

(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2002 - 55104

(P2002 - 55104A)

(43)公開日 平成14年2月20日 (2002.2.20)

(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

審査請求 有 請求項の数 40 L (全 10数)

(21)出願番号 特願2001 - 199694(P2001 - 199694)

(22)出願日 平成13年6月29日(2001.6.29)

(31)優先権主張番号 09/608524

(32)優先日 平成12年6月30日(2000.6.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591003013

エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー

F . HOFFMANN - LA ROC

HE AKTIENGESELLSCH

AFT

スイス・シーエイチ - 4070バーゼル・グレ

ンツアーヘルストラツセ124

(72)発明者 アラン ジェイ・マクナリー

アメリカ合衆国 インディアナ 46033 カ

ーメル, マラリス ドライブ 2767

(74)代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物の測定方法

(57)【要約】

【課題】尿試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物を免疫学的測定方法により高感度に検出することが可能な分析対象物の測定方法及びそのキットを提供すること。

【解決手段】生体試料と、アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第1抗体と、メタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第2抗体と、標識部分を結合した分析対象物のリガンドを含有した複合体とを混合して、得られた複合体の存在又は量を測定し、メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質と比較する分析対象物の測定方法及びそのキット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物を含むことが疑われる試料と、アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第1抗体と、メタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第2抗体と、標識部分を結合した分析対象物のリガンドを含有した複合体と、を混合するステップ；

(b) 該分析対象物による競合的置換の結果として、該抗体に結合したまま若しくは結合していないままである複合体の存在又は量を測定するステップ；並びに

(c) ステップ(b)において測定された複合体の存在又は量と、メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含む参照試料中における類似複合体の存在又は量とを比較するステップ、ここで該参照試料が、ステップ(a)及び

(b)により処理されたものである、を含む、生体試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物の測定方法。
【請求項2】 (a) アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物を含むことが疑われる試料と、アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体及びメタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体からなる群より選ばれた抗体と、さらに標識部分を結合した分析対象物のリガンドを含有した複合体とを混合するステップ；

(b) 該分析対象物による競合的置換の結果として、該抗体に結合したまま若しくは結合していないままである複合体の存在又は量を測定するステップ；並びに

(c) ステップ(b)において測定された複合体の存在又は量と、メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含み、かつステップ(a)及び(b)により処理された参照試料中における類似複合体の存在又は量とを比較するステップ、を含む、生体試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物の測定方法。

【請求項3】 a. アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第1抗体と、

* b. メタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第2抗体と、

c. 標識部分を結合したアンフェタミン又はアンフェタミン誘導体のリガンドを含有した複合体と、

d. メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含有したキャリアプレーターとを組み合わせた包装物として含有してなる、生体試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物の測定方法を行なうためのキット。

【請求項4】 a. アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体及びメタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体からなる群より選ばれた抗体と、

b. 標識部分を結合したアンフェタミン又はアンフェタミン誘導体のリガンドを含有した複合体と、

c. メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含有したキャリアプレーターと、を組み合わせた包装物として含有してなる、生体試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物の測定方法を行なうためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、液体媒体中の分析対象物(analyte)の測定技術分野に関する。さらに詳しくは、本発明は、生体試料中における濫用された薬物の測定方法に関する。具体的には、本発明は、生体試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン、例えば、3,4-メチレンジオキシメタアンフェタミン(MDMA)などの構造的に関連した薬物及びこれらの薬物の代謝産物を検出するための高感度な測定方法に関する。

【0002】

【従来技術】メチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログは、「デザイナー」アンフェタミン化合物と称される一連の化合物である。図1に示すように、これらの向精神薬は、メスカリンに化学的に関連する環置換誘導体である。前記向精神薬としては、例えば、3,4-メチレンジオキシアンフェタミン(MDA)、3,4-メチレンジオキシメタアンフェタミン(MDMA、エクスタシーとしても知られている)、3,4-メチレンジオキシエチルアンフェタミン(MDEA)、N-メチル-1-(3,4-メチレンジ

オキシフェニル) - 2 - ブタンアミン (MBDB) 及び 3, 4 - メチレンジオキシフェニル - 2 - ブタンアミン (BDB) が挙げられ、これらのなかで最も一般的な薬物は、MDMAである。

【0003】MDAは、MDMAとMDEAとの両方の代謝産物であることが示されている。複数の動物研究により、MDMAが、グルクロニド及び/又は硫酸塩代謝産物へのN - 脱メチル化、脱アミノ化、O - メチル化並びにO - 結合により、代謝されることが示されている。親薬物 (MDMA)、3, 4 - メチレンジオキシアムフェタミン (MDA)、4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシメタアンフェタミン (HMMA)、3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシメタアンフェタミン、4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシフェニルアセトン、3, 4 - メチレンジオキシフェニルアセトン及び3, 4 - ジヒドロキシフェニルアセトンが尿中に検出される。これらの代謝産物のほとんどは、血液にも存在する。

【0004】尿及び血液は、MDMA、MDA、MDEA及びMBDBの最も一般的に研究された生物学的マトリックスであり、文献においてよく証明されている。唾液、汗、毛髪などの他の生検におけるこれらのデザイナードラッグの測定は、近年報告されている。前記親薬物は、これらのマトリックスにおけるその代謝産物よりも高い濃度で検出される。

【0005】これらのデザイナーアンフェタミン化合物の濫用は、世界中において増加しており、スクリーニング法によるこれらの検出は、より重要な問題となっている。

【0006】ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) は、高い特異性があり、MDMA、MDA、アンフェタミン、メタアンフェタミン、MDEA及びこれらの代謝産物の同時検出が述べられている。GC/MS解析は、通常、免疫学的測定法又は疑わしき診断の結果の確認及び検証のために必要される。この技術において、MDMA又はデザイナー薬物は、固相で抽出され、ついで誘導体化され、GC/MSを介して解析される。

【0007】1996年3月26日に発行された米国特許第5,501,987号明細書において、オードネツ (Ordonez) らは、アンフェタミン及びメタアンフェタミンのコンジュゲート誘導体由来する抗体に対して、異なる感度で交差反応しうる単標識結合パートナーを用いる、アンフェタミン及びメタアンフェタミンの測定のためのデュアルアナライタイム/アッセイ (dual analyte immunoassay) を述べている。用いられるキャリブレーターは、薬物を服用していない健康なヒトの尿にd - アンフェタミンを添加することにより調製できる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、アンフェタ

ミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物を高い特異性により測定することが可能な分析対象物の測定方法及びそのキットを提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明の要旨は、

〔1〕 (a) アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物を含むことが疑われる試料と、アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第1抗体と、メタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第2抗体と、標識部分を結合した分析対象物のリガンドを含有した複合体と、を混合するステップ； (b) 該分析対象物による競合的置換の結果として、該抗体に結合したまま若しくは結合していないままである複合体の存在又は量を測定するステップ；並びに (c) ステップ (b) において測定された複合体の存在又は量と、メチレンジオキシデザイナアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含む参照試料中における類似複合体の存在又は量とを比較するステップ、ここで該参照試料が、ステップ (a) 及び (b) により処理されたものである、を含む、生体試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物の測定方法、

〔2〕 該試料が尿である、前記〔1〕記載の測定方法、

〔3〕 該物質がMDMAである、前記〔2〕記載の測定方法、

〔4〕 (a) アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物を含むことが疑われる試料と、アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体及びメタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体からなる群より選ばれた抗体と、さらに標識部分を結合した分析対象物のリガンドを含有した複合体とを混合するステップ；

(b) 該分析対象物による競合的置換の結果として、該抗体に結合したまま若しくは結合していないままである複合体の存在又は量を測定するステップ；並びに (c) ステップ (b) において測定された複合体の存在又は量と、メチレンジオキシデザイナアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含み、か

つステップ (a) 及び (b) により処理された参照試料中における類似複合体の存在又は量とを比較するステップ、を含む、生体試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物の測定方法、

〔 5 〕 該試料が尿である、前記〔 4 〕記載の測定方法、

〔 6 〕 該物質がMDMAである、前記〔 5 〕記載の測定方法、

〔 7 〕 a . アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第 1 抗体と、

b . メタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第 2 抗体と、

c . 標識部分を結合したアンフェタミン又はアンフェタミン誘導体のリガンドを含有した複合体と、

d . メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含有したキャリアプレートとを組み合わせた包装物として含有してなる、生体試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物の測定方法を行なうためのキット、

〔 8 〕 該試料が尿である、前記〔 7 〕記載のキット、

〔 9 〕 該物質がMDMAである、前記〔 8 〕記載のキット、

〔 10 〕 a . アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体及びメタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体からなる群より選ばれた抗体と、

b . 標識部分を結合したアンフェタミン又はアンフェタミン誘導体のリガンドを含有した複合体と、

c . メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含有したキャリアプレートと、を組み合わせた包装物として含有してなる、生体試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物の測定方法を行なうためのキット、

〔 11 〕 該試料が尿である、前記〔 10 〕記載のキット、並びに

〔 12 〕 該物質がMDMAである、前記〔 11 〕記載のキット、に関する。

【 0010 〕

【発明の実施の形態】チャオ (Z h a o , H) ら [J. Anal. Toxicology, 25, 258-269 (2001)]は、販やかなパ

ーティー参加者由来の尿試料の 71% が、MDMA 単独もしくはMDA 単独又はアンフェタミンもしくはMDEA などの他のデザイナーアンフェタミン化合物との組合せで含むことを見出している。現在、これらの物質の検出に特異的にデザインされた市販のイムノアッセイはなく、そのため、前記物質の検出は、用いられたアンフェタミン又はメタアンフェタミンのスクリーニング法において呈示された相対的な交差反応性に依存している。一般的に、これらの化合物の多くに対する商業的に利用可能なアンフェタミン又はメタアンフェタミンのスクリーニング法の交差反応性は、低く、多少の陽性試料が、検出されない可能性が示唆されている。

【 0011 〕 濫用された薬物を試験する際、イムノアッセイ、特に競合結合イムノアッセイは、特に有利であることが証明されている。競合結合イムノアッセイにおいて、生体試料中における分析対象物は、分析対象物に特異的な抗体若しくは分析対象物アナログに特異的な抗体における限られた数のレセプター結合部位に対して、標識試薬、又は分析対象物アナログ、又はトレーサーと競合する。 - ガラクトシダーゼ及びペルオキシダーゼなどの酵素、フルオレセイン化合物などの蛍光化合物、

¹²⁵I などの放射性化合物、及び微粒子は、トレーサーとして用いられる慣用の標識化合物である。試料中における分析対象物の濃度は、抗体に結合するであろう分析対象物アナログの量を決定する。分析対象物及び分析対象物アナログのそれぞれが、個々の濃度に比例して抗体に結合するため、結合するであろう分析対象物アナログの量は、試料中における分析対象物の濃度に反比例する。ついで、遊離分析対象物アナログの量又は結合した分析対象物アナログの量が、用いられる特定の標識に適した方法により決定されうる。

【 0012 〕 本発明は、尿試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン、例えば、3, 4 - メチレンジオキシメタアンフェタミン (MDMA) 等の該アンフェタミン又はメタアンフェタミンに構造的に関連した薬物及びこれらの代謝産物を検出するための特異性が高いイムノアッセイ法が、薬物を服用していないの健康なヒトの尿におけるメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物及びアンフェタミン又はメタアンフェタミンに対する特異性を有し、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体からなる群より選ばれた物質を含有したキャリアプレートの使用により達成されうるという本発明者らの極めて驚くべき知見に基づく。

【 0013 〕 本発明の生体試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物の測定方法としては、具体的には、下記ステップ (a) ~ (c) :

(a) アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレ

ンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物を含むことが疑われる試料と、アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第1抗体と、メタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第2抗体と、標識部分を結合した分析対象物のリガンドを含有した複合体と、を混合するステップ；

(b) 該分析対象物による競合的置換の結果として、該抗体に結合したまま若しくは結合していないままである複合体の存在又は量を測定するステップ；並びに

(c) ステップ(b)において測定された複合体の存在又は量と、メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含む参照試料中における類似複合体の存在又は量とを比較するステップ、ここで該参照試料が、ステップ(a)及び(b)により処理されたものである；を含む方法、あるいは

(a) アンフェタミン、メタアンフェタミン及びメチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた分析対象物を含むことが疑われる試料と、アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体及びメタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体からなる群より選ばれた抗体と、さらに標識部分を結合した分析対象物のリガンドを含有した複合体とを混合するステップ；

(b) 該分析対象物による競合的置換の結果として、該抗体に結合したまま若しくは結合していないままである複合体の存在又は量を測定するステップ；並びに

(c) ステップ(b)において測定された複合体の存在又は量と、メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含み、かつステップ(a)及び(b)により処理された参照試料中における類似複合体の存在又は量とを比較するステップ、を含む方法、が挙げられる。

【0014】本発明の測定方法において、分析対象物としては、例えば、アンフェタミン、メタアンフェタミン、メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物などが挙げられる。

【0015】前記生体試料としては、例えば、尿などが挙げられる。本発明の測定方法は、特に、尿中における前記分析対象物の測定に好適である。

【0016】本発明の測定方法において、例えば、アンフェタミン、メタアンフェタミン、又は該アンフェタミン若しくはメタアンフェタミンに構造的に関連した薬物、すなわち、メチレンジオキシデザイナーアンフェタ

ミン化合物を含むことが疑われる試料(すなわち、分析対象物を含むことが疑われる試料)は、抗体と該抗体に対応する分析対象物との組合せに相互作用しうる標識された結合パートナーと、アンフェタミン又はメタアンフェタミンに対する特異性を有する抗体と混合される。ついで、前記のようにして得られた混合物について、選ばれたカットオフレベルで、分析対象物が、単独又は組合せられて存在することを検出する。

【0017】なお、「メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物」とは、3,4-メチレンジオキシアンフェタミン(MDA)、3,4-メチレンジオキシメタアンフェタミン(MDMA、エクスタシー)、3,4-メチレンジオキシエチルアンフェタミン(MDEA)、N-メチル-1-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-2-ブタンアミン(MBDB)及び3,4-メチレンジオキシフェニル-2-ブタンアミン(BDB)を含むメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログの群を意味する。

【0018】前記「メチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログ」としては、例えば、メチレンジオキシフェニルメチルアミンのアンフェタミンアナログ又はメチレンジオキシフェニルエチルアミンのアンフェタミンアナログ等が挙げられる。

【0019】「分析対象物を含むことが疑われる試料」としては、前記生体試料などが挙げられる。

【0020】本発明の測定方法において、用いられる特定の1種の抗体又は複数の抗体は、メチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体である。

【0021】また、前記標識部分としては、例えば、-ガラクトシダーゼ及びペルオキシダーゼなどの酵素、フルオレセイン化合物などの蛍光化合物、¹²⁵Iなどの放射性化合物、及びラテックス微粒子などの微粒子などが挙げられる。

【0022】本発明の測定方法は、例えば、比濁凝集アッセイ(turbidometric agglutination assay)、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、又は蛍光偏光イムノアッセイ等のいかなるタイプのイムノアッセイ様式にも用いられうる。本発明においては、凝集反応により引き起こされた変化の測定のための手段になる方法に影響されやすい凝集測定(agglutinometric)様式による本発明の使用が特に好適である。

【0023】手動及び自動化装置試験の両方が、かかる凝集測定解析に好適に用いられる。典型的には、自動化手段は、試料への添加のために適量の各試薬がピペティングされるであろう非常に多数の試薬容器又はリザーバーを用いて操作するであろう。対象(subject)凝集アッセイなどのイムノアッセイのために、これは、少なくとも2つのかかる容器；典型的には、抗体試薬のための容器と、対応するリガンドを結合させた微粒

子のための容器とを通常含むであろう。追加の容器又はリザーバーは、希釈液、緩衝液、又は試料の適切な処理のための他の助剤を含むいくつかの器具に存在してもよい。

【0024】臨床解析機は、競合凝集反応が生じ、かつ濁度の測定がなされる1つのキュベットに、搭載された試薬及び試料をピペットで移す。例えば、HITACHI 917アナライザー（ロシュ ダイアグノスティクス製）とABUSCREEN（登録商標） OnLine Amphetamines reagentkit（ロシュ ダイアグノスティクス製；カタログ番号1985965）とを用いて、尿試料を試料希釈液とともにキュベットにピペットで移し、ついで直ちに適量の抗体試薬をピペットで移し、混合する。開始時の吸光度計校正を行なう。ついで、適切な量の微粒子試薬をキュベットに移し、反応物を混合する。短時間のインキュベーションの後、最終濁度測定を行なう。反応物における濁度（吸光度）の全体の変化を、標準曲線及びng/mlで報告された結果と比較する。

【0025】本発明は、アンフェタミンに特異的な抗体と、メタアンフェタミンに特異的な抗体と、標識部分を結合したアンフェタミン又はアンフェタミン誘導体のリガンドを含有した複合体と、メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含有したキャリブレーターとを、組み合わせられた包装物として含有した試薬試験キットをも包含する。かかる試験キットは、MDMA及びそれに構造的に関連した化合物に対して増強された臨床感度を有するアッセイのための試薬を提供する。

【0026】本発明により提供されるキットとしては、具体的には、

- a. アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第1抗体と、
- b. メタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する第2抗体と、
- c. 標識部分を結合したアンフェタミン又はアンフェタミン誘導体のリガンドを含有した複合体と、
- d. メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含有したキャリブレーターとを組み合わせられた包装物として含有したキット；
- a. アンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有する抗体及びメタアンフェタミンに特異的であり、かつメチレンジオキシフェニルアルキルアミンのアンフェタミンアナログとの交差反応性を有

- する抗体からなる群より選ばれた抗体と、
- b. 標識部分を結合したアンフェタミン又はアンフェタミン誘導体のリガンドを含有した複合体と、
- c. メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた既知量の物質を含有したキャリブレーターと、を組み合わせられた包装物として含有したキットが挙げられる。

【0027】MDMAの測定のための市販のイムノアッセイキットは、現在、有効ではない。イムノアッセイを介してMDMAを測定する唯一の方法は、MDMAとの高い交差反応性を有する抗アンフェタミン抗体及び抗メタアンフェタミン抗体を含有し、かつアンフェタミン又はメタアンフェタミンをキャリブレーターとして用いる、アンフェタミン若しくはメタアンフェタミンの測定用試薬又は試薬キットの使用のみである。本発明において、メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物からなる群より選ばれた物質を用いて、アンフェタミンに対する抗体及びメタアンフェタミンに対する抗体を用いた市販のアッセイを較正する。メチレンジオキシデザイナーアンフェタミン化合物キャリブレーターは、
- ヒドロキシフェニルアミン化合物、例えば、エフェドリン、シュードエフェドリン、フェンタミン、チラミン、フェニルプロパノールアミン（PPA）などの薬物を著しく増加させることなしに、MDMA、MBDB、MDA、MDE及びBDBに対する臨床感度を著しく増加せしめる。

【0028】用いられた略号：

- AMP アンフェタミン
- BDB (±) - (3, 4 - メチレンジオキシフェニル) - 2 - プタンアミン
- HMMA 4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシメタアンフェタミン
- MAMP メタアンフェタミン
- MBDB (±) - N - メチル - 1 - (3, 4 - メチレンジオキシフェニル) - 2 - プタンアミン
- MDA (±) - 3, 4 - メチレンジオキシアンフェタミン
- MDEA (±) - 3, 4 - メチレンジオキシエチルアンフェタミン
- MDMA (±) - 3, 4 - メチレンジオキシメタアンフェタミン
- NT 試験せず
- PPA フェニルプロパノールアミン

【0029】発行された文献によるMDMA及びMDAのための近年市販されているアッセイの交差反応性、及び本発明の方法を用いた交差反応性を表1に列挙する。

【0030】

【表1】

化合物	ロシュ ヒタチ (Roche Hitachi) AMP 500 ng/ml	ロシュ インテグラ (Roche Integra) AMPSC 500 ng/ml	Abbott TDX AMP/methAMP 1000 ng/ml	CEDIA DAU AMP 1000 ng/ml	ロシュ ヒタチ (Roche Hitachi) AMP/MDMA 300 ng/ml
MDMA	36 %	79 %	97 %	69 %	100.0 %
MDA	35.5 %	40 %	148 %	1.9 %	25.0 %
MDEA	NT	NT	42.7 %	2.4 %	15.0 %
MBDB	NT	NT	(+)	NT	70.0 %
BDB	NT	NT	(+)	NT	4.7 %
d-AMP	100 %	100 %	100 %	101 %	97.0 %
l-AMP	6 %	4.2 %	56.9 %	3.0 %	3.8 %
d-MAMP	82.2 %	12 %	97.8 %	100 %	300.0 %
l-MAMP	0.8 %	12 %	7.2 %	12 %	18 %
dl-エフェドリン	<0.1 %	<0.1 %	NT	0.4 %	<0.3 %
l-PPA	1.5 %	1.1 %	NT	NT	0.6 %
HMMA	NT	NT	NT	NT	<0.3 %

【0031】各方法について、上記チャートに示されるカットオフレベルは、陽性結果を測定するための試験に要求された試料中の薬物の濃度である。

【0032】

【実施例】実施例1 抗体試薬の調製

ABUSCREEN(登録商標) OnLine HS Amphetamine/MDMA reagent kit(ロシュ ダイアグノスティックス製;カタログ番号1986619)に添付された指示書に従って、第1試薬を調製した。前記第1試薬は、ウシ血清アルブミンを含有した緩衝液に溶解されたアンフェタミンモノクローナル抗体(マウス)及びメタアンフェタミンモノクローナル抗体(マウス)、並びに保存料を含んだ。

【0033】実施例2 微粒子試薬の調製

ABUSCREEN(登録商標) OnLine HS Amphetamine/MDMA reagent kit(ロシュ ダイアグノスティックス製;カタログ番号1986619)に添付された指示書に従って、第2試薬を調製した。前記第2試薬は、緩衝液中のラテックス微粒子結合アンフェタミン誘導体と保存料とを含んだ。

【0034】実施例3 MDMAキャリブレーターの調製

ABUSCREEN(登録商標) OnLine Preciset(登録商標) MDMA calibrators(ロシュ ダイアグノスティックス製;カタログ番号4745556)に添付された指示書に従って、

キャリブレーターを調製した。キャリブレーター溶液は、ヒト尿中の3,4-メチレンジオキシメタアンフェタミンと保存料とを含んだ。キャリブレーターの最終濃度は、0、150、300及び600 ng/mlであった。

【0035】実施例4 MDMAキャリブレーターを用いたアッセイ

実施例3に従って調製されたキャリブレーター又は参照試料を、HITACHI 917アナライザー(ロシュ ダイアグノスティックス製)とカットオフ値300 ng/mlとを用いて、OnLine reagent kitに添付された指示書に従ってアッセイした。用いられたパラメーターは、10 µl 試料、160 µl 抗体試薬及び90 µl 微粒子試薬であった。反応物を端点(読み取り点19-33)において単色(505 nm)で追跡した。505 nmにおける吸光度の変化をy軸にプロットし、MDMA濃度をx軸にプロットした用量応答曲線を図2に示す。

【0036】実施例5 MDAキャリブレーターを用いたアッセイ

MDMAの代わりにMDAを用いることを除き、実施例3に記載のように調製されたキャリブレーター又は参照試料を、HITACHI 717アナライザー(ロシュ ダイアグノスティックス製)を用いて、OnLine reagent kitに添付された指示書に従ってアッセイした。用いられたパラメーターは、15 µl 試料、170 µl 抗体試薬、80 µl 微粒子試薬で

あった。反応物を端点（読み取り点27-50）において単色（505nm）で追跡した。505nmにおける吸光度の変化をy軸にプロットし、MDMA濃度をx軸にプロットした用量応答曲線を図3に示す。

【0037】MDAをキャリブレーターとして用いた場合に観察された交差反応性は、表2のとおりであった：

【0038】

【表2】

化合物	ロシュ ヒタチ (Roche Hitachi) AMP/MDMA 300 ng/ml
MDMA	81.0 %
MDA	100.0 %
d-AMP	319.0 %
l-AMP	15.2 %
d-MAMP	269.0 %
l-MAMP	24.7 %
dl-エフェドリン	0.34 %
l-PPA	6.2 %

【0039】実施例6 尿試料のアッセイ
アンフェタミン、メタアンフェタミン又はメチレンジオ

キシデザイナーアンフェタミン化合物を含むことが疑われた尿生検を、実施例4に記載された手順に従い、MDMAキャリブレーターを0、150、300及び600ng/mlのレベルで用い、処理した。未知試料の505nmにおける吸光度の変化と、既知濃度のキャリブレーターで得られた505nmにおける吸光度の変化とを比較することにより結果を得た。72尿生検で得られた結果は、デザイナーアンフェタミン化合物を検出する、参照のクロマトグラフィー法と100%一致した。

10 【0040】

【発明の効果】本発明の測定方法及びキットにより、生体試料中における、アンフェタミン、メタアンフェタミン、構造的に関連した薬物及びこれらの薬物の代謝産物を、高い特異性により検出することが可能になる。

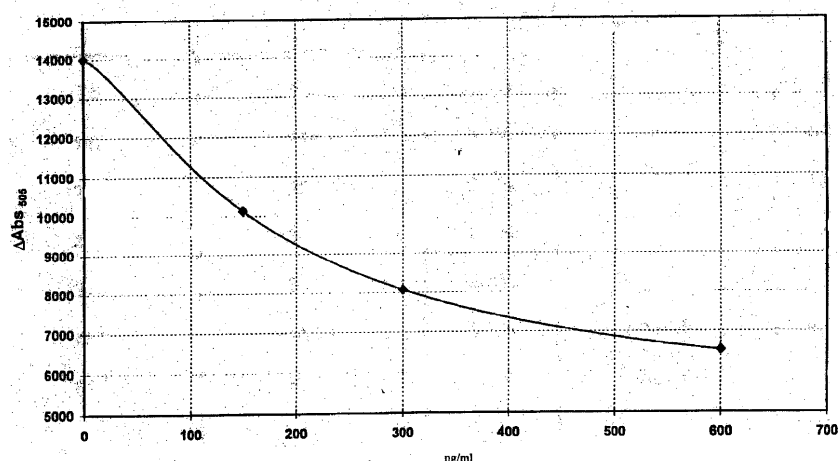
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、アンフェタミン、メタアンフェタミン及び3,4-メチレンジオキシデザイナー薬物の構造を示す図である。

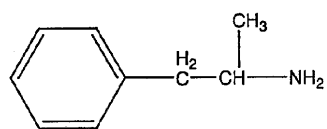
20 【図2】図2は、アンフェタミンに特異的な抗体、メタアンフェタミンに特異的な抗体及び既知量のMDMAを含有したキャリブレーターとを含有した本発明のアッセイを用いて作成された用量応答曲線の図である。

【図3】図3は、アンフェタミンに特異的な抗体、メタアンフェタミンに特異的な抗体及び既知量のMDAを含有したキャリブレーターとを含有した本発明のアッセイを用いて作成された用量応答曲線の図である。

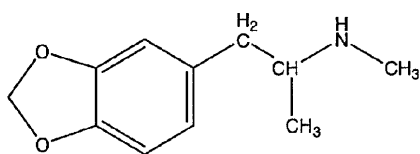
【図2】



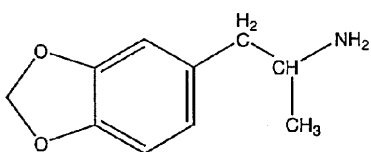
【図1】



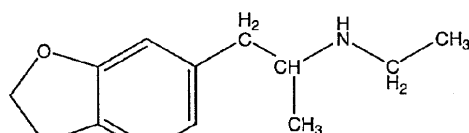
アンフェタミン



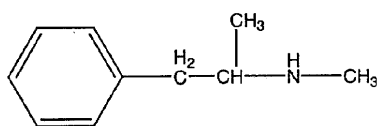
3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA)



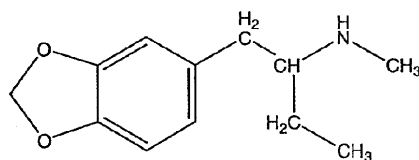
3,4-メチレンジオキシアンフェタミン (MDA)



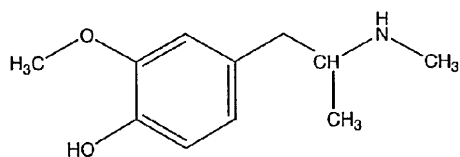
3,4-メチレンジオキシエチルアンフェタミン (MDEA)



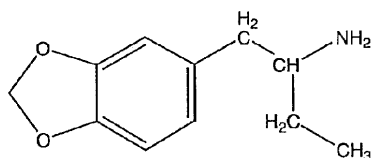
メタンフェタミン



N-メチル-1-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-2-ブタンアミン (MBDB)

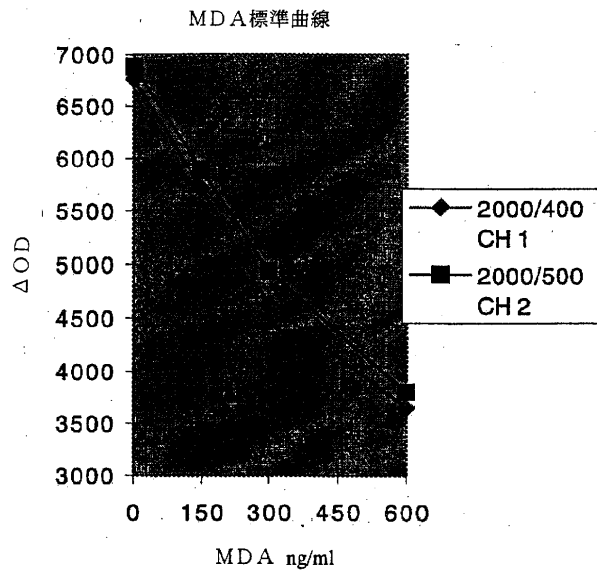


4-ヒドロキシ-3-メトキシメタンフェタミン (HMMA)



3,4-メチレンジオキシフェニル-2-ブタンアミン (BDB)

【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 ファイル チャオ
アメリカ合衆国 インディアナ 46033
カーメル, スコティッシュ ベンド
12572

(72)発明者 クリスティーナ ゴック - ズクトニッカ
アメリカ合衆国 インディアナ 46236
インディアナポリス, ペントウォーター
コート 12332

专利名称(译)	测量安非他明，间苯丙胺和亚甲二氧基设计者苯丙胺化合物的方法		
公开(公告)号	JP2002055104A	公开(公告)日	2002-02-20
申请号	JP2001199694	申请日	2001-06-29
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	アランジェイマクナリー ファイルチャオ クリスティーナゴックズクトニッカ		
发明人	アラン ジェイ.マクナリー ファイル チャオ クリスティーナ ゴック-ズクトニッカ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/94		
CPC分类号	G01N33/946 Y10S436/816		
FI分类号	G01N33/53.G		
优先权	09/608524 2000-06-30 US		
其他公开文献	JP3538164B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种分析对象的免疫测定方法及其试剂盒，能够通过免疫测定方法检测尿样中的安非他明，甲基苯丙胺和亚甲二氧基设计的苯丙胺化合物，具有高灵敏度。解决方案：在分析对象的免疫测定方法及其试剂盒中，生物样品，苯丙胺特异性第一抗体，与亚甲二氧基苯基烷基胺的苯异丙胺类似物具有交叉反应性，甲基苯丙胺特异性第二抗体，与安非他明具有交叉反应性将亚甲二氧基苯基烷基胺的类似物与结合有识别部分的分析对象的配位体混合；测量所得复合物的存在或数量；将测量结果与已知量的物质进行比较，所述物质选自自由亚甲二氧基设计的苯丙胺化合物组成的组。

化合物	ロシュ ヒタチ (Roche Hitachi) AMP/MDMA 300 ng/ml
MDMA	81.0 %
MDA	100.0 %
d-AMP	319.0 %
l-AMP	15.2 %
d-MAMP	269.0 %
l-MAMP	24.7 %
dl-エフェドリン	0.34 %
l-PPA	6.2 %