公開日 平成15年1月8日(2003.1.8)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	G
33/577			33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 8 数)

(21)出願番号 特願2001 - 187590(P2001 - 187590)

(22)出願日 平成13年6月21日(2001.6.21)

(71)出願人 000002912

大日本製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号

(72)発明者 西村 誠

大阪府豊中市浜3丁目17番1号

(72)発明者 舟岡 宏幸

兵庫県明石市魚住町中尾552 - 2番地403号

(72)発明者 大軽 靖彦

大阪府泉南郡岬町淡輪3631番地の24号

(74)代理人 100099221

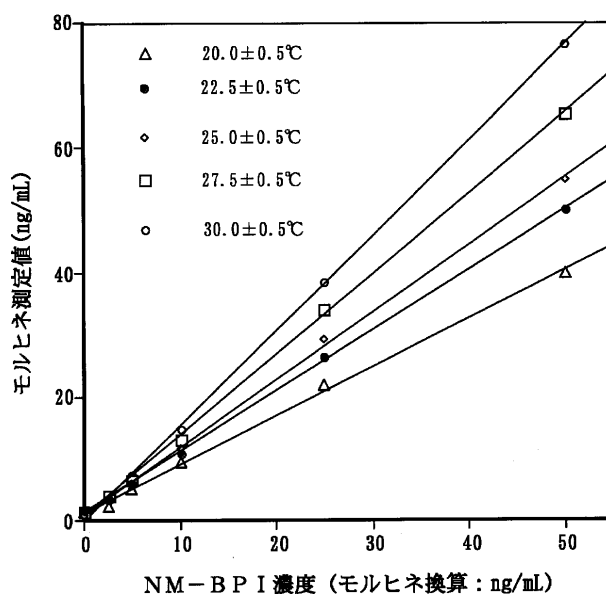
弁理士 吉岡 拓之

(54)【発明の名称】 モルヒネの免疫測定法および測定キット

(57)【要約】

【課題】麻薬取締法に規制されることのない、モルヒネの免疫測定法及び測定キットを提供すること。

【解決手段】ノルモルヒネブチルフタルイミド (N M - B P I) を標準物質として使用し、全ての抗原抗体反応を一定の温度条件下で行わせ、且つ、得られる標準曲線を前記温度条件に特有の補正係数により補正することを特徴とするモルヒネの免疫測定法および本測定法において使用するモルヒネの免疫測定キット。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 モルヒネの免疫測定法において、標準物質としてノルモルヒネブチルフルイミド（NM - B P I）を使用し、全ての抗原抗体反応を一定の温度条件下で行わせ、且つ、得られる標準曲線を前記温度条件に特有の補正係数により補正することを特徴とするモルヒネの免疫測定法。

【請求項 2】 一定の温度条件が 20 ～ 30 の範囲中の何れか一点の温度である請求項 1 記載のモルヒネの免疫測定法。

【請求項 3】 一定の温度条件が 22.5 ～ 27.5 の範囲中の何れか一点の温度である請求項 2 記載のモルヒネの免疫測定法。

【請求項 4】 一定の温度条件が 25 前後である請求項 3 記載のモルヒネの免疫測定法。

【請求項 5】 抗モルヒネイディオタイプ抗体を使用することを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のモルヒネの免疫測定法。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のモルヒネの免疫測定法において使用するモルヒネの免疫測定キット。

【請求項 7】 ノルモルヒネブチルフルイミド（NM - B P I）を標準物質として含むことを特徴とする請求項 6 記載のモルヒネの免疫測定キット。

【請求項 8】 さらに、抗モルヒネイディオタイプ抗体を構成試薬として含むことを特徴とする請求項 7 記載のモルヒネの免疫測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は麻薬取締法の規制を受けることのないモルヒネの免疫測定法および免疫測定キットに関する。

【0002】

【従来の技術】モルヒネは癌患者等の疼痛の軽減に優れた効果を発揮する麻薬性鎮痛薬である。癌医療の場において、患者の生活の質の向上のためにその処方量は年々増加している。その一方で、本薬物の副作用として、嘔吐、便秘および呼吸抑制等が問題となっている。

【0003】モルヒネの投与量から、患者の血中モルヒネ濃度を正確に予測することは、薬物の代謝・吸収・排泄等に個人差があるため困難である。また、鎮痛作用発現に要する血中濃度は、患者ごとに異なっている。

【0004】従って、癌患者の疼痛を十分にコントロールし、副作用を軽減させるためには直接血液中のモルヒネ濃度を測定し、個々の患者に応じて最適の血液濃度を維持する必要がある。

【0005】一方、モルヒネは麻薬取締法により厳重に管理・規制された薬物である。このため、標準物質としてモルヒネを含むモルヒネの測定キットも本法律の適用を受けることになり、本キットを扱う臨床の場では厳重

な管理が必要である。また、このようなキットは市場では規制なく自由に流通させることができない。

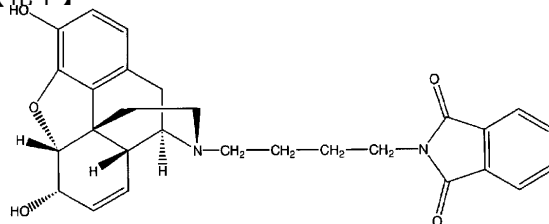
【0006】例えば、特開平 2 - 193070 号公報、特開平 6 - 7190 号公報及び臨床検査機器・試薬 第 18 巻 第 4 号 675 - 681 頁（1995 年）には、モルヒネの免疫測定法及び測定キットが開示されている。しかしながら、これらの方法及び測定キットは、標準物質としてモルヒネを使用しているため、麻薬取締法の規制を受ける。

10 【0007】このような状況の下、麻薬取締法に規制されることのない、モルヒネの免疫測定法及び測定キットの開発が望まれていた。

【0008】そこで、非麻薬性物質である下記式〔化 1〕で表されるノルモルヒネブチルフルイミド（以下、NM - B P I という）を標準物質として使用するモルヒネの免疫測定について種々検討した。

【0009】

【化 1】



【0010】一般に、免疫測定法において、測定対象とは異なる物質を標準物質として使用する場合には、両物質に対する抗体の反応性が異なるために、予め設定しておいた係数で補正した標準曲線を使用することにより測定が行われる。

【0011】しかしながら、常法に従い補正係数を求め、NM - B P I で得られた標準曲線を前記補正係数で補正して、モルヒネの測定を試みたが、測定ごとに測定値がばらつき、モルヒネ濃度を正確に測定することはできなかった。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】このような状況において、本発明の課題は、非麻薬性物質 NM - B P I を標準物質として使用する定量性に優れたモルヒネの免疫測定法及び測定キットを提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために、本発明者らは、モルヒネの免疫測定において NM - B P I を標準物質として使用する場合には、全ての抗原抗体反応温度を一定温度に制御し、且つ、得られる標準曲線を前記一定温度に特有の補正係数で補正しなければ、測定値が測定ごとに大きく変動すること、及び、この変動は、反応温度の変化が、抗モルヒネ抗体に対するモルヒネ及び NM - B P I の相対的反応性に影響を及ぼすことに起因することを見だし本発明を完成した。

【0014】本発明は、標準物質として NM - B P I を

使用し、全ての抗原抗体反応を一定の温度条件下で行わせ、且つ、得られる標準曲線を前記温度条件に特有の補正係数により補正することを特徴とするモルヒネの免疫測定法に関する。

【0015】また本発明は、上記モルヒネの免疫測定法において使用するモルヒネの免疫測定キットに関するものである。

【0016】このような本発明によれば、ヒトから分離された血液、尿などの体液中のモルヒネ濃度を正確に測定することができる。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明の免疫測定法は、抗体の有する特異性を利用する方法であれば何れでもよく、特に限定されるものではない。

【0018】モルヒネの測定は、例えば、抗モルヒネ抗体に対して、検体中のモルヒネ及び標識抗原を競合的に抗原抗体反応せしめた後、前記抗体と結合している標識抗原と遊離の抗原とを分離（B/F分離）し、そのいずれかの標識活性を測定することにより実施できる。B/F分離はマイクロプレートウェル等に結合させた固相化抗体や抗体作製に使用した動物のイムノグロブリンに対する抗体（第二抗体）等を用いることにより有利に行うことができる。

【0019】また、例えば、標識抗モルヒネ抗体に対して、検体中のモルヒネ及び抗原を競合的に抗原抗体反応せしめる方法によってもモルヒネを測定することができる。この場合に、抗原として抗モルヒネ抗体の抗イディオタイプ抗体を用いるのが好ましい。

【0020】このような方法は、用いる標識の種類により、酵素免疫測定法（EIA法）、放射免疫測定法（RIA法）、蛍光免疫測定法（FIA法）、ルミネッセンス免疫測定法又はスピニング免疫測定法などに分類され、何れも使用可能である。そのなかでも、EIA法が操作の簡便性および迅速性の点において優れている。

【0021】本発明は、モルヒネの免疫測定法において、標準物質としてNM-BPIを使用し、測定に係わる全ての抗原抗体反応を一定の温度条件下で行わせ、且つ、得られる標準曲線を前記温度条件に特有の補正係数により補正することを特徴とするものである。

【0022】本発明において標準物質として使用されるNM-BPIは、それ自体既知の化合物であり、例えば、特開平11-116575号公報に記載の方法又はこれに準ずる方法により製造することができる。

【0023】標準溶液は、NM-BPIを通常の緩衝液で適宜希釈することにより製造することができる。NM-BPI標準溶液の濃度（以下、本明細書においてNM-BPIの濃度に言及する場合にはモルヒネ換算濃度による）は、測定対象の検体中モルヒネ濃度により適宜変更される。例えば、患者血中のモルヒネ濃度を測定する場合は、5、10、25、50、100 ng/mLとす

ることが推奨される。

【0024】本発明方法において、「全ての抗原抗体反応」とは、（標識）抗モルヒネ抗体に係わる抗原との反応全てを含むものであり、免疫測定法の種類によって異なるが、例えば、標準物質NM-BPI、検体中モルヒネまたは抗モルヒネイディオタイプ抗体と（標識）抗モルヒネ抗体との反応などが挙げられる。

【0025】一定の温度条件としては任意の温度を選択することができる。例えば、20～30、好ましくは22.5～27.5の範囲内の何れか一点の温度、その中でも特に、25前後の温度条件が好ましい。温度は、抗原抗体反応期間中をとおして一定に保つことが、モルヒネをより正確に測定できる点において望ましいが、選択した温度の ± 2.5 、好ましくは ± 1.0 、特に好ましくは ± 0.5 の範囲で変動してもよい。

【0026】このような反応温度の制御は、例えばインキュベーター中又は温浴中にマイクロプレートを設置し、そのウェル中で抗原抗体反応を行わせることにより実施できる。この場合、通常、反応期間中の温度を、選択した温度の ± 0.5 の範囲内で制御可能であり、モルヒネ量を正確に測定することができる。

【0027】各温度条件に特有の補正係数は例えば、次のようにして設定することができる。

【0028】標準物質がモルヒネである点を除き、本発明の測定キットと同一の構成をとるモルヒネの測定キット（例えば、臨床検査機器・試薬第18巻第4号675-681頁に記載のキット）を使用して、本発明における標準物質である各NM-BPI標準溶液のモルヒネ濃度を、本発明において任意に選択する抗原抗体反応の温度条件下で測定する。そして、縦軸にその測定値を、横軸にNM-BPI標準溶液の各濃度をプロットして作成した帰直線（図2参照）の傾きの値を、その温度条件における補正係数として設定することができる。

【0029】なお、これらの補正係数は特定の温度条件に唯一のものが決定されるのではなく、測定キットを構成する試薬の種類などにより変動することもあるので、試薬の構成などを変えた場合にはその都度新たに設定する必要がある。

【0030】このようにして設定された補正係数は、本発明の測定方法において、NM-BPI標準溶液を用いて求めた標準曲線を、モルヒネの正確な測定を可能にせしめる標準曲線（以下、補正後標準曲線という）（図3参照）へ変換するために使用される。補正後標準曲線への変換は、NM-BPI標準溶液を用いて求めた標準曲線における横軸のNM-BPI濃度の値を、次式〔数1〕によって得られる補正後NM-BPI濃度へ変換することにより実施することができる。

【0031】

〔数1〕

$$\text{NM-BPI 濃度} \times \text{補正係数} = \text{補正後 NM-BPI 濃度}$$

【0032】なお、キット中に含まれる NM-BPI の標準溶液の各濃度の表示自体を、補正係数でもってあらかじめ補正後 NM-BPI 濃度の表示へ変換しておき、この表示に基づいて標準曲線を作成することによって、補正後標準曲線を得ることができる。

【0033】このようにして作成される補正後標準曲線を使用して、以下常法に従い検体中のモルヒネ濃度を測定することができる。

【0034】本発明のモルヒネの免疫測定キットは NM-BPI (標準物質) を含むものであるが、抗モルヒネ抗体または標識抗モルヒネ抗体を含んでいてもよい。

【0035】抗モルヒネ抗体は、モルヒネ及び NM-BPI に対して特異的な免疫反応性を有するものであればポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の何れでもよい。特異性および均一性が高いという点でモノクローナル抗体が好ましい。

【0036】ポリクローナル抗体はモルヒネと例えばウシ血清アルブミンや K L H (Keyhole Limpet Hemocyanin) などの免疫原性蛋白との結合物を適当なアジュバントと混合してウサギ、モルモット、羊、山羊等のヒト以外の動物に、非経口的に投与(免疫)し、血清を採取して、公知の処理をなすことによって製造することができる。

【0037】モノクローナル抗体はこのように免疫された動物の抗体産生細胞を脾臓より採取し、以下常法に従って、ミエローマ細胞との融合、クローン性細胞のスクリーニングなどの操作をへて製造することができる。

【0038】なお、モノクローナル抗体として特開平 2-86794 号に記載の MO-5 株(微工研条寄 1912 号)が産生するモノクローナル抗体を使用することもできる。

【0039】標識抗モルヒネ抗体は、上記のようにして製造された抗体と標識物質とを公知の方法に従い結合させることによって製造できる。標識物質としては免疫測定法の種類によって、酵素、蛍光性物質、放射性物質等が挙げられる。

【0040】標識酵素としては、パーオキシダーゼ、β-D-ガラクトシダーゼ、リパーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ等が挙げられる。この中で好ましいのは、パーオキシダーゼである。

【0041】また、好ましい実施形態としての本発明のモルヒネ免疫測定キットは、抗モルヒネイディオタイプ抗体を構成試薬として含むものである。

【0042】抗モルヒネイディオタイプ抗体は、モルヒネの代わりに抗モルヒネ抗体を使用する以外は前記抗モルヒネ抗体の場合と同様にして製造することができる。

【0043】抗モルヒネイディオタイプ抗体は、抗モルヒネ抗体の可変部位との免疫反応性を有し、抗モルヒネ

抗体と複合体を形成することができるものである。

【0044】なお、抗モルヒネイディオタイプ抗体として特開平 6-7190 に記載の iMO-3-X1 株(微工研条寄 11933 号)が産生する抗イディオタイプ抗体を使用することもできる。

【0045】抗モルヒネイディオタイプ抗体は固相化された形をとるのが、BF 分離操作が簡便になる点において、好ましい。抗モルヒネイディオタイプ抗体の固相化は前述のようにして得られた抗モルヒネイディオタイプ抗体を固相、例えばマイクロプレートウェルやプラスチックビーズなどに結合させることにより実施することができる。

【0046】固相への結合は通常、抗モルヒネイディオタイプ抗体をクエン酸緩衝液等の適当な緩衝液に溶解し、固相表面と抗体溶液を適当な時間(1~2日)接触させることにより、行うことができる。そして、牛血清アルブミン(BSA)のリン酸緩衝溶液を固相と接触させることにより、抗体によってコートされなかった固相表面部分を BSA でコートすることが一般的に行われる。

【0047】EIA 法では、これら以外に必要に応じて、酵素基質、洗浄液、反応停止液、基質溶解液などが使用され、これら試薬も本発明のキットを構成するものである。

【0048】

【実施例】以下に参考例及び実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。

【0049】参考例：標準物質にモルヒネを使用したモルヒネの測定法

【0050】参考例 1：試薬の作製

【0051】(a) モルヒネ標準試薬の調製

塩酸モルヒネ(大日本製薬社製)を蒸留水で希釈し、モルヒネ濃度が 5 mg/mL であるモルヒネ標準原液を調製した。モルヒネ標準原液を、希釈液(1%ゼラチン、0.9%NaCl、0.1%プロクリン 150 [防腐剤; ローム・アンド・ハース社製]、20 mmol/L リン酸ナトリウム、pH 7.0)を用いて、順次希釈を繰り返し、モルヒネ濃度が 5、10、25、50 および 100 ng/mL 溶液を調製した。これらは、0.5 mL ずつ 2 mL 容茶バイアルに分注し、凍結乾燥を行った。本標準試薬は 4℃ に保存し、使用時に 0.5 mL のヒト血清(大日本製薬社製)で再溶解した。

【0052】(b) 酵素標識抗モルヒネ抗体の作製

酵素標識抗モルヒネ抗体は MO-5 株(微工研条寄 1912 号)が産生した精製抗体 MO-5 を用いて、次に示すような過ヨウ素酸酸化法によって作製した。まず、この抗体を 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)で希釈し、10 mg/mL の MO-5 溶液を調製した。

【0053】一方、西洋ワサビパーオキシダーゼ 4mg を蒸留水 1mL に溶解し、その 800 μ L に 0.1mol/L 過ヨウ素酸ナトリウム溶液 200 μ L を加えて、室温で 10 分間攪拌して反応させた。この溶液を 1mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.4) に対して一夜透析し、過ヨウ素酸酸化パーオキシダーゼ溶液を得た。

【0054】以上のようにして得られた 10mg/mL の MO-5 溶液 135 μ L と過ヨウ素酸酸化パーオキシダーゼ溶液 400 μ L を混合し、さらに 1mol/L 炭酸ナトリウム緩衝液 15 μ L (pH 9.5) を加え、攪拌後、室温遮光下で 2 時間静置して反応させた。この反応液に、4mg/mL 水素化ホウ素ナトリウム溶液 40 μ L を加え、4 遮光下で 2 時間静置して反応させた。この反応液をオメガセル (分画分子量 50kDa; フィルトロン社製) で次に示すように限外濾過を行った。反応液を全量オメガセルに移し、洗浄液 7mL (20mmol/L リン酸緩衝液 pH 7.0) 加え、約 1mL まで濃縮した。この工程を 7 回繰り返し、限外濾過を行った。モルヒネを測定する際には、この原液を標識抗体用希釈液 (10% ブロックエース [ブロッキング剤; 大日本製薬社製]、0.5% チラミン塩酸塩および 0.1% プロクリン 150 を含む溶液) で適当に希釈して用いた。

【0055】(c) 抗モルヒネイディオタイプ抗体固相化プレートの作製

抗モルヒネイディオタイプ抗体固相化プレートの作製は、iMO-3-X1 株 (微工研条寄 11933 号) が産生した精製抗体 iMO-3-X1 を用いて、次に示すように行った。この抗体を 50mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 5.0) で希釈し、20 μ g/mL の iMO-3-X1 溶液を調製した。この 20 μ g/mL の iMO-3-X1 溶液をマイクロプレート (プレーカブルコンピプレート EB, RE; ラボシステム社製) の各ウェルに 200 μ L ずつ分注し、4 で 72 時間静置した。次に、洗浄液 (0.1% ウシ血清アルブミン、0.2% プロクリン 150 を含む 40mmol/L リン酸緩衝液*

表 1: 各温度条件下での既知濃度モルヒネ検体の測定

①既知濃度モルヒネ検体 (ng/mL)	各温度条件下におけるモルヒネ測定値 (ng/mL) [対①%]				
	20.0 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C	22.5 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C	25.0 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C	27.5 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C	30.0 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C
7.5	8.2 [108.9]	8.4 [112.3]	7.8 [104.1]	8.0 [106.5]	7.3 [97.6]
30	32.2 [107.2]	33.6 [112.0]	31.5 [104.9]	32.0 [106.6]	31.1 [103.6]
60	61.2 [102.1]	63.5 [105.9]	60.2 [100.3]	60.3 [100.6]	57.2 [95.3]

【0060】上記表 1 に示すとおり、モルヒネを標準物質として使用する本方法では各反応温度条件下で、正確にモルヒネを測定することができた。

*理食塩水) で 2 回洗浄後、マイクロプレートへの酵素標識抗モルヒネ抗体の非特異的吸着を防ぐために、洗浄液を各ウェルに 300 μ L ずつ分注し、25 で 3 時間静置した。次に、洗浄液を吸引除去し、一夜真空乾燥を行った。このようにして作製されたプレートは、乾燥剤とともに密封し、使用まで 4 で保存した。

【0056】参考例 2: モルヒネの測定

【0057】抗モルヒネイディオタイプ抗体固相化プレート (c) の各ウェルに 20 μ L ずつモルヒネ標準試薬 (a) 又は既知濃度のモルヒネ検体 (7.5、30、60 ng/mL) を加え、さらに 100 μ L ずつ酵素標識抗モルヒネ抗体液 (b) を入れ、一定温度 (20.0 $\pm$ 0.5、22.5 $\pm$ 0.5、25.0 $\pm$ 0.5、27.5 $\pm$ 0.5、30.0 $\pm$ 0.5) に設定されたインキュベーター (MIR-153; 三洋電機社製) 中で 30 分間静置した。続いて、各ウェルを洗浄液 (0.15mol/L NaCl、0.05% ポリソルベート 80、0.03% Triton (登録商標) X-405、5mmol/L リン酸ナトリウム、0.01% プロクリン 150、pH 7.0) で 3 回洗浄後、基質液 (50mmol/L クエン酸、0.1mol/L リン酸ナトリウム pH 5.0、0.87mg/mL o-フェニレンジアミン、0.03% H₂O₂) を 100 μ L ずつ分注した。さらに、上記インキュベーター中で 30 分間静置し、100 μ L の反応停止液 (0.9mol/L H₂SO₄) を加えマイクロプレート光度計 (マルチスキャンバイクロマティック; 大日本製薬社製) を用いて吸光度 (主波長: 492nm、副波長: 620nm) を測定した。得られたモルヒネの標準曲線から、既知濃度のモルヒネ検体の測定値を求めた。

【0058】図 1 に一例として 25.0 $\pm$ 0.5 における標準曲線を、また各温度条件における標準曲線から求めた既知濃度モルヒネ検体の測定値を以下の表 1 に示す。

【0059】

【表 1】

【0061】実施例: 標準物質に NM-BPI を使用したモルヒネの測定法

50 【0062】実施例 1: 試薬の作製

【0063】(a') NM-BPI 標準試薬の作製
NM-BPI (分子量: 472.34; ウルトラファインケミカル社製) をジメチルスルホキシド(和光純薬社製)で希釈し、NM-BPI モル濃度が 0.0176 mol/L となるように調製した。モルヒネの分子量は 285.34 であるので、この溶液中の NM-BPI モル数を等モル数のモルヒネに換算した場合、モルヒネ重量濃度は 5 mg/mL となる。この 5 mg/mL の NM-BPI 溶液をヒト血清(大日本製薬社製)を用いて、順次希釈を繰り返し、モルヒネ換算濃度で 2.5、5、10、25、50 及び 100 ng/mL の各溶液を調製した。

【0064】なお、酵素標識抗モルヒネ抗体、および抗モルヒネイディオタイプ抗体固相化プレートは参考例 1 の (b) および (c) に記載の方法と同様にして作製した。

*た。

【0065】実施例 2: モルヒネの測定 (温度条件が 25.0 ± 0.5 の場合)

【0066】2-1: 任意の温度における補正係数の設定

【0067】参考例に記載のモルヒネを標準物質として使用する測定方法と同様に、実施例 1 で作製した NM-BPI 標準溶液 (2.5 、 5.0 、 10 、 25 、 50 ng/mL) 中のモルヒネ濃度を測定した。なお、任意の温度条件として、参考例と同じく、 20.0 ± 0.5 、 22.5 ± 0.5 、 25.0 ± 0.5 、 27.5 ± 0.5 、 30.0 ± 0.5 を選択した。測定結果を次表 2 に示す。

【0068】

【表 2】

表 2: 各温度条件における NM-BPI 標準溶液のモルヒネ測定値

NM-BPI 標準溶液 (モルヒネ換算濃度: ng/mL)	各温度条件下におけるモルヒネ測定値 (ng/mL)				
	$20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$	$22.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$	$25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$	$27.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$	$30.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$
2.5	2.2	3.6	3.4	4.0	3.7
5	5.2	5.9	5.9	6.7	7.3
10	9.3	10.7	11.5	13.2	14.8
25	21.9	26.5	28.7	34.2	38.7
50	40.0	50.1	53.3	65.6	76.6

【0069】上記表 2 に示すとおり、各温度条件により NM-BPI 標準溶液のモルヒネ測定値は大きく変動するものであった。

【0070】表 2 の NM-BPI 標準溶液濃度を横軸に、各測定値を縦軸にプロットして各温度条件における回帰直線を作成した (図 2 参照)。

【0071】図 2 に示す各直線の回帰式は、次表 3 のとおりであり、これらの式における傾き (下線部) を各温度条件における補正係数として設定した。

【0072】

【表 3】

表 3: 図 2 に示す各温度条件における直線の回帰式

温度条件 ($^\circ\text{C}$)	回帰式 (相関係数)
20.0 ± 0.5	$\underline{0.786}x + 1.215$ ($r = 0.999$)
22.5 ± 0.5	$\underline{0.980}x + 1.338$ ($r = 1.000$)
25.0 ± 0.5	$\underline{1.093}x + 0.845$ ($r = 1.000$)
27.5 ± 0.5	$\underline{1.301}x + 0.772$ ($r = 1.000$)
30.0 ± 0.5	$\underline{1.530}x + 0.093$ ($r = 1.000$)

【0073】2-2: モルヒネの測定

【0074】前項 2-1 で求めた 25.0 ± 0.5 における補正係数 1.093 を NM-BPI 標準溶液の各濃度に乗じて、補正後 NM-BPI 濃度表示へと変換した。すなわち、NM-BPI 標準溶液の 2.5 、 5 、 10 、 25 、 50 及び 100 ng/mL の各濃度を補正後 NM-BPI 濃度である 2.73 、 5.47 、 10.93 、 27.33 、 54.65 及び 109.3 ng/mL の表示へと変換した。この補正後の濃度表示を、NM-

BPI 標準溶液の各濃度として、以降の操作を行った。

【0075】インキュベーターの温度を 25.0 ± 0.5 に設定し、モルヒネ標準試薬の代わりに NM-BPI 標準試薬を使用する以外は、参考例 2 と同様の操作をした。得られた補正後標準曲線を基にして、既知濃度のモルヒネ検体の濃度を求めた。この場合の補正後標準曲線を図 3 に、そして、測定値を次表 4 に示す。

【0076】

【表 4】

12

表 4 : 既知濃度のモルヒネ検体の測定 (温度条件 : $25.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$)

①既知濃度モルヒネ検体 (ng/mL)	モルヒネ測定値 (ng/mL) [対①%]
7.5	7.1 [94.7]
30	30.4 [99.3]
60	59.6 [97.3]

【0077】表 4 に示すとおり、既知濃度モルヒネ検体の濃度と測定値はほぼ一致している。このように、本発明のモルヒネの免疫測定法によれば、正確にモルヒネを測定することができた。

【0078】実施例 3 ~ 6 : モルヒネの測定 (温度条件が 20.0 ± 0.5 、 22.5 ± 0.5 、 27.5 ± 0.5 、 30.0 ± 0.5 の場合)

*【0079】実施例 2 - 1 において求めた各温度条件における補正係数を使用し、実施例 2 - 2 に記載の方法に準じて既知濃度モルヒネ検体の濃度を測定した。下記表 5 に示すとおり、各温度条件下で正確にモルヒネ濃度を測定することができた。

【0080】

* 【表 5】
表 5 : 既知濃度モルヒネ検体の測定

実施例 番号	温度条件 ($^{\circ}\text{C}$)	①既知濃度モル ヒネ検体 (ng/mL)	モルヒネ測定値 (ng/mL) [対①%]
3	20.0 ± 0.5	7.5	6.9 [92.0]
		30	30.0 [100.0]
		60	64.4 [107.3]
4	22.5 ± 0.5	7.5	7.4 [98.7]
		30	31.8 [106.0]
		60	61.1 [101.8]
5	27.5 ± 0.5	7.5	7.7 [102.7]
		30	31.1 [103.7]
		60	58.2 [97.0]
6	30.0 ± 0.5	7.5	7.6 [101.3]
		30	31.6 [105.3]
		60	56.3 [93.8]

【0081】

【発明の効果】本発明により、モルヒネの厳重な管理が求められる麻薬取締法の規制を受けることなく自由にモルヒネの測定を実施することができ、また、前記測定に使用する測定キットを本法の非規制下で自由に流通させることを可能にする。さらに、本発明によれば、生物試料等に存在するモルヒネの濃度を正確に測定することができる。

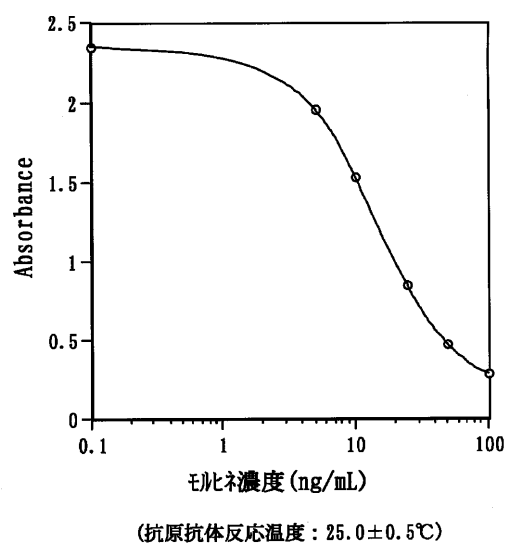
【図面の簡単な説明】

【図 1】標準物質としてモルヒネを使用し、温度条件が 25.0 ± 0.5 の場合の標準曲線を表す図である。

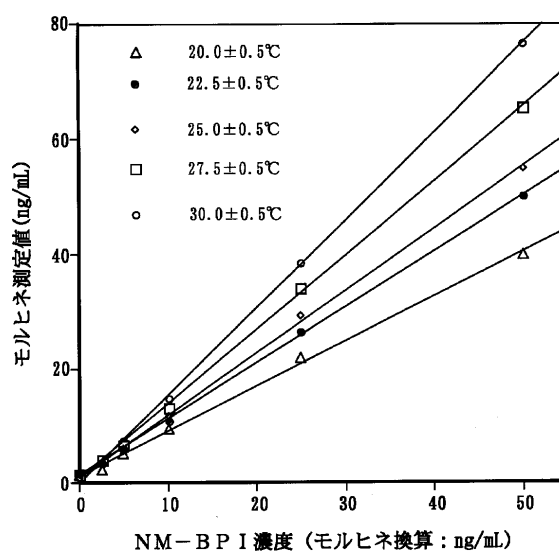
【図 2】表 2 の NM - B P I 標準溶液濃度を横軸に、各モルヒネ測定値を縦軸にプロットして作成した各温度条件における回帰直線を表す図である。

【図 3】標準物質として NM - B P I を使用し、温度条件が 25.0 ± 0.5 の場合の補正後標準曲線を表す図である。

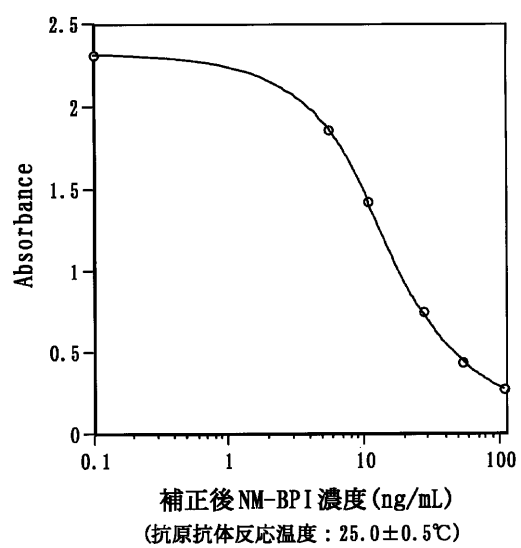
【図 1】



【図 2】



【図 3】



专利名称(译)	吗啡的免疫测定和测定试剂盒		
公开(公告)号	JP2003004735A	公开(公告)日	2003-01-08
申请号	JP2001187590	申请日	2001-06-21
申请(专利权)人(译)	大日本制药有限公司		
[标]发明人	西村 誠 舟岡 宏幸 大輕 靖彦		
发明人	西村 誠 舟岡 宏幸 大輕 靖彦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.G G01N33/577.B		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种吗啡免疫测定和测量试剂盒，它们不受药物控制方法的限制。 解决方案：所有抗原 - 抗体反应均在恒温条件下使用邻苯二甲酰丁基邻苯二甲酰亚胺 (NM-BPI) 作为标准物质进行，并且获得的标准曲线是特定于温度条件的校正系数。吗啡免疫测定和吗啡免疫测定试剂盒用于该测定。

